

PAULO FERNANDO DIAS

**MODULAÇÃO DA VASCULOGÊNESE, ANGIOGÊNESE E
DE DESENVOLVIMENTO TUMORAL POR DERIVADOS DE
Sargassum stenophyllum (PHAEOPHYCEAE).**

Florianópolis – SC

2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

**MODULAÇÃO DA VASCULOGÊNESE, ANGIOGÊNESE
E DE DESENVOLVIMENTO TUMORAL POR
DERIVADOS DE *Sargassum stenophyllum*
(PHAEOPHYCEAE).**

PAULO FERNANDO DIAS

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Farmacologia.

Florianópolis – SC

2005

Orientadora:

Prof^ª. Dra. Rosa Maria Ribeiro do Valle Nicolau

Esta Tese foi realizada no Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais do Departamento de Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Santa Catarina no decorrer do Curso de Pós-Graduação - Doutorado - em Farmacologia.

**Dedico este trabalho à minha mãe, Gercy
e a meu pai, Manoel - in *memoriam*.**

À minha irmã Ana Paula, com amor.

*"E os seus frutos servirão de
sustento e as suas folhas
de remédio."
(Ez. 47, 12)*

AGRADECIMENTOS

Especialmente à Profa. Dr^a. Rosa Maria Ribeiro do Valle Nicolau, por me ter dado a oportunidade e pelo apoio e incentivo dados a este trabalho. E porque, ao lado da orientadora, sempre encontrei nela uma verdadeira amiga.

Aos demais professores do Departamento de Farmacologia, em especial ao Prof. Dr. Giles Alexander Rae, ao Prof. Dr. Jamil Assreuy e à Prof^a. Dra. Thereza Christina M. de Lima Nogueira, pela valiosa colaboração, amizade e atenção.

Ao Prof. Dr. Antônio Ricardo de Toledo Gagliardi, que me recebeu em seu laboratório (Dislipidemias/InCor/FMUSP) e com quem muito aprendi, pelo incentivo, co-orientação e colaboração, visão crítica e objetividade, traduzidos na simplicidade de fazer ciência com respeito humano. E, pela grande amizade.

Ao Dr. José Eduardo Kriegger, Dr. José Xavier Neto e demais membros do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração (InCor/FMUSP) pela receptividade e imensa colaboração.

À Dr^a. Célia Liberman (Biotecnologia/Inst.Butantã/USP) pela atenção e relevante apoio.

Ao Prof. Dr. Marcelo Maraschin (FIT/CCA/UFSC), pela co-orientação nas etapas de caracterização da estrutura química e pela dedicação e colaboração no transcorrer deste trabalho, sem os quais a sua conclusão não seria possível. E por sua amizade de tantos e bons anos.

Ao Prof. Dr. Ênio Pedrotti e ao grupo do Laboratório de Bioquímica e Morfogênese Vegetal (FIT/CCA/UFSC), pela interação e importante colaboração ao longo deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcos L. Pessati e equipe do Laboratório de Ciência e Tecnologias do Mar (CTT-Mar/Univali, SC), pelo apoio crucial no processamento e fornecimento das biomassas de algas, que viabilizaram o início do presente estudo.

Ao Prof. Dr. Antônio Gilberto 'Giba' Ferreira (UFSCar,SP), pela amizade, gentileza e relevante colaboração nos ensaios de ressonância magnética nuclear.

À Prof^a. Dr^a. Andréa Gonçalves Trentin, responsável pelo Laboratório de Neurobiologia e Hematologia Celular e Molecular (BEG/CCB/UFSC) e ao acadêmico Marco Augusto Stimamiglio, pela atenção e gentil fornecimento de culturas da linhagem de melanoma.

Ao Prof. Dr. Alfredo T. Nunes Pires, Prof. Dr. Valdir Soldi e Prof. Dr. Miguel S. Balparda Caro (QMC/CFM/UFSC), pela atenção e preciosa colaboração.

À Prof^a. Dr^a. Yara Maria R. Müller e colegas responsáveis pelo Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal (BEG/CCB/UFSC), bem como aos seus membros estagiários, pela valiosa colaboração e atenção sempre dispensados.

Aos Servidores Técnico-Administrativos do Departamento de Farmacologia (UFSC), particularmente à Sra. Sandra Regina B. de Oliveira, Sra. Rita Maria Palma, Sra. Diana Egéria Lenzi, Sra. Maria Goretti Crozeta, Sr. Carlos César (Zu) de Farias e Sr. Pedro Paulo de Souza que indiretamente tanto contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Antônio Vicente Cony e Dr. Denizard Ferrão Ribeiro (Empresa Agrovêneto,SC) e ao Dr. Danilo Irigoit e Dr. Wilson Bevilac (Empresa Macedo Koerich,SC), pela colaboração e inestimável suporte no fornecimento de material biológico para a pesquisa.

A todos os colegas do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e, em particular, aos caríssimos colegas do Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais, Jarbas Motta Siqueira Jr., Ângela Cristrina Bet, Elke Schuldt, Juliana Sandin, Mariana A. Hort, Regina Felipe, Sílvia Dal Bó, Sofia Jürgensen e ainda, à Dr^a. Karina Ckless, porque fazer ciência ao lado de vocês, foi um feliz privilégio.

Aos confrades “Irmãos de Baco”, estimados amigos que tanto me ajudaram a manter a sanidade...

Especialmente, à minha esposa Maria Geralda e à minha filha Virgínia Soprana Dias, pelo apoio incondicional e por entenderem as minhas ausências e, às vezes, a minha distância quando presente.

Aos animais sacrificados neste estudo, em prol da ciência.

E a Deus, minha inesgotável fonte de força e coragem.

Sumário

Lista de abreviações	i
Lista de figuras e tabelas	iii
Resumo	vi
Abstract	viii
1. Introdução	01
1.1 <i>Particularidades do sistema cardiovascular e das células endoteliais</i>	01
1.2. <i>Características dos processos de formação de vasos sanguíneos</i>	02
1.3. <i>Sinopse sobre os fatores envolvidos na regulação do processo de angiogênese normal.</i>	05
1.4. <i>Aspectos da vascularização no âmbito da patologia e da terapêutica antitumoral</i>	18
1.4.1. <i>A angiogênese fisiopatológica relacionada ao câncer</i>	18
1.4.2. <i>Características gerais dos tumores de melanoma</i>	20
1.4.3. <i>Aplicações do controle da angiogênese na terapêutica antitumoral</i>	21
1.5. <i>Modelos experimentais voltados à avaliação da atividade antiangiogênica</i>	28
1.6. <i>Características da vascularização e da morfogênese de embriões de galinha</i> ..	30
1.7. <i>Atividades antiangiogênica e antitumoral – potencial farmacológico de produtos naturais</i>	32
2. Objetivos	36
2.1. <i>Objetivo geral</i>	36
2.2. <i>Objetivos específicos</i>	36
3. Material e métodos	37
3.1. <i>Animais</i>	37
3.1.1. <i>Ovos e embriões de galinha da espécie Gallus domesticus</i>	37
3.1.2. <i>Camundongos da espécie Mus musculus</i>	37
3.2. <i>Células tumorais</i>	38
3.3. <i>Materiais e reagentes</i>	38
3.4. <i>Métodos</i>	39
3.4.1. <i>Isolamento e caracterização de polissacarídeos isolados de parede celular de Sargassum stenophyllum</i>	39

3.4.1.1. Coleta	39
3.4.1.2. Extração de polissacarídeos	40
3.4.1.3. Quantificação de proteínas	41
3.4.1.4. Quantificação de ácidos urônicos	42
3.4.1.5. Hidrólise química de polissacarídeos	43
3.4.1.6. Espectroscopia de infravermelho	43
3.4.1.7. Cromatografia de camada delgada	43
3.4.1.8. Ressonância magnética nuclear de Carbono-13	44
3.4.2. Estudo da atividade inibitória sobre a formação de vasos sanguíneos	44
3.4.2.1. Ensaio de vasculogênese na vesícula vitelínica do embrião de galinha	44
3.4.2.1.1. Cultura de embriões de galinha in vivo	45
3.4.2.1.2. Cultura de embriões-totais de galinha in vitro	47
3.4.2.1.3. Histologia de membranas vascularizadas da vesícula vitelínica...	49
3.4.2.2. Ensaio de angiogênese na membrana corioalantóica do embrião de galinha	50
3.4.2.3. A morfogênese embrionária como um parâmetro da atividade angiostática	52
3.4.2.4. Ensaio de angiogênese em adulto através dos implantes de gelfoam	53
3.4.3. Estudo da atividade antitumoral	54
3.4.3.1. Cultura de células	54
3.4.3.2. Estudos in vitro	54
3.4.3.2.1. Ensaio de migração celular	54
3.4.3.2.2. Ensaio de viabilidade celular	55
3.4.3.3. Estudos in vivo	56
3.4.3.3.1. Ensaio de carcinogênese	56
3.4.4. Critérios para a utilização dos polissacarídeos (frações SargA e SargB)	57
3.4.5. Análise de dados e estatística	58

4. Resultados	59
4.1. <i>Caracterização dos polissacarídeos isolados de parede celular de Sargassum stenophyllum</i>	59
4.2. <i>Avaliação da atividade inibitória da formação de vasos sanguíneos</i>	60
4.2.1. <i>Análise da vasculogênese</i>	60
4.2.1.1. <i>Vasculogênese em embriões de galinha in vivo</i>	60
4.2.1.2. <i>Vasculogênese em embriões de galinha in vitro</i>	68
4.2.1.3. <i>Análise da vasculogênese com base na histologia de membranas da vesícula vitelínica</i>	72
4.2.1.4. <i>Morfogênese embrionária no período da vasculogênese</i>	74
4.2.1.4.1. <i>Análise da morfogênese de embriões incubados in vivo</i>	74
4.2.1.4.2. <i>Análise da morfogênese de embriões incubados in vitro</i>	79
4.2.2. <i>Análise da angiogênese</i>	83
4.2.2.1. <i>Angiogênese em embriões de galinha in vivo</i>	83
4.2.2.1.1. <i>Morfogênese embrionária no período da angiogênese</i>	90
4.2.2.2. <i>Angiogênese induzida em camundongos adultos</i>	95
4.3. <i>Avaliação da atividade antitumoral</i>	98
4.3.1. <i>Atividade antitumoral in vitro</i>	98
4.3.1.1. <i>Análise da migração celular</i>	98
4.3.1.2. <i>Determinação da viabilidade celular</i>	100
4.3.2. <i>Atividade antitumoral in vivo</i>	101
4.3.2.1. <i>Análise do crescimento do tumor sólido</i>	101
5. Discussão	105
6. Conclusões	134
7. Referências Bibliográficas	136
8. Anexos	158
<i>Anexo 1. Quantificação de proteínas</i>	158
<i>Anexo 2. Espectroscopia de infravermelho</i>	159
<i>Anexo 3. Ressonância magnética nuclear de Carbono –13</i>	160
<i>Anexo 4. Cromatografia de camada delgada</i>	161
<i>Anexo 5. Publicações</i>	162

Abreviações

AcOH = ácido acético

AG = angiogênese

Ang = angiopoietina

bFGF = fator de crescimento de fibroblastos - tipo básico

BMP = proteína morfogenética do osso

BSTFA = bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida

CAM = membrana corioalantóica

CBB = Coomassie brilliant blue®

CCV = comprimento no segmento cefálico-cervical

CFS = sulfato de condroitina fucosilada

CVC = comprimento no segmento cervical-caudal

DAG = diacilglicerol

D₂O = água deuterada

DMSO = dimetilsulfóxido

E1,5 (- E10) = idade embrionária (um dia e meio a 10 dias de idade)

ECM = matriz extracelular (*MEC*)

EDTA = ácido etilenodiaminotetracético

Eph = efrina

EtOH = etanol

FBS = soro fetal bovino

FGFRs = receptores de fator de crescimento de fibroblastos

FRS-2 = substrato 2 do receptor de *FGF*

GLG = glicosaminoglicana

HA = ácido hialurônico

Hb = hemoglobina

HBGF = fatores de crescimento ligantes de heparina

HIFs = fatores induzidos por hipóxia

HS= sulfato de heparana

HSPG = proteoglicana de sulfato de heparana

HC = hidrocortisona

HP = heparina

IP₃ = trifosfato de inositol

IV = infravermelho

MAPKs = proteínas quinases ativadas por mitógenos

MetOH = metanol

MMPs = metaloproteinases de matriz

MTT = Brometo de dimetiltiazol-2-il-2,5-difenil-tetrazólio,

PDGF = fator de crescimento derivado de plaquetas

PGs = proteoglicanas

PKC = proteína quinase C

PLA₂ = fosfolipase A₂

PLC = fosfolipase

RPMI-1640 = meio de cultura de células *Roosevelt Park Memorial Institute-1640*

SargA; SargB = polissacarídeos isolados de parede celular de *S. stenophyllum*

s.c. = subcutânea

SDS = sulfato de dodecil sódio

SERMs = moduladores seletivos de receptores de estrogênios

TFA = ácido trifluoroacético

TNF- α = fator de necrose tumoral – tipo alfa

Tie = receptor de angiopoietina (Ang)

t-Resv = trans-resveratrol

VEGF = fator de crescimento vascular endotelial

VEGFRs = receptores de VEGF

VE-PTP = fosfatase de proteína tirosina-vascular endotelial

VG = vasculogênese

YSM = membrana do saco vitelínico

Lista de figuras e tabelas

- Figura 1** - Modelo estrutural de um complexo de moléculas de proteoglicanas. 08
- Figura 2** - Representação esquemática de um modelo de regulação do fator de crescimento de fibroblastos – tipo básico (bFGF). 14
- Figura 3** - Imagem fotográfica do sistema de incubação de embriões de galinha e esquema representativo dos tratamentos nas membranas dos ovos, nos ensaios de vasculogênese e angiogênese. 46
- Figura 4** – Esquema representando o aspecto das monocamadas da cultura no ensaio de migração celular. 55
- Figura 5** - Imagens fotográficas do efeito inibitório dos polissacarídeos SargA e SargB, derivados de parede celular de *Sargassum stenophyllum*, na vasculogênese da vesícula vitelínica dos embriões (idade de 4 dias). 62
- Figura 6** - Efeito da administração de heparina (50 UI/disco) e hidrocortisona (156 µg/disco), isoladamente e em associação, na vasculogênese da vesícula vitelínica dos embriões (idade de 4 dias). 63
- Figura 7** - Efeitos dos polissacarídeos SargA e SargB (6 – 1500 µg/disco) administrados isoladamente e em associação com a hidrocortisona, na vasculogênese da vesícula vitelínica dos embriões (idade de 4 dias). 66
- Figura 8** - Percentagem de microvasos no limite do suporte (disco) de metilcelulose na vesícula vitelínica (vasculogênese) dos embriões (4 dias de idade) nos tratamentos com os polissacarídeos SargA e SargB, isoladamente ou em associação com bFGF (50 ng/disco). 67
- Figura 9** - Imagens fotográficas do efeito inibitório dos polissacarídeos SargA e SargB, na vasculogênese da vesícula vitelínica dos embriões na idade de 3,5 dias, cultivados *in vitro*. 70
- Figura 10** - Efeito dos polissacarídeos SargA e SargB na vasculogênese da vesícula vitelínica dos embriões cultivados *in vitro* (1,5 – 3,5 dias). 71
- Figura 11** - Imagens fotográficas de secções histológicas das membranas de vesículas vitelínicas submetidas aos tratamentos *in vivo*, com SargA e SargB. 73
- Figura 12** - Efeitos dos polissacarídeos SargA e SargB no comprimento total, e da administração de heparina e hidrocortisona, isoladamente e em associação, na morfogênese (percentagem de comprimento cefálico) dos embriões de galinha na idade de 4 dias. 75

- Figura 13** - Percentagem de comprimento cefálico dos embriões (idade de 4 dias) nos tratamentos com os polissacarídeos SargA e SargB isoladamente ou em associação com hidrocortisona. 77
- Figura 14** - Percentagem de comprimento cefálico dos embriões (idade de 4 dias) nos tratamentos com os polissacarídeos SargA e SargB isoladamente ou em associação com bFGF. 78
- Figura 15** - Percentagem de comprimento cefálico, e comparação entre os segmentos cefálico – cervical e cervical – caudal dos embriões nos tratamentos *in vitro* (1,5 – 3,5 dias) com os polissacarídeos SargA e SargB 80
- Figura 16** - Percentagem de comprimento cefálico dos embriões nos tratamentos *in vitro* (1,5 – 3,5 dias) com o trans-resveratrol (0,005 – 0,5 µg/disco). 82
- Figura 17** - Imagens fotográficas do efeito dos polissacarídeos SargA e SargB, sobre a angiogênese na membrana corioalantóica dos embriões (idade de 8 dias). 84
- Figura 18** - Efeitos da administração de heparina e hidrocortisona, isoladamente ou em associação (controle positivo), na angiogênese da membrana corioalantóica dos embriões (idade de 8 dias). 85
- Figura 19** - Efeitos dos polissacarídeos SargA e SargB (2 – 1500 µg/disco), administrados isoladamente e em associação com a hidrocortisona, na angiogênese da membrana corioalantóica dos embriões (idade de 8 dias). 88
- Figura 20** - Percentagem de microvasos na membrana corioalantóica dos embriões (idade de 8 dias) nos tratamentos com os polissacarídeos SargA e SargB isoladamente ou em associação com bFGF. 89
- Figura 21** - Efeitos dos polissacarídeos SargA e SargB sobre o comprimento total, e da administração de heparina e hidrocortisona, isoladamente e em associação, na morfogênese (percentagem de comprimento cefálico) dos embriões de galinha na idade de 8 dias. 92
- Figura 22** - Efeitos dos polissacarídeos SargA e SargB, administrados isoladamente e em associação com a hidrocortisona, na morfogênese (percentagem de comprimento cefálico) dos embriões (6 – 8 dias). 93
- Figura 23** - Percentagem de comprimento cefálico dos embriões (8 dias) nos tratamentos com os polissacarídeos SargA e SargB isoladamente ou em associação com bFGF. 94
- Figura 24** - Efeito do polissacarídeo SargA (1500 µg/disco), na angiogênese induzida por bFGF no conteúdo de hemoglobina em *plugs* de *gelfoam*[®] implantados (s.c.) em camundongos adultos. 97

Figura 25 – Imagens fotográficas e atividade dos polissacarídeos SargA e SargB (50 – 200 µg/ml) sobre a migração de células de melanoma B16F10.	99
Figura 26 - Atividade dos polissacarídeos SargA e SargB (50 – 2000 µg/poço) na viabilidade de células de melanoma B16F10.	100
Figura 27 Imagens fotográficas do crescimento de tumores de melanoma em adultos.	102
Figura 28 - Efeito do SargA (1,5 – 150 µg/animal) no volume de tumores sólidos e no peso corpóreo em camundongos previamente inoculados com células de melanoma B16F10.	104
Figura 29 - Esquema de um modelo com vias de sinalização angiogênica a partir da interatividade do bFGF com proteoglicanas de sulfato de heparana e possíveis sítios de inibição da formação de vasos sanguíneos mediada por polissacarídeos exógenos.	113
Figura 30 - Esquema com as diferentes famílias de moléculas sinalizadoras dos processos de formação de vasos sanguíneos e respectivos receptores.	115
Tabela 1 – Comparação entre as respostas aos tratamentos com os polissacarídeos SargA e SargB (6 – 1500 µg/disco) e heparina (50 UI/disco) administrados isoladamente e em associação com a hidrocortisona (156 µg/disco), na vasculogênese da vesícula vitelínica dos embriões (idade de 4 dias).	65
Tabela 2 - Comparação entre as respostas aos tratamentos com os polissacarídeos SargA e SargB (2 – 1500 µg/disco) e heparina (50 UI/disco) administrados isoladamente e em associação com a hidrocortisona (156 µg/disco), na angiogênese da membrana corioalantóica dos embriões (idade de 8 dias).	86
Anexo 1 (Figura A1) - Quantificação do teor de proteínas dos polissacarídeos SargA e SargB (4M KOH) extraídos de parede celular de <i>S. stenophyllum</i> ,	158
Anexo 2 (Figura A2) - Absorbância expressa em comprimento de onda (cm ⁻¹), obtida através de espectroscopia de infravermelho, dos polissacarídeos SargA e SargB.	159
Anexo 3 (Figura A.3) - Espectros de ressonância magnética nuclear do átomo de carbono (NMR – ¹³ C) dos polissacarídeos SargA e SargB.	160
Anexo 4 (Figura A.4) - Análises cromatográficas em camada delgada, de hidrolisados dos polissacarídeos SargA e SargB.	161
Anexo 5 – Publicações	162

Resumo

Polissacarídeos de parede celular da alga parda *Sargassum stenophyllum* (SargA e SargB) foram estudados *in vivo* e *in vitro* como agentes angiostáticos e antitumorais. O efeito sobre a vasculogênese foi avaliado no ensaio de membrana de vesícula vitelínica de embriões de galinha (1,5 - 4 dias de idade), tendo SargA e SargB (6 – 1500 µg) reduzido a porcentagem de vasos vitelinos para 77 – 0 % e 89 – 3 %, respectivamente, em relação ao controle (água; veículo). Heparina (HP; 50 UI) associada à hidrocortisona (HC; 156 µg) foi utilizada como controle positivo (100 % e 89,5 % de inibição na vasculogênese e na angiogênese, respectivamente). O SargA potencializou o efeito inibitório da HC, enquanto o efeito do SargB foi, no máximo, aditivo. Entretanto, o SargB reverteu parcialmente o efeito pró-vasculogênico do bFGF (144 %) em relação ao controle. Os polissacarídeos foram avaliados como agentes antiangiogênicos através dos ensaios *in vivo* da membrana corioalantóica (CAM) do embrião de galinha (6 - 8 dias de idade) e do *gelfoam*® implantado (s.c.) em camundongos suíços adultos. A administração de SargA e SargB (2 – 1500 µg) na CAM reduziu a porcentagem de vasos sangüíneos para 65 – 36 % e 43 – 2 % respectivamente, em relação ao controle, sendo que tanto o SargB, como a HP (50 UI), potencializaram o efeito inibitório da HC (156µg), enquanto o efeito do SargA foi meramente aditivo. Contudo, o SargA reverteu parcialmente o efeito pró-angiogênico do bFGF (159%) em relação ao controle. Este efeito foi confirmado no ensaio do implante de *gelfoam*, sendo que o SargA (1500 µg/implante) inibiu a angiogênese estimulada pelo bFGF para 5% (81 mg/dl de hemoglobina; Hb) comparado ao grupo controle (PBS; 680 mg/dl de Hb). SargA e SargB (1500 µg) modificaram o padrão de morfogênese dos embriões no período de 1,5 - 4 dias de idade, reduzindo a porcentagem de comprimento cefálico em relação ao comprimento total para 38 % e 35%, respectivamente, comparado ao grupo controle (45%), sem qualquer evidência de efeito embriotóxico. Após, foi avaliada a atividade antitumoral do SargA, s.c. (1,5 – 150 µg/animal; 1 dose diária / 3 dias) em camundongos suíços adultos, previamente inoculados com células de melanoma B16F10. O SargA reduziu o volume dos tumores sólidos em 55 - 72 %, retardando o equivalente a 2,5 - 5 dias o crescimento tumoral em

relação ao controle (meio RPMI-1640), sem qualquer evidência de toxicidade. Nos ensaios antitumorais *in vitro*, SargA e SargB (50 - 200 $\mu\text{g/ml}$) inibiram em 55 – 95 % e 62 – 97 %, respectivamente, a migração celular e reduziram (50 – 2000 $\mu\text{g/poço}$) a viabilidade das células do melanoma B16F10 avaliada por meio do método do MTT (31 – 78 % e 17 - 71%, respectivamente). A ação angiostática do SargA e SargB sugere que, devido às características químicas, ambos os polissacarídeos possam modular a atividade de fatores de crescimento angiogênicos ligantes de HP, tal como o bFGF, o qual também atua como um morfógeno, e interferir mimeticamente na atividade das proteoglicanas de sulfato de heparana durante a formação de vasos sanguíneos. Os resultados dos estudos *in vivo* e *in vitro* sugerem que o efeito antitumoral dos polissacarídeos esteja relacionado à inibição da angiogênese ou à ação citostática e/ou citotóxica sobre as células do melanoma.

Abstract

Cell wall polysaccharides of the brown seaweed *Sargassum stenophyllum* (SargA and SargB) were studied *in vivo* as well as *in vitro* as angiostatic and antitumoral agents. The effect on vasculogenesis was evaluated in the chick yolk-sac membrane assay (1.5 – 4 days of age), where SargA as well as SargB (6 – 1500 μg) decreased the percentage of vitelline vessels to 77 – 0 % and 89 – 3 %, respectively, as compared to control (water; vehicle). Heparin (HP; 50 UI) plus hydrocortisone (HC; 156 μg) were used as a positive control (100 % and 89.5 % of inhibition in the vasculogenesis and angiogenesis, respectively). SargA potentiated the inhibitory effect of HC, while the SargB effect was merely additive. However, SargB partially reversed the vasculogenic effect of bFGF (144 %) compared to control. Both the polysaccharides were evaluated *in vivo* as an antiangiogenic agent in the chorioallantoic membrane (CAM) assay of chick embryos (6 - 8 days of age) and by means of gelfoam® plugs, implanted (s.c.) in adult Swiss mice. The administration of SargA as well as SargB (2 – 1500 μg) in the CAM decreased the percentage of chorioallantoic vessels to 65 – 36 % and 43 – 2 %, respectively, compared to control. SargB as well as HP (50 UI/disco) potentiated the inhibitory effect of HC (156 μg), while the SargA effect was merely additive. However, SargA partially reversed the vasculogenic effect of bFGF (159 %) compared to control, as confirmed by the gelfoam implant assay, which shows that SargA (1500 $\mu\text{g}/\text{plug}$) inhibited the bFGF-stimulated angiogenesis to 5% (81 mg/dl hemoglobin; Hb) compared to control (PBS; 680 mg/dl Hb). SargA as well as SargB (1500 μg) changed the morphogenesis pattern of 4-day chick embryos, by decreasing the percentage cephalic length in relation to total length, by 38 % and 35 %, respectively, compared to control (45%), without to evidence any embryotoxic effect. Afterwards, it was evaluated the antitumoral activity of SargA administered s.c. (1.5 – 150 $\mu\text{g}/\text{animal}$; 1 dose/day for 3 days) on back of Swiss mice, previously inoculated with B16F10 murine melanoma cells. SargA decreased the volume of solid tumors, by 55 - 72 %, delaying the equivalent to 2.5 - 5 days the tumor growth, compared to control (RPMI-1640 medium), without producing any overt signs of general toxicity within the observation period of 2 weeks. In the *in vitro* assays SargA

and SargB (50 - 200 $\mu\text{g/ml}$) inhibited the cell migration by 55 – 95 % and 62 - 97%, respectively, as well decreased (50 – 2000 $\mu\text{g/well}$) the viability of B16F10 melanoma cells from 31 to 78% and from 17 to 71%, respectively, by using the MTT method. In conclusion, the angiostatic actions from SargA and SargB suggest that both polysaccharides may, in face of chemical characteristics, modulate the activity of heparin-binding vascular growth factors (such as bFGF, which also acts as a morphogen), mimetically interfering with heparan sulfate proteoglycans during the processes of vessel formation. The results on *in vivo* as well *in vitro* studies indicate that the antitumoral effects of SargA and SargB should be related to angiogenesis inhibition or to cytostatic and/or selective cytotoxic action on the melanoma tumor cells.

1. Introdução

A formação de vasos sangüíneos é mantida sob rígido controle no organismo do adulto, e erros na regulação desse processo levam ao crescimento descontrolado de vasos, o que é crítico em diversas patologias, como a artrite reumatóide e alguns tipos de câncer (Folkman & Klagsbrun, 1987; Koch, 1998).

Estudos pré-clínicos têm demonstrado que a inibição de processos de formação de vasos sangüíneos pode inibir também o crescimento de tumores, o que conduz ao interesse clínico na identificação de princípios ativos que potencialmente venham a bloquear a neovascularização ou, ainda, que induzam precocemente a regressão da vascularização patológica (Gullino, 1978; Crum *et al.*, 1985; Carmeliet & Jain, 2000; Hlatky & Folkman, 2002; Carmeliet, 2003; Fidler, 2003).

1.1. *Particularidades do sistema cardiovascular e das células endoteliais*

O sistema cardiovascular é um dos primeiros sistemas a iniciar o desenvolvimento, estabelecendo-se durante o período embrionário a partir da camada germinativa intermediária do embrião – o mesoderma – através de processos que envolvem interações entre diferentes linhagens celulares (Gilbert, 2000; Jones *et al.*, 2001).

Esse sistema compõe-se do coração, vasos sangüíneos (artérias, veias e capilares) e vasos linfáticos. Tomando-se como exemplo o organismo humano adulto, estima-se que os vasos sangüíneos integrem uma rede de aproximadamente 50 Km de tubos, o que implica em uma superfície

equivalente à 6.500 m². Dessa extensão, cerca de 90% corresponde a vasos sangüíneos de diâmetro capilar (Jones *et al.*, 2001).

Vasos sangüíneos são estruturas constituídas basicamente de uma monocamada de células endoteliais, as quais se interconectam para formar tubos que viabilizam o fluxo do sangue e a perfusão tecidual no organismo (Tobelem, 1990; Sweeney, 1998). No sistema de microcirculação sangüínea é possível distinguir três compartimentos: a superfície luminal do vaso, delimitada pelas células endoteliais, o interstício ou espaço extracelular da parede vascular e o espaço intracelular (Bergers & Benjamin, 2003).

As células endoteliais, comparadas às do sistema nervoso, ocupam o segundo lugar em longevidade; essas células, sob condições normais, proliferam muito lentamente. Estima-se que em um homem adulto, apenas 0,01% das células endoteliais encontra-se normalmente em divisão, uma condição estável, se comparada, por exemplo, aos 14% da taxa de mitoses do epitélio do intestino. Fisiologicamente, o *turnover* da célula endotelial é medido em anos, nos tecidos que não requerem periodicamente a formação de vasos (Hanahan & Folkman, 1996; Koch, 1998; Bergers & Benjamin, 2003).

1.2. Características dos processos de formação de vasos sangüíneos

A formação de vasos sangüíneos pode ocorrer a partir de diversos processos, como a vasculogênese e a angiogênese, nos quais estão envolvidos diferentes mecanismos celulares, como proliferação, migração e diferenciação (Risau, 1997).

A vasculogênese é um processo definido como o desenvolvimento de vasos sangüíneos a partir da diferenciação *in situ* de células mesodérmicas

progenitoras de células endoteliais (angioblastos e hemangioblastos). Estas células precursoras são recrutadas de áreas de mesoderma adjacentes ao embrião e/ou, originadas por divisão celular local, organizando ilhotas sangüíneas e estabelecendo um plexo vascular primordial (Ruiter *et al.*, 1992).

Durante a embriogênese inicial, a vascularização se processa por vasculogênese. Subseqüentemente, através da angiogênese, a rede de vasos primários sofre uma remodelagem, combinando eventos de morte e regressão vascular com a sobrevivência e ramificação de capilares a partir de vasos pré-existentes, os quais proliferam para viabilizar o crescimento do corpo (Folkman, 1971). No embrião, os dois processos de formação de vasos coexistem; por exemplo, o desenvolvimento do coração e dos grandes vasos ocorre por vasculogênese, enquanto órgãos que requerem invasão de vasos sangüíneos para o desenvolvimento (cérebro, pulmões e fígado) são supridos por angiogênese (Risau *et al.*, 1988).

Em uma visão ortodoxa, a vasculogênese está limitada à embriogênese inicial, não ocorrendo no adulto, enquanto a angiogênese ocorre em ambos os períodos. Entretanto, observações recentes indicam que essa distinção não é absoluta, visto que ambos os processos requerem proliferação e migração de células endoteliais, bem como a reorganização tridimensional (remodelagem) dos vasos recém formados (Para revisão ver: Ribatti *et al.*, 2001). Além disso, na concepção de que a vasculogênese não estaria restrita ao embrião, angioblastos podem ser incorporados aos vasos sangüíneos que se formam a partir da vascularização pré-existente, em adultos, tanto nas patologias vasculares, como em processos fisiológicos (Zammarettia & Zischa, 2005).

Os eventos teciduais, os quais se sobrepõem nos processos de vasculogênese e angiogênese, incluem a perda de adesão de células vizinhas, proteólise da matriz extracelular proximal migração e proliferação celular, formação de tubo vascular (tubulogênese) e deposição da membrana basal (D'Amore & Thompson, 1987; Tobelem, 1990; Gumbiner, 1996; Kalluri, 2003).

Segundo Risau *et al.*, (1988), ambos os processos são regulados de maneira distinta; entretanto, de acordo com Rafii *et al.* (2002), e Bergers & Benjamin (2003), fatores que estimulam a angiogênese, tais como VEGFA (*vascular endothelial growth factor-A*), PlGF (*placental growth factor*) e ANG1 (*angiopoietin-1*), são conhecidos também por estimular o processo de vasculogênese. A formação de capilares a partir de vasos pré-existentes (angiogênese) é usualmente desprezível após ter sido alcançada a fase adulta (Folkman, 1971; Folkman & Shing, 1992). Porém, esse processo continua desempenhando um papel fundamental em inúmeros processos fisiológicos, por exemplo, no ciclo reprodutivo feminino e na cicatrização, tanto de tecidos macios, como de osso (Folkman & Klagsbrun, 1987; Bergers & Benjamin, 2003).

A angiogênese é um processo estritamente regulado, que pode ser rapidamente estimulado ou inibido (Hanahan & Folkman, 1996). Durante a resposta angiogênica, as células endoteliais, normalmente não proliferativas, são ativadas (Folkman, 1995a).

O processo de angiogênese é regulado por diversos fatores ativadores angiogênicos, incluindo o bFGF (*fibroblast growth factor – basic*, ou, *type-2*), o VEGF-A (*vascular endothelial growth factor – type A*) – um membro de uma grande família de proteínas estruturalmente relacionadas – e a família dos

VEGFs (Fachinger *et al.*, 1999; Yancopoulos *et al.*, 2000). Esses fatores interagem com glicosaminoglicanas (GLG) e proteoglicanas, tais como HSPGs (*heparan sulfate proteoglycans*), presentes na matriz extracelular, na lâmina basal e em receptores de superfície celular, regulando o crescimento, a proliferação, a migração, a diferenciação e a sobrevivência das células endoteliais entre uma variedade de tipos celulares (Solimene *et al.*, 1999; Chipperfield *et al.*, 2002). Uma hipótese atual é que sulfatos de heparana de HSPG orientam a ligação de FGF a regiões de ligação específicas em receptores de FGF (FGFRs), formando complexos de ativação de alta afinidade (Nugent & Iozzo, 2000). Nesse contexto, é sugerido que polissacarídeos estruturalmente análogos poderiam ligar fatores de crescimento a regiões específicas de receptores competentes, modulando ou antagonizando as respostas ao formar complexos de maior afinidade do que aqueles endogenamente mediados por sulfato de heparana.

1.3. *Sinopse sobre os fatores envolvidos na regulação do processo de angiogênese fisiológica*

A manutenção do sistema vascular é baseada na coexistência de sinais angiogênicos (ativadores) e angiostáticos (inibidores) em um equilíbrio dinâmico de concentrações estritamente controladas (D'Amore & Thompson, 1987).

Devido à complexidade na regulação de suas funções, a célula endotelial poderia ser comparada a uma "megálópole" de mediadores e receptores de sinais anti e pró-angiogênicos. Os sinais angiogênicos incluem inúmeros ligantes de receptores relacionados à quinase de tirosina, tais como o bFGF, o

VEGF-A – membros de grandes famílias de proteínas estruturalmente relacionadas, o PDGF (*platelet derived growth factor*), o EGF (*epidermal growth factor*) e lipopolissacarídeos (LPS). Estes fatores exercem atividade sobre as células endoteliais, levando, por exemplo, à ativação de enzimas MMPs (matrix metalloproteinases) e de ativadores plasminógenos (Soeda *et al.*, 1992; Soeda *et al.*, 1997; Fachinger *et al.*, 1999; Yancopoulos *et al.*, 2000). Diversos fatores de crescimento angiogênicos interagem com glicosaminoglicanas e proteoglicanas presentes na matriz extracelular, tais como o HSPG (heparan sulfate proteoglycan), a maior classe de proteoglicanas associadas aos receptores, especialmente em membranas basais e na superfície das células (Nader *et al.*, 1987; Woltering *et al.*, 1991; Bard, 1994; Burg *et al.*, 1995, Ekblom, 1995; Kálmán *et al.*, 1995; Horwitz, 1997; Solimene *et al.*, 1999; Chipperfield *et al.*, 2002)

Entre os primeiros inibidores angiogênicos descritos, destacam-se a trombospondina-1 (TSP-1) – que modula a proliferação e a migração da célula endotelial (Hanahan & Folkman, 1996) e a interleucina 12 (IL 12) – inicialmente denominada *natural killer cell-stimulatory factor*, que, segundo Voest *et al.* (1995), inibiu cerca de 87 % da vascularização induzida em córnea de camundongos. Uma ampla lista de inibidores angiogênicos endógenos inclui também o TGF- α (*transforming growth factor- α*), radicais livres de oxigênio (Koch *et al.*, 1992), o PF-4 (*platelet factor-4*), estatinas como a angiostatina - um fragmento de plasminogênio (O'Reilly *et al.*, 1994) – além da endostatina, canstatina e tumstatina – fragmentos de colágenos com afinidade por integrinas (Para revisão ver: Kalluri, 2003).

Os moduladores angiogênicos podem ser subdivididos em categorias: moduladores de enzimas proteolíticas, moduladores de proliferação celular e moduladores de sobrevivência da célula endotelial (para revisão ver: Cristofanilli *et al.*, 2002). As células endoteliais interagem em seu microambiente, através da transdução de sinais pró e anti - angiogênicos, a partir dos mediadores extracelulares e dos respectivos receptores e mediadores membranais e intracelulares (Melino, 2001). O desenvolvimento de vasos sanguíneos depende essencialmente das adesões focais – processos de adesão celular mediados por integrinas que possibilitam uma comunicação multidirecional entre a matriz extracelular e o citoesqueleto, (Geiger *et al.*, 2001).

Consoante ao microambiente dos vasos sanguíneos, o material presente na matriz extracelular consiste basicamente de grandes agregados de proteoglicana hidratada, intercalados em uma matriz de fibra de colágeno, predominantemente do tipo II. As proteoglicanas (mucopolissacarídeos) são moléculas constituídas de uma ou mais cadeias laterais de glicosaminoglicanas (GAGs) ligadas covalentemente ao núcleo protéico, formando uma estrutura semelhante a uma escova (**Figura 1**).

A estrutura molecular das GAGs (a exemplo do sulfato de condroitina e do ácido hialurônico) resulta de combinações de polissacarídeos, compostos de unidades repetidas de dissacarídeos, que contêm resíduos de açúcar aminoacilados (tais como a N-acetilglucosamina) e um resíduo ácido (a exemplo do ácido glucurônico). Na maioria das GAGs, esses açúcares são sulfatados, aumentando o seu caráter aniônico (Lehninger, 1988; Hua *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2002).

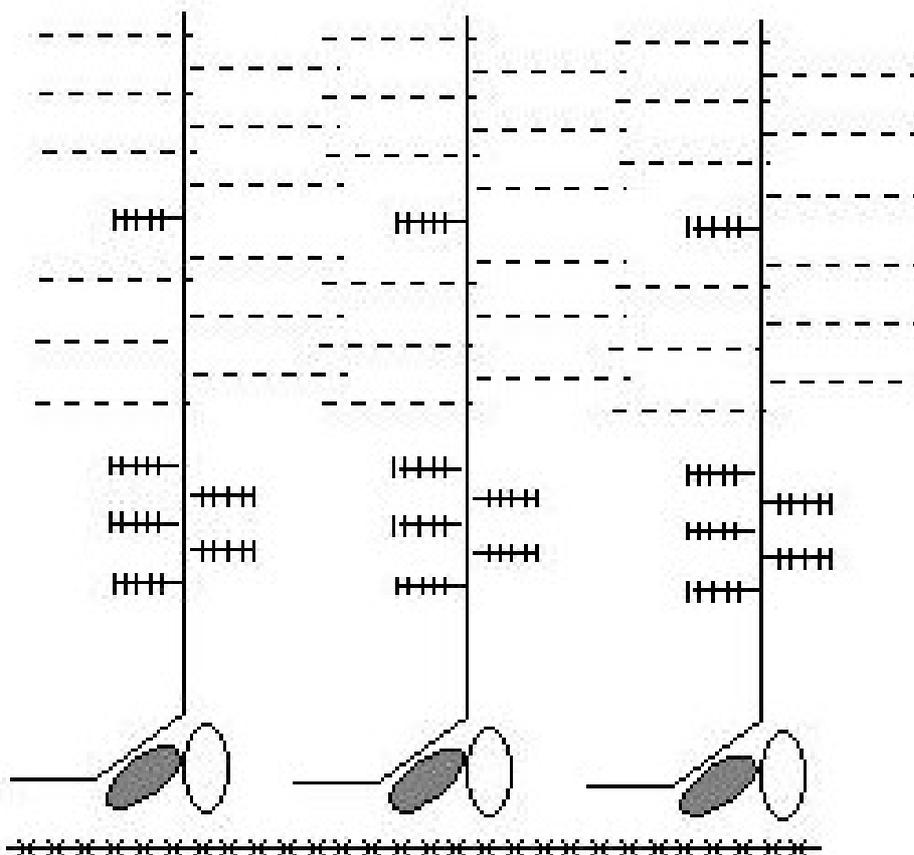


Figura 1 - Modelo estrutural de um complexo de proteoglicanas: (—) núcleo protéico; (.....) sulfato de condroitina; (|||) sulfato de keratana; (-xxx-) ácido hialurônico; (○) proteínas de ligação (adaptado de Gorin *et al.*, 1981).

As moléculas de hialuranas (HA; ácido hialurônico) são as únicas entre as GAGs, que não contêm grupamento sulfato e não estão ligadas covalentemente a proteínas. GAGs são moléculas carregadas negativamente, que geram grande pressão osmótica, e sua conformação molecular produz uma matriz resistente à compressão que permite a difusão de solutos através de um meio líquido. A proporção entre os diversos tipos de GAGs varia conforme o tipo de tecido animal. Moléculas como o sulfato de condroitina, o sulfato de queratana e a HA, possuem peso molecular da ordem de 20-50 kDa, 5-20 kDa

e de até 6 milhões de Daltons, respectivamente (Collins & Ferrier, 1996; Katzung, 1998; Tannocka *et al.*, 2002).

Muitas das propriedades funcionais das proteoglicanas de sulfato de heparana (HSPG) na matriz extracelular devem-se a interações entre cadeias laterais de sulfato de heparana (HS) e a uma diversidade de proteínas. Estas incluem enzimas metaloproteinases de matriz extracelular (MMPs), seus inibidores, fatores de crescimento e outras citocinas (Van den Born *et al.*, 1995; Berry *et al.*, 2001).

Cornelius *et al.*, (1995) demonstraram, com base em vários estudos, que a indução de MMPs vinculada ao bloqueio de seus inibidores teciduais – TIMPs (*tissue inhibitors of metalloproteinases*) e a redução na expressão de integrinas, desencadeiam a atividade proteolítica na matriz extracelular. Isto permite que as células endoteliais migrem de forma eficiente através do tecido conjuntivo, um evento essencial nos estágios iniciais da angiogênese. Logo, em seu estágio final, em que há a formação de vasos funcionais, ocorre deposição e estabilização da matriz extracelular endotelial, acompanhada de uma redução na expressão das MMPs, concomitante à indução dos respectivos TIMPs.

No transcorrer do processo de angiogênese, as células endoteliais migram em uma direção determinada à formação de um novo vaso, agrupam-se em uma estrutura tubular para formar um lúmen e diferenciam-se, adequando a forma e aderindo firmemente umas às outras (tubulogênese). A continuidade da proliferação celular na parede vascular permite a ampliação do diâmetro do vaso sanguíneo. Assim, a estabilidade dos vasos sanguíneos está normalmente condicionada à redução da atividade proliferativa das células endoteliais, em decorrência do recrutamento para a parede do vaso e da

adesão de células periendothelias ou perivasculares de suporte, derivadas do músculo liso. A estabilidade é complementada com a organização de uma lâmina basal e com o restabelecimento dos contatos com a matriz extracelular recém reconstituída (Lockshin e Zakeri, 2001).

Na ausência de contatos com células perivasculares e com a matriz extracelular, os vasos sangüíneos tornam-se susceptíveis à regressão, o que consiste em uma forma de apoptose (*anoikis* – indução de morte celular, em razão da perda de adesão celular ao suporte na matriz extracelular). Na perspectiva de que a estabilidade dos vasos sangüíneos seja mantida às expensas de sinais voltados não só à sobrevivência, mas também à morte das células endoteliais, estas devem estar constantemente aptas a resistir a inúmeros sinais de apoptose por *anoikis* (Melino, 2001). Paradoxalmente, durante a remodelagem vascular – transição entre os processos de vasculogênese e angiogênese – a perda da adesão celular constitui evento imprescindível para a formação de vasos secundários (*sprouting*), pois permite o acesso dos fatores de crescimento angiogênicos, à superfície das células endoteliais (Para revisão ver: Yancopoulos *et al.*, 2000).

A atividade angiogênica depende, em grande parte, da disponibilidade de VEGF, que deve ser resgatado da matriz extracelular por ação de metaloproteinases, como a MMP-9 (Soeda *et al.*, 1993; Soeda *et al.*, 2000; Egeblad & Werb, 2002). Portanto, a disponibilidade de VEGF deve ser criteriosa, uma vez que, em presença desse fator, os vasos recapitulam a atividade angiogênica em taxa similar à do desenvolvimento embrionário e, na ausência de VEGF, as células destituídas de adesão entram em apoptose, e os

vasos conseqüentemente regridem. A inibição ou a perda de atividade do VEGF induz apoptose (Bergers *et al.*, 1998).

O VEGF foi denominado inicialmente fator de permeabilidade vascular ou vasculotropina e até recentemente era considerado o único fator específico para a formação de vasos sangüíneos. Porém, novos fatores angiogênicos vêm sendo identificados, incluindo cinco membros da família VEGF – VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E e PLGF (fator de crescimento placentário); quatro membros da família das angiopoietinas (Ang - 1, 2, 3 e 4) e, ainda, três membros da família das efrinas (Eph - A1, B1 e B2). (Para revisão ver: Yancopoulos, 2000). A sinalização de efrina-B2 e de efrina-B4 está envolvida na diferenciação de artérias e veias, respectivamente (Witzenbichler *et al.*, 1998; Thurston & Yancopoulos, 2001).

Os receptores de VEGFs – designados atualmente como VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR ou Flk-1) e VEGFR-3 (Flt-4) – e os de Angs (Tie1, Tie2, Tie3 e Tie4), estão relacionados à atividade da enzima tirosina quinase, uma classe que forma dímeros em resposta à ligação dos sinais angiogênicos. Os quatro subtipos de Angs ligam-se primariamente ao receptor Tie2, permanecendo sem identificação qualquer molécula ligante para Tie1. Os ligantes Ang1 e Ang4 são agonistas do receptor Tie2, enquanto ang2 e ang3 comportam-se como seus antagonistas competitivos (Gale & Yancopoulos, 1999). Estudos realizados em embriões de rato demonstram que falhas na ligação da Ang1 com o receptor Tie2 ocasionam anomalias na associação das células endoteliais com as células periendothelias de suporte, sendo que esses embriões morrem entre o 9^o e o 13^o dias do período embrionário, como

conseqüência da perda de estabilidade do plexo vascular primário. Os animais acima também apresentam graves anomalias cardíacas (Miquerol *et al.*, 2000).

O receptor VEGFR-2 parece mediar a maior parte das respostas angiogênicas do VEGF-A – inicialização da tubulogênese, sobrevivência, alongamento e permeabilidade de vasos sangüíneos – enquanto o VEGFR-1 exerceria uma ação antagonista, ligando-se ao VEGF-A sem efetivar qualquer resposta positiva sobre a vascularização (Manolopoulos *et al.*, 2000). Segundo Koolwijck *et al.* (1996), a tubulogênese – que despende no mínimo, um período de 6 a 8 horas – requer conjuntamente envolvimento de VEGF-A, bFGF e TGF- α .

A despeito de ser uma molécula inespecífica em relação ao endotélio, o bFGF (18 KDa) é capaz de induzir, em nanogramas, a angiogênese *in vivo*. A HSPG pode atuar na matriz extracelular como um "reservatório" para fatores de crescimento ligantes de heparina (HBGF), como o bFGF, o qual possui uma cinética rápida e reversível. Além da proliferação da célula endotelial, o bFGF promove a migração celular, ao elevar a produção de moléculas de ativador plasminógeno tecidual, tais como t-PA e u-PA, que podem converter pro-colagenases em colagenases ativas, através da conversão de plasminogênio em plasmina. Esta enzima, por si só, pode degradar diversos componentes de matriz extracelular, como a fibronectina e a laminina, liberando o bFGF e outros fatores angiogênicos ligados a uma massa parcialmente degradada de HSPG, de alto peso molecular (Tobelem, 1990; Soeda *et al.*, 1997; Soeda *et al.*, 2000).

A densidade de HSPG na matriz determina a taxa de transporte do bFGF e as células competem pelo fator, ao ser liberado da matriz, com base na densidade de sítios de ligação de complexos formados pelo respectivo receptor

(FGFr) e HSPGs na superfície celular (Olden *et al.*, 1978; Gumbiner, 1996; Fleming *et al.*, 1997; Katz & Yamada, 1997). As associações entre HSPGs e as células podem existir tanto como moléculas de HSPGs intercaladas na membrana (sindecana e glipicana) como HSPGs ligadas firmemente à matriz (perlecana e agrina) (**Figura 2**).

A intensidade da resposta celular pode depender da habilidade de se formarem complexos entre o receptor de bFGF (FGFr) e HSPGs binários ou terciários; estes últimos, de alta afinidade e menor constante de dissociação (Nugent & Iozzo, 2000).

A ligação do bFGF ao FGFr resulta em autofosforilação de resíduos de tirosina e dimerização desse receptor, o que desencadeia uma seqüência de reações de fosforilação, que ativa diversas vias de transdução. Como exemplo, a via da fosfolipase C γ (PLC γ) resulta na hidrólise de fosfatidilinositol em IP₃ (*inositol trifosfato*) e diacilglicerol (DAG), levando à liberação de íons cálcio e à ativação da proteína quinase C (PKC). A fosforilação de outras proteínas, como a FRS-2 (FGFR1 substrate-2) leva a uma cascata de recrutamento e à ativação de MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*), cujo sinal finalmente transloca-se para o núcleo, ativando por fosforilação fatores de transcrição como *jun* e *fos*. Alternativamente, o bFGF poderia translocar-se para os ambientes citoplasmático e nuclear (Tobolem, 1990; Grumet, *et al.*, 1993; Hanahan & Folkman, 1996). No núcleo, a ativação mediada por MAPKs pode, por exemplo, aumentar a estabilidade do mRNA e, por estímulo via PKC, a transcrição de enzimas ciclooxigenases (COX), como a COX-2 (Subbaramaiah *et al.*, 1996, 2002).

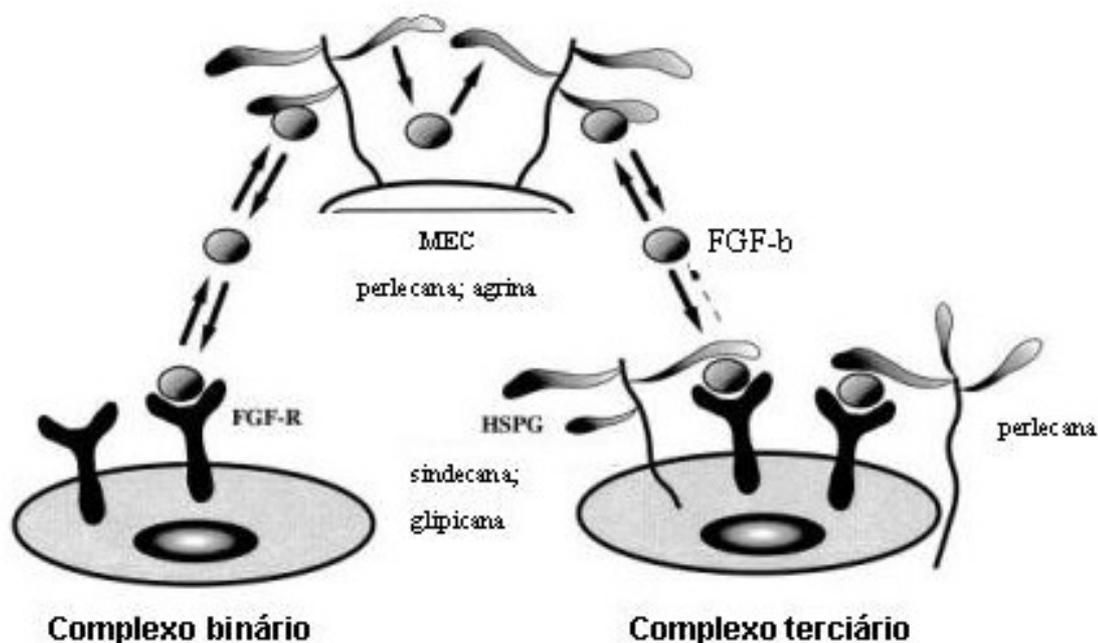


Figura 2 - Modelo de regulação do bFGF. HSPGs de matriz extracelular ligam-se rapidamente ao bFGF, com cinética reversível, mantendo um importante estoque dessas moléculas em estado ativo. A densidade de HSPGs na matriz determinará as taxas de liberação e de transporte de bFGF. A natureza protéica do núcleo das proteoglicanas (PGs), bem como a estrutura do sulfato de heparana (HS), podem desencadear respostas celulares qualitativamente diferentes. As funções exatas dessas PGs específicas não são conhecidas e, provavelmente, não são restritas àquelas descritas no esquema (adaptado de Nugent & Iozzo, 2000).

Foi relatada a inibição da angiogênese, por ação de bloqueadores de canais aniônicos de cloro regulados por volume (Manolopoulos *et al.*, 2000) e a proliferação de células endoteliais *in vitro*, em razão da ativação de canais de cálcio. Nesta via estão envolvidas tanto a PLC γ como a PLA $_2$ (*phospholipase A $_2$*), com a conseqüente formação de eicosanóides a partir do ácido araquidônico (AA) (Fafeur *et al.*, 1991; Friesel & Maciag, 1995).

Evidências mostram que a angiogênese, tanto no âmbito do crescimento de vasos como da respectiva sobrevivência, depende fundamentalmente de eventos de adesão na célula endotelial (Ingber *et al.*, 1990). A adesão celular

envolve a participação de moléculas como caderinas, integrinas e selectinas (Wagener & Ergün, 2000). As caderinas vasculares endoteliais, localizadas em junções aderentes, constituem uma barreira entre células endoteliais vizinhas, mediada por interações dependentes de cálcio e estão conectadas a um conjunto de proteínas ligadas ao citoesqueleto, como cateninas, α -actinina e vinculina (Horwitz, 1997). As integrinas são proteínas diméricas que transpassam a membrana, emergindo na superfície celular, onde atuam em contatos célula-célula. Tais contatos envolvem interações com a matriz extracelular e/ou com a lâmina basal (malha de colágeno-tipo IV), além de glicoproteínas e proteoglicanas (Katz & Yamada, 1997). CD44 é uma glicoproteína transmembrana (80 – 250 KDa) que normalmente associa o citoesqueleto de actina às hialuranas (Kalomiris & Bourguignon, 1989; Tolg *et al.*, 1993; Lokeshwar *et al.*, 1994). Essa associação ao citoesqueleto é regulada pela atividade intrínseca do CD44, da hidrólise de GTP (Tsukita *et al.*, 1994). Além de mediar a adesão célula-célula, a molécula de CD44 desempenha diversas funções, entre as quais, captação e degradação intracelular de hialuranas, migração e transporte celular e transmissão de sinais que mediam a hematopoiese e a apoptose (Naot *et al.*, 1997; Hamada *et al.*, 1998; Aplin *et al.*, 1998).

Trabalhos reportam que um antagonista de integrinas $\alpha_v\beta_3$ (receptor da vitronectina), o anticorpo LM609 (Drake *et al.*, 1995), inibiu a vascularização embrionária, demonstrando que integrinas $\alpha_v\beta_3$ exercem uma função relevante tanto na vasculogênese como na angiogênese (Brooks *et al.*, 1994; Short *et al.*, 1998; Hood & Cheresh, 2002).

As ligações entre as integrinas e a matriz extracelular, ou a lâmina basal, levam à ativação de moléculas de FAK (*focal adhesion kinases*). Estas proteínas quinases, localizadas no meio intracelular, nas proximidades da membrana, compõem a estrutura interna da estrutura de adesão ao substrato (Koch, 1998). A ativação de FAKs, ou PKB (*protein kinase B*), resulta no recrutamento de outras quinases, como as quinases de tirosina citoplasmáticas (SRC), que sinergisticamente fosforilam outros sítios da FAK. Essa ativação recíproca, entre moléculas de FAK e de SRC, possibilita o recrutamento de outras moléculas relacionadas à função de adesão celular, tais como Sos, PI-3-K (*phosphatidylinositol-3-hydroxi kinase*), CAS e paxilinas. Esse novo conjunto de moléculas passa a integrar o complexo de adesão focal, otimizando o estímulo de sobrevivência da célula endotelial por meio de incrementos à ativação de moléculas de Akt, inibindo proteínas pró-apoptóticas como caspase-9 e Bad, envolvidas em mecanismos de morte celular (Carmeliet *et al.*, 1999).

A ativação dos receptores VEGFR-2 e Tie2 desencadeia a fosforilação e a ativação das subunidades p85, associadas à quinase lipídica PI-3-K, promovendo por parte de Akt, a inibição do processo de proliferação celular e uma resposta otimizada de sobrevivência da célula endotelial. Akt estimula a atividade da enzima eNOS (*endothelial-nitric oxide synthase*) e o aumento na produção do NO (*nitric oxide*) pode levar à ativação de proteínas relacionadas à sobrevivência da célula endotelial, a exemplo da survivina. Outro aspecto importante da atuação do NO é que este agente participa da inativação de caspase-9, promovendo, assim, a sobrevivência da célula endotelial (Blume-Jensen & Hunter, 2001).

O NO desempenha um papel importante também na modulação da angiogênese (Leibovich *et al.*, 1994). Segundo Ziche *et al.* (1994), a exposição a substâncias doadoras de NO, como o SNP (sodium nitroprussiate), produziu um aumento dose-dependente na migração de células endoteliais derivadas da artéria coronária.

Durante os eventos de migração celular, além de PI-3-K, FAK e Akt, outras proteínas (*docking proteins*) exercem atividade no bloqueio à proliferação celular e na manutenção da sobrevivência. Moléculas como Dok-R, Nck e Grb-14, recrutadas através da ativação do receptor Tie2, estão implicadas na transdução de sinais para as proteínas contráteis do citoesqueleto. Atuando de modo integrado, estas moléculas reforçam a atividade anti-apoptótica da Akt e racionalizam o consumo de energia da célula ao bloquearem as mitoses, a partir do bloqueio de cascatas de reação, envolvendo as MAPKs (Jones & Dumont, 1999).

Alguns aspectos da regulação do processo de angiogênese são revelados através da atividade de moléculas fosfatases e de fatores físicos, como a hipóxia (Blagosklonny, 2004). Uma classe de receptores com atividade fosfatase, específica de célula endotelial, é capaz de modular negativamente a atividade de alguns receptores angiogênicos, como o VEGFR-2 e o Tie2. A fosfatase denominada VE-PTP (*vascular endothelial-protein tyrosine phosphatase*) é capaz de associar-se tanto à Tie2 como à Ang1, exibindo em relação a ambos os receptores, igual nível de afinidade. Deste modo, tem sido proposto que as angiopoietinas poderiam ligar-se simultaneamente à Tie2 e VE-PTP, promovendo a formação de heterodímeros – compostos por esses dois receptores – atípicos e funcionalmente inativos (Fachinger *et al.*, 1999).

Desequilíbrios entre o suprimento de oxigênio e a demanda metabólica das células podem resultar em indução da angiogênese em diferentes tecidos. Privação de oxigênio (hipóxia) pode induzir, no sistema cardiovascular, a síntese de DNA (Agocha *et al.*, 1997) e, em alguns casos, aumentar a estabilidade do RNA mensageiro (Harris, 2002).

A atividade angiogênica induzida por hipóxia é desencadeada através da ativação de HIFs (*hypoxia-induced factors*), como HIF-1 e HIF-2. Em condições de hipóxia, o HIF-1 α é estabilizado e acumula-se no núcleo, onde dimeriza com o HIF-1 β e, desse modo, interage com diversos ativadores de transcrição, resultando na expressão de numerosos genes relacionados à angiogênese (Tian *et al.*, 1997).

As isoformas HIF-2 α e HIF-2 β também formam heterodímeros funcionais, que possibilitam a ativação de seqüências regulatórias de genes que respondem à hipóxia (Maltepe *et al.*, 1997; Peng *et al.*, 2000; Pugh & Ratcliffe, 2003).

1.4. Aspectos da vascularização no âmbito da patologia e da terapêutica antitumoral

1.4.1. A angiogênese fisiopatológica relacionada ao câncer

Câncer (do grego *karkinos* – caranguejo) é um termo que descreve um conjunto de mais de uma centena de doenças, que apresentam em comum a proliferação desordenada de células e a incapacidade de diferenciação celular normal. A diversidade de processos tumorais designados genericamente como câncer – a segunda maior causa de mortes em todo o mundo, sendo a primeira,

as doenças cardiovasculares – tem origem multifatorial, na qual interagem a predisposição genética e o ambiente, incluindo a dieta (Reddy *et al.*, 2003).

A progressão tumoral é o processo pelo qual as células adquirem características de malignidade, como crescimento progressivo, invasão e formação de metástases (Nowell, 1986). Para disseminar e colonizar novos órgãos, as células tumorais acessam o sistema linfático, ou arterial, podendo então extravasar e invadir o tecido conjuntivo. Estes eventos envolvem os mecanismos de adesão, espraiamento e migração celular (Aplin *et al.*, 1998).

O papel da angiogênese na biologia do câncer foi descrito inicialmente por Folkman (1971), que postulou e descreveu o fenômeno da dormência do tumor, na ausência de vascularização. Quando descontrolado, o processo de angiogênese torna-se crítico para o crescimento de tumores sólidos e formação de metástases. Um tumor, geralmente, não pode crescer mais do que uns poucos milímetros, a menos que o desenvolvimento de um novo suprimento de vasos sanguíneos seja induzido, de modo a invadir e vascularizar a massa tumoral. (Kandel *et al.*, 1991; Carmeliet & Jain, 2000; Bergers & Benjamin, 2003). A angiogênese fisiopatológica (neovascularização) também é característica em diversas doenças desprovidas de malignidade, mas que implicam em algum nível de incapacitação, incluindo a artrite reumatóide, a endometriose, a psoríase e retinopatias proliferativas (Folkman & Klagsbrun, 1987; Folkman, 1995b; Koch, 1998, Jones *et al.*, 2001).

Além disso, a virtual possibilidade apresentada por todos os tumores malignos, de crescerem e formarem metástases resulta de sua capacidade de produzirem substâncias que induzam angiogênese. Este evento, referido como *angiogenesis switch*, constitui uma etapa adicional às modificações genéticas e

epigenéticas que ocorrem durante a transformação de uma célula normal em tumoral (Nguyen *et al.*, 1994; Hanahan & Folkman, 1996; Koch, 1998; Carmeliet & Jain, 2000). Como um exemplo, as proteínas NOTCH4 – indutores embrionários de diferenciação de células endoteliais – são expressas em quantidade significativa em células de melanoma, onde participam do processo de formação de vasos de tumor (neovascularização) (Uyttendaele *et al.*, 2001). Portanto, propriedades biológicas de vasos que são relevantes na embriogênese, também o são para o crescimento de tumores (Hanahan & Folkman, 1996; Hendrix *et al.*, 2003).

1.4.2. *Características gerais dos tumores de melanoma*

O melanoma é um tumor maligno com grande propensão à formação de metástases, sendo bastante refratário às terapias antitumorais atualmente utilizadas. Esse tipo de câncer é predominante em adultos jovens e está relacionado à exposição às radiações, com aumento de sua frequência em função das tempestades solares (Ferrier *et al.*, 1998). Embora só represente 4% dos cânceres de pele, o melanoma é considerado o mais virulento em razão da acentuada invasibilidade e capacidade metastática. No Brasil, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), em 2002 foram registrados 3.050 casos de melanoma, dos quais 1.085 evoluíram para o óbito.

Como resultado da transformação de melanócitos e do desenvolvimento do processo tumoral, as células de melanoma da epiderme atravessam a membrana basal, invadem a derme e formam pequenos agregados celulares. Quando esses micronódulos de células tumorais crescem em espessura, o melanoma pode invadir vasos linfáticos e sangüíneos, originando metástases

em diversas regiões, primariamente localizados em linfonodos e em seguida, mais freqüentemente, nos pulmões e no cérebro (Ferrier *et al.*, 1998).

Diversas etapas do desenvolvimento do tumor envolvem eventos de migração das células de melanoma através da matriz extracelular e da membrana basal dos vasos. Esses eventos são dependentes tanto de mecanismos de adesão celular, quanto de degradação de componentes estruturais dos tecidos, em que são requeridos membros de quatro famílias de proteinases, a exemplo das catepsinas B e L, aspartato-proteinases (catepsina D), serino-proteinases (plasmina, uPA e tPA) e metaloproteinases de matriz (MMP-2, MMP-3, MMP-7 e MMP-9). Estas enzimas podem atuar diretamente, através da degradação de componentes da matriz extracelular, ou indiretamente pela ativação de outras proteinases (Hazen *et al.*, 2000; Sever *et al.*, 2002). A expressão de moléculas sistemo-proteinases é significativamente induzida em melanomas, principalmente nas frentes de invasão tumoral, sendo considerado um fator indicativo da existência de metástases (Goldmann *et al.*, 1999). Além disso, um aumento da atividade enzimática de catepsina B e sua associação à membrana plasmática, foram aspectos correlacionados ao nível de atividade metastática no melanoma B16 (Sloane *et al.*, 1986).

1.4.3. Aplicações do controle da angiogênese na terapêutica antitumoral

Um banco de dados reunido nas últimas três décadas documenta que as investigações sobre os mecanismos envolvidos na angiogênese patológica converteram-se em uma abordagem potencialmente importante na terapia do câncer (Fidler, 1973, 2003; Gagliardi & Collins, 1993; Jain, 1994; Hanahan & Folkman, 1996; Paper *et al.*, 1997; Solimene, *et al.*, 1999).

A busca por diretrizes voltadas ao aprimoramento de terapias não convencionais passa pelo entendimento das diferenças em relação aos mecanismos de angiogênese fisiológica e tumoral (Reddy *et al.*, 2003).

Ao mesmo tempo, a concepção de que a densidade de vasos em um tumor é um indicador absoluto de sua dependência de angiogênese e da capacidade invasiva é uma concepção errônea, revisada em detalhe por Hlatky e Folkman (2002). Esses autores mostraram que tumores requerem geralmente menos oxigênio e metabólitos que o tecido em que eles estão crescendo. O câncer, reconhecidamente, não constitui uma única doença; assim, a heterogeneidade dos tumores também implica em uma diversidade de fenótipos de neovascularização.

Dependendo da natureza e do microambiente de um processo tumoral, a angiogênese pode ser induzida ou ativada (*switched*) em cada um dos diferentes estágios de progressão do tumor, ou mesmo, não ser ativada. Neste último caso, geralmente no início do crescimento tumoral, verifica-se apenas um compartilhamento de vasos sanguíneos normais (para revisão ver: Bergers & Benjamin, 2003).

Uma condição designada como recapitulação da vasculogênese – no conceito original, *vasculogenic mimicry* (Maniotis *et al.*, 1999) – tem sido associada ao processo de vascularização de alguns tipos de tumores, os quais dependem diretamente de vasos formados a partir do recrutamento de células precursoras endoteliais, que migram a partir da medula óssea (Rafii & Lyden, 2003). Entretanto, nesse caso, a percentagem de células indiferenciadas – células precursoras endoteliais – incorporadas aos vasos do tumor é geralmente baixa, o que vem dando suporte ao conceito de que a maior parte

da neovascularização de tumores parece ocorrer via angiogênese (Hendrix *et al.*, 2003).

Na angiogênese fisiológica, novos vasos sofrem maturação rápida e se tornam estáveis, enquanto nos tumores – descritos como ferimentos que jamais cicatrizam (Dvorak, 1986) – o crescimento de vasos sangüíneos é mantido constante, sem, contudo, alcançarem a estabilidade. Conseqüentemente, a vascularização do tumor desenvolve características únicas, sendo que os vasos são morfológicamente irregulares – dilatados e tortuosos – e repletos de segmentos necrosados. Outras características dessa modalidade de vascularização incluem a falta de definição em artérias, veias e capilares; a espessura reduzida das paredes dos vasos, o que os torna mal vedados e hemorrágicos, em parte, devido a uma superprodução de VEGF; a perda do contato íntimo entre as células periendothelias e o endotélio – gerando *déficit* de adesão entre as células endothelias.

Geralmente, células tumorais estão integradas à parede vascular e o fluxo sangüíneo é lento, oscilante, apresentando extravasamento de proteínas plasmáticas – uma fonte de matriz através da qual as células endothelias ativadas migram. Tais anomalias estruturais e funcionais, típicas de vasos de tumores, refletem a natureza patológica de sua indução, como resultado do descontrole na regulação dos fatores angiogênicos (Para revisão ver: Bergers & Benjamin, 2003).

Inúmeras linhagens de células tumorais expressam diversos fatores angiogênicos, a exemplo do bFGF, o qual pode vir a ser super expresso e secretado de forma seletiva (Bergers *et al.*, 1998; Gagliardi & Collins, 1993; Mundhenke *et al.*, 2002). Embora o bFGF tenha sido descrito inicialmente, o

VEGFA é considerado mais representativo na neovascularização (Ferrara *et al.*, 2003).

Estudos baseados em abordagem genética (Liu *et al.*, 2001) revelam que camundongos fêmeas, geneticamente alterados para expressar COX-2 em concentrações elevadas nas glândulas mamárias, desenvolvem hiperplasia, displasia e tumores metastáticos. Estudos complementares demonstram que camundongos transgênicos, expressando elevadas concentrações de COX-2 na pele, desenvolvem hiperplasia e displasia epidermal (Neufang *et al.*, 2001). Em contraste, animais deficientes para a COX-2 apresentam redução no desenvolvimento de tumores intestinais e papilomas na pele (Oshima *et al.*, 1996; Tiano *et al.*, 2002).

Em adição à descoberta de que a COX-2 comumente tem sua expressão elevada em tumores malignos, há evidências consideráveis que relacionam a COX-2 ao desenvolvimento de vasos induzidos por células tumorais (Kakiuchi *et al.*, 2002). Tsujii *et al.* (1998) propuseram que as cicloxigenases regulam a angiogênese, induzida por carcinoma de cólon, por meio de dois mecanismos distintos; enquanto os eicosanóides produzidos pela COX-2 modulariam a produção de fatores angiogênicos nas células de câncer, os produtos da COX-1 regulariam a angiogênese diretamente nas células endoteliais.

Qualquer tecido requer um suprimento adequado de oxigênio; porém, o consumo de O₂ nas células tumorais é reduzido em relação às células normais. Os tumores estão aptos a adaptar seu metabolismo para sobreviverem sob condições de hipóxia – um fator angiogênico (Tian *et al.*, 1997) – através do incremento da glicólise, de modo a manter suficiente produção de ATP (*adenosine triphosphate*) (Semenza, 2002).

O descontrole na expressão do proto-oncogene c-myc (Myc) em conjunto com fatores anti-apoptóticos, como BCL2 e BCL-X_L, também resulta na formação de tumores angiogênicos invasivos, a exemplo dos que se desenvolvem em ilhotas pancreáticas. A proteína Ras concorre para a atividade Myc ao reprimir a expressão da TSP-1, aumentando a angiogênese no tumor (Williams & Smith, 1993).

É possível considerar que mais de 50% dos tipos de câncer humano estão relacionados a mutações na proteína p53, as quais podem afetar o equilíbrio dinâmico entre fatores angiogênicos e angiostáticos. Isto permite às células tumorais, tanto sobreviverem em condições de hipóxia, como otimizarem a resistência a apoptose, pois a p53-tipo selvagem inibe a transcrição de VEGF e promove ubiquitilação e degradação de HIF-1 α (para revisão ver: Bergers & Benjamin, 2003).

Por outro lado, as relações entre c-myc e p53, na regulação de TSP1 e de VEGFA são alvo de controvérsias, sendo que outros estudos relatam que a expressão de TSP-1 e de VEGF foi elevada e reduzida, respectivamente, em condição de hipóxia. Apesar da concentração normal de p53 e dependendo do tipo de estímulo angiogênico, proteínas Myc podem induzir tanto a proliferação, como a morte celular (Williams & Smith, 1993).

Ressaltando os aspectos prejudiciais de uma outra classe de moléculas endógenas, os hormônios possuem uma habilidade intrínseca de promoção de câncer. Essa atividade não resulta da iniciação das mudanças celulares que desencadeiam a doença, mas, do estímulo ao crescimento progressivo de tipos celulares que atingiram e ultrapassaram a primeira etapa no processo de proliferação descontrolada. A partir da ligação de estrogênios ao respectivo

receptor intracelular, complexos hormônio-receptor intranucleares podem ligar-se diretamente ao DNA, ativando genes envolvidos na divisão das células endoteliais (Davis & Bradlow, 1995).

Considerável atenção tem sido endereçada a uma classe de antagonistas parciais de estrogênios, designados como SERMs (*selective estrogen receptor modulators*), que podem atuar como estrogênios em determinados tecidos e bloquear sua ação em outros (Jordan, 1998). Segundo Carmeliet & Jain (2000), grande parte da pesquisa voltada à formação de vasos sangüíneos esteve focada na obtenção de novos compostos moduladores, a partir de metodologias voltadas à quantificação da angiogênese. Por exemplo, SERMs, como o clomifeno (Gagliardi & Collins, 1993), o nafoxidine, o tamoxifeno (Gagliardi *et al.*, 1996) e o raloxifeno (Jordan, 1998), inibiram a angiogênese *in vivo* de um modo dose-dependente. Gagliardi & Collins (1993) demonstraram que a ação antiangiogênica não foi alterada em presença do excesso (até cinco vezes) de 17 β -estradiol, indicando que a ação dos antiestrógenos não estava relacionada ao receptor de estrógenos, mas a uma inibição direta do crescimento das células endoteliais – estimulado por bFGF. Mais de trinta agentes têm sido submetidos a ensaios clínicos em pacientes com câncer, porém até o presente momento nenhuma terapia baseada exclusivamente na modulação angiogênica proporcionou benefício clínico que justificasse ser aprovado para tal indicação (Massimo *et al.*, 2002).

Tecnologias de análise por imagem têm sido incorporadas aos ensaios clínicos na avaliação de novos agentes antiangiogênicos (Jain *et al.*, 2002; Weissleder & Ntziachristos, 2003). Tais agentes têm demonstrado efetividade em concentrações não-tóxicas, mas suas características farmacodinâmicas e a

extensão dos benefícios clínicos, dependem da via e do cronograma de administração adotados (para revisão ver: Massimo *et al.*, 2002). Medicamentos angiostáticos incluem o Semaxanib (SU5416) – um inibidor de quinases de tirosina, que bloqueia a ligação do VEGF ao receptor Flk1 (VEGFR-2) – bloqueando a proliferação das células endoteliais *in vitro* e o crescimento do tumor *in vivo*; o Bay 12-9566 – um antagonista de estrogênios recentemente desenvolvido, o qual apresenta diversas vantagens terapêuticas em relação aos SERMs descritos acima; o Vitaxin – um anticorpo para integrinas $\alpha_v\beta_3$, que induz apoptose em células endoteliais recém-formadas; endostatina – um fragmento carboxi-terminal (20 KDa) de colágeno-tipo XVIII, com potente ação pró-apoptótica; carboxiamidotriazol (CAI) – um inibidor de receptores abertos por canais de cálcio, implicado na inibição da fosforilação de PLC γ e PLA $_2$ – fosfatases envolvidas tanto na migração de células tumorais como na proliferação de células endoteliais induzida por bFGF; Suramin – uma naftiluréia polisulfatada prescrita para narcolepsia (Gagliardi & Collins, 1992; Danesi *et al.*, 1993); Aspirina e Celecoxib – inibidores da COX-2 – que reduzem, respectivamente, a formação de vasos sangüíneos e o crescimento de tumores (Subbaramaiah & Dannenberg, 2003). A Talidomida (Celgene) – um agente antiangiogênico – mostrou-se efetiva em determinadas fases do tratamento dos tumores de rim, fígado, ovário, próstata, gliomas e melanomas, (Massimo *et al.*, 2002).

Em estudos clínicos, tornou-se evidente que a combinação de duas drogas pode superar os efeitos de cada uma delas isoladamente. Por exemplo, a co-administração de inibidores angiogênicos, como o TNP 470 (Takeda-Abbott Pharmaceuticals), o DC101 (ImClone Systems), o SU5416 (Sugen Inc.)

ou Batismastat (British Biotech Pharmaceuticals), com baixas concentrações de drogas citotóxicas, resulta na estabilização ou mesmo na regressão da doença, aliada à menor toxicidade que na quimioterapia realizada com altas doses. A combinação do SU5416 (um bloqueador de VEGFRs) com o SU6668 (ou Glivec - bloqueador de PDGFr, FGFr e também de VEGFR-2) induziu a regressão da estrutura vascular do tumor (para revisão ver: Bergers & Benjamin, 2003).

1.5. Modelos experimentais de avaliação da atividade antiangiogênica

Alguns estudos realizados *in vitro* abordam os processos de proliferação, migração e viabilidade celular, com o auxílio do transwell[®] – um aparato para ensaios de migração celular (Ziche *et al.*, 1994; Soeda *et al.*, 2000), e o matrigel[®] – um substrato de matriz extracelular derivada de membrana basal de tumor, utilizado em ensaios de tubulogênese (Kubota *et al.*, 1988; Baatout, 1997).

As estratégias clássicas *in vivo* incluem: microbolsas na córnea de coelhos (Horwitz, 1997); implantes subcutâneos de suportes para a formação de vasos, tais como o gel de colágeno – gelfoam[®], o gel de fibrina (Koolwijk *et al.*, 1996) ou o matrigel (Takaku *et al.*, 2001), em camundongos ou em coelhos; injeções nas membranas de ovos de galinha doméstica, entre as quais a câmara de ar da casca ou a vesícula vitelínica (Oppenheim *et al.*, 1973; Sneddon *et al.*, 1998) e o ensaio da membrana córioalantóica (CAM-assay) do embrião dessa última espécie.

No ensaio da membrana corioalantóica, as substâncias em estudo são geralmente adsorvidas em suportes de colágeno, metilcelulose, poliestireno, etc (Oppenheim *et al.*, 1982; Gagliardi & Collins, 1993; Dordunoo *et al.*, 1995; Iruela-Arispe *et al.*, 1995; Shibley & Pennington, 1998). A partir desse método, outros bioensaios para a quantificação dos vasos foram viabilizados, adaptados através da incorporação de timidina triciada na membrana corioalantóica (Nguyen *et al.*, 1994) e da determinação do fluxo sangüíneo na vesícula vitelínica (Gush *et al.*, 1990) ou da densidade total de vasos, com auxílio de *softwares* para a análise das imagens (Strick *et al.*, 1991).

No âmbito dos estudos de vascularização através dos ensaios de vesícula vitelínica e de membrana corioalantóica, a utilização de ovos de galinha fertilizados traz algumas vantagens aos laboratórios. A rotina de incubação em estufas é simples, econômica e oferece a possibilidade de manipulação de um número racional de unidades amostrais (Schoenwolf, 1994).

A fisiologia, a genética e a embriologia da galinha, espécie *Gallus domesticus*, está extensamente documentada. Cada embrião desenvolve-se em um ambiente próprio, livre de influência materna ou placentária, e o acesso aos vasos sangüíneos e ao embrião é facilitado, podendo os tratamentos ser realizados precocemente, com menos de 20 horas de incubação (Moury & Schoenwolf, 1995).

1.6. *Características da vascularização e da morfogênese de embriões de galinha*

Um crescente corpo de evidências estabelece relações funcionais entre princípios moduladores da formação de vasos sanguíneos e indutores endógenos da forma do corpo do embrião (Princivalle & Agostini, 2002; Aybar & Mayor, 2002).

No tecido vascular e em outros tipos de tecidos, moléculas de proteoglicanas e outros componentes de matriz extracelular ligam-se a múltiplas espécies de fatores de crescimento, como também a morfógenos, a exemplo do bFGF. Este peptídeo é um indutor de angiogênese bem conhecido, que está envolvido também na especificação dos limites do tubo neural durante etapa final da indução da crista neural. Esta estrutura acompanha o crescimento embrionário ao longo dos domínios cefálico - caudal (Dhoot *et al.*, 2001). Além disso, um morfógeno referido como NOTCH, tem sido estudado devido à sua habilidade de orientar a diferenciação de células endoteliais nas redes vasculares (Gridley, 2001).

No embrião de galinha, os primórdios da topografia e os diversos sistemas, estabelecem-se rapidamente (em menos de 96 horas de incubação), provendo também uma base razoável para estimativas de toxicidade e teratogenicidade, (Bupp Becker & Shibley, 1998). Nessa espécie, até o final do quarto dia de incubação (E4), estão presentes esboços das principais estruturas do embrião, o qual apresenta nesse período algumas características concernentes à espécie (Eyal-Giladi, 1991). Entre essas características, evidenciam-se as flexuras (flexões) e a rotação do tubo neural (Goodrum & Jacobson, 1981; Männer *et al.*, 1993; Männer, 1995), o desenvolvimento de

somitoss (Christ & Ordahl, 1995), de arcos branquiais, do botão caudal (Schoenwolf, 1994; Catala *et al.*, 1995), da vesícula óptica, dos membros, da vesícula vitelínica e do alantóide, bem como a vascularização intra e extra-embrionárias (Meier & Jacobson, 1982).

O aparecimento de determinadas estruturas, como as referidas acima, em um tempo pré-estabelecido foi o critério utilizado pelos pesquisadores Hamburger & Hamilton (1951) para a determinação dos 46 estádios do desenvolvimento de *Gallus domesticus*, correspondendo ao período de incubação de 21 dias, após o qual, ocorre a eclosão.

O primeiro indício da presença de vasos sangüíneos nos ovos de *G. domesticus* é observado após 24 horas de incubação (Eyal-Giladi, 1991). Na área vasculosa localizada nas bordas do blastodermo (camada germinativa, i.e, de desenvolvimento do embrião) são evidenciadas as ilhotas sangüíneas (**Figura 3**).

As ilhotas sangüíneas consistem em agregados de células endoteliais que têm origem na camada germinativa intermediária do embrião – o mesoderma extra-embrionário. Entre 26 e 29 horas de desenvolvimento (estádio 8), essas estruturas anastomosam-se e adquirem uma luz vascular, formando os primeiros vasos sangüíneos (Hamburger & Hamilton, 1951; Arey, 1974).

No período de 33 horas de incubação, estrutura-se uma rede vascular, limitada pelo vaso sino terminal. Esse plexo vascular, associado ao endoderma subjacente, envolve parcialmente o vitelo do ovo, organizando a vesícula vitelínica, em anexo ao embrião. Nesse anexo embrionário, as artérias e veias

onfalomesentéricas, originadas no coração, estabelecem uma circulação vitelínica (Patten, 1951; Houillon, 1972).

No período de 40 horas de incubação têm seqüência os movimentos de dobramento do coração e o processo de formação de novos vasos a partir das ilhotas sangüíneas. As células localizadas internamente formam os hemocitoblastos, dos quais derivam os tipos celulares das diferentes linhagens sangüíneas (Arey, 1974; Sweeney, 1998).

No decorrer do terceiro dia de incubação verifica-se o surgimento de outro componente da vascularização extraembrionária; os vasos alantóicos. O alantóide – um divertículo da parede ventral do intestino posterior – aumenta de volume a partir do 4º dia de incubação, devido à deposição de produtos da excreção, e interpõe-se entre dois anexos pré-existentes; o âmnio e o cório. A associação do mesoderma somático dos dois anexos com o mesoderma angiogênico do alantóide resulta na membrana córioalantóica. No 8º dia de incubação, a membrana córioalantóica consiste numa vesícula achatada, vascularizada, que recobre o embrião e o saco vitelínico (Huettner, 1949; Patten, 1951).

1.7. Atividades *antiangiogênica e antitumoral* – *potencial farmacológico de produtos naturais*

Ao longo da última década tem sido descrita a atividade farmacológica de uma diversidade de princípios ativos, provenientes de fontes naturais (Albano *et al.*, 1990; Ribeiro *et al.*, 1994; De Vries & Beant, 1995; Calixto *et al.*, 1997). No controle de doenças de difícil prognóstico como o câncer, terapias

convencionais normalmente causam efeitos colaterais indesejáveis, em razão da sua toxicidade e, geralmente, estendem por poucos anos a sobrevida dos pacientes (Sinaÿ, 1999; Reddy *et al.*, 2003).

Os produtos naturais vêm emergindo como promissores agentes moduladores da angiogênese. Evidências nas áreas pré-clínica e clínica, acerca do potencial terapêutico dos agentes angiostáticos naturais, em comparação às substâncias citotóxicas convencionais, têm motivado investigações intensivas por parte de diversos laboratórios (Gagliardi *et al.*, 1992; Leali *et al.*, 2001; Cristofanilli *et al.*, 2002; Matou *et al.*, 2002; Koyanagi *et al.*, 2003; Tan *et al.*, 2003).

A heparina – cujos efeitos inibitórios sobre o desenvolvimento embrionário inicial já foram descritos (Gordon-Thompson *et al.*, 1988) – apresentou um efeito dual, sendo capaz tanto de ativar como de inibir a angiogênese (Tobelem, 1990; Guimond *et al.*, 1993). O efeito inibitório da heparina está diretamente relacionado ao peso molecular ou à associação com compostos esteróides (Sinaÿ, 1999; Matou *et al.*, 2002).

Entre as diferentes modalidades de inibidores angiogênicos, de origens diversas, destacam-se, por exemplo, fatores derivados de cartilagem (Tobelem, 1990); de fungos – os derivados de fumagilinas AGM-1470 e TNP-470 e o ergosterol (Ingber *et al.*, 1990; Takaku, *et al.*, 2001); de metabólitos secundários de plantas – diterpenóides como o taxol (Dordunoo *et al.*, 1995; Nicolaou *et al.*, 1996); o fungicida clotrimazol (da Rocha e Silva, 1998); o sesquiterpeno resveratrol e o flavonóide quercetina – efetivos nas concentrações de 10 a 100 μM (Jang *et al.*, 1997; Frémont, 2000; Igura *et al.*, 2001; Tan *et al.*, 2003).

Estudos na área de Química de Carboidratos vêm enfocando mais diretamente a análise de polissacarídeos hidrocoloidais com aplicações comerciais já consolidadas, como o ágar e as carragenanas (Craigie, 1995). Entretanto, conjugados de macromoléculas de fontes variadas (heteropolissacarídeos como as glicosaminoglinas) têm demonstrado importante atividade biológica, uma vez que seus compostos são estruturalmente similares aos que integram a matriz extracelular de tecidos animais (Abdel-Fattah, 1974; Gilbert, 2000; Gumbiner, 1996). Paper *et al.* (1997) mostraram que um polissacarídeo sulfatado extraído de bactérias (*Arthrobacter sp.*), denominado tecogalan-sódio, foi capaz de inibir a angiogênese, sendo o mesmo efeito observado em nível variável a partir da administração de oligossacarídeos, polipeptídeos e de peptideoglicanas, extraídos de parede celular de uma espécie vegetal (*Rhodococcus sp.*; Nocardiaceae). Mais recentemente, foi relatada a atividade angiostática do polissacarídeo sulfatado K5, derivado de *Escherichia coli* (Leali *et al.*, 2001), e a inibição da formação de vasos sanguíneos, aliada à supressão do crescimento tumoral, pelo sulfato de acharana, uma nova glicosaminoglicana isolada de molusco da espécie *Achatina fulica* (Lee *et al.*, 2003).

A busca por atividade biológica de interesse em substâncias derivadas de algas e outros organismos marinhos tem sido intensificada em função da diversidade de estruturas químicas presentes (Mian & Percival, 1973; Nishino *et al.*, 1989, 1992; Albano *et al.*, 1990; Mayer *et al.*, 1993; König & Wright, 1995; Berlinck *et al.*, 1996). Moléculas de fucoidanas (com diferentes níveis de sulfatação; poli-L-Fucopirranose), extraídas de algas da espécie *Fucus vesiculosus*, revelaram diferentes tipos de atividade, tais como, anti-trombina,

anti-viral (anti-HIV) e anticoagulante (Nishino *et al.*, 1994; Trento *et al.*, 2001). Yamamoto *et al.*, (1982), registraram atividade supressora da formação do sarcoma-180, exercida por polissacarídeos sulfatados, isolados de duas espécies do gênero *Sargassum sp.* (Phaeophyceae), *S. kellmanianum* e *S. fulvellum*. Fucoïdanas isoladas de uma terceira espécie, *S. ringgoldianum*, apresentaram potente atividade inibitória sobre o fibrosarcoma de Meth e o carcinoma de Erlich (Noda *et al.*, (1989).

Um trabalho prévio situa *Sargassum stenophyllum* – uma alga marinha parda, com ampla distribuição geográfica – como fonte de polissacarídeos, cuja estrutura química revelou a biossíntese de dois grupos de fucoïdanas (Duarte *et al.*, 2001). A estrutura química dessas proteoglicanas assemelha-se a do sulfato de condroitina fucosilada, entre outros constituintes de matriz extracelular, que são polímeros endogenamente envolvidos na modulação da atividade angiogênica (Grumet, *et al.*, 1993).

Os diversos aspectos de bioatividade considerados acima, relacionados à estrutura química dos carboidratos isolados de diferentes espécies de algas marinhas, permitem supor que polissacarídeos análogos possam interferir na sinalização de processos de formação de vasos sangüíneos, modificando a resposta mediada pelas proteoglicanas. Nesse contexto, no presente trabalho, será investigada a atividade de polissacarídeos, extraídos de parede celular da alga parda *S. stenophyllum*, em processos de vasculogênese, angiogênese e desenvolvimento tumoral.

2. Objetivos

Os objetivos do presente estudo consistem em:

2.1. *Objetivo geral*

Investigar a possível ação moduladora de polissacarídeos obtidos de parede celular de algas marinhas da espécie *Sargassum stenophyllum* (Phaeophyceae) nos processos de formação de vasos sanguíneos e morfogênese embrionária, bem como na proliferação de células tumorais em modelos *in vivo* e *in vitro*, de acordo com os seguintes objetivos específicos:

2.2. *Objetivos específicos*

- 2.2.1. Caracterizar o perfil estrutural químico das frações polissacarídicas A (SargA) e B (SargB) extraídas de parede celular de *S. stenophyllum*;
- 2.2.2. Determinar a capacidade dos polissacarídeos SargA e SargB, isoladamente ou em associação com substâncias conhecidas, de inibirem a formação de vasos vitelinos primários de embriões de galinha (36 – 96 h de incubação), caracterizando *in vivo* e *in vitro* essa atividade sobre o processo de vasculogênese e sua possível influência na morfogênese embrionária;
- 2.2.3. Determinar a capacidade dos polissacarídeos, isoladamente ou em associação com substâncias conhecidas, de inibirem a formação de vasos sanguíneos na membrana corioalantóica de embriões de galinha (6 – 8 dias de incubação), bem como no processo de reparo tecidual em camundongos machos adultos (2 meses de idade), caracterizando *in vivo* a atividade inibitória sobre o processo de angiogênese;
- 2.2.4. Avaliar a atividade dos polissacarídeos SargA e SargB sobre células do melanoma murino B16F10, em estudos *in vitro* de proliferação, viabilidade, e migração celular;
- 2.2.5. Determinar a influência dos polissacarídeos administrados como monoterapia sobre a carcinogênese *in vivo* (induzida pela inoculação de células de melanoma da linhagem B16F10 em camundongos machos adultos).

3. Material e métodos

3.1. Animais

3.1.1. Ovos e embriões de galinha da espécie Gallus domesticus (Linnaeus, 1758)

Ovos de galinha da linhagem Ross, de tamanho padrão médio (aproximadamente 55 g), fertilizados e livres de patógenos específicos, foram fornecidos pela indústria do setor aviário de corte (Agrovêneto / Macedo Koerich; SC, Brasil) em um período de até 12h após a postura. No laboratório, esse material foi previamente estocado por 48h em câmara fria (19 - 20°C), até o início da incubação. Os embriões dessa espécie pesaram em média 0,042 g e 1,045 g nas idades de 4 e 8 dias de incubação dos ovos, respectivamente.

3.1.2. Camundongos da espécie Mus musculus

Camundongos adultos machos, da linhagem Swiss, com idade de 2 meses e pesando em média 35 g, provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas da UFSC, foram alojados em gaiolas plásticas, mantidos em ambiente com temperatura ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) e iluminação (ciclo claro/escuro de 12 h; luz entre 7 h e 19 h) controlados, recebendo dieta comercial e água, *ad libitum*.

Todos os estudos envolvendo a utilização de animais foram realizados de acordo com os procedimentos definidos no protocolo cadastrado sob os números 256/CEUA e 23080.028649/2003-07/ UFSC, da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSC - Florianópolis, SC.

3.2. Células tumorais

Foram utilizadas células do melanoma B16F10 – uma linhagem de melanoma espontâneo de camundongos C57BL/6 selecionadas por Fidler (1973) – obtidas junto ao Instituto Butantã (São Paulo, SP) mantidas pelo Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais, nas dependências do Departamento de Farmacologia – CCB / UFSC.

3.3. Materiais e reagentes

Brometo de dimetiltiazol-2-il-2,5-difenil-tetrazólio (MTT), Resveratrol (3,4',5-trihidroxiestilbeno), dimetilsulfóxido (DMSO), bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA), sulfato de dodecil sódio (SDS), Coomassie® brilliant blue G-250, piridina, água deuterada (D₂O), tetrametilsilano, 1-metilimidazol, fenil-β-D-galactopiranosídeo, corante de Giemsa, hematoxilina, eosina, azul de toluidina, trombina de bovino e albumina de soro bovino, adquiridos da Sigma Co.(St. Louis, MO, USA).

Outros materiais foram adquiridos como segue: metilcelulose (Aldrich, Milwaukee, WI, USA); hidrocortisona (Biobrás, Brasil); salina tamponada de fosfato (PBS; Purchase, NY, USA); heparina sódica (Lab. Cristália, Brasil); reagente de Drabkin (Biodiagnóstica, Brasil); tripsina–ácido etilenodiaminotetracético (tripsina-EDTA), penicilina–estreptomicina, meio de cultura de células Roosevelt Park Memorial Institute (RPMI) 1640, fator de crescimento de fibroblastos tipo básico (bFGF), L-glutamina e bicarbonato de sódio adquiridos de Gibco (Auckland, New Zealand); gelfoam® e sílica - G 60® (Pharmacia and Upjohn, Kalamazoo, MI, USA); bacto-agar® (Difco, USA); soro fetal bovino (FBS; Life Technologies, Grand Island, NY, USA); ácido clorídrico

(HCl), etanol (EtOH), metanol (MetOH), xileno, formaldeído, parafina sólida, brometo de potássio (KBr), nitroetano, ácido acético (AcOH), ácido trifluoroacético (TFA), ácido fosfórico, orcinol, tetraidridoborato de sódio (NaBH₄), brometo de potássio (KBr), hidróxido de potássio (KOH) e cloreto de sódio (NaCl) (Reagen, Brasil).

Soluções-estoque (50 mg/ml e 150 mg/ml) dos polissacarídeos (SargA e SargB) e de metilcelulose (11,25 mg/ml) foram mantidas a –20°C em alíquotas de 500 µl e diluídas para as concentrações de trabalho, no mesmo veículo anteriormente utilizado. Heparina e hidrocortisona foram dissolvidas e diluídas em água ultra-filtrada para a concentração desejada, imediatamente antes da utilização.

3.4. Métodos

3.4.1. *Isolamento e caracterização de polissacarídeos isolados de parede celular de Sargassum stenophyllum*

3.4.1.1. *Coleta*

A biomassa de alga parda da espécie *Sargassum stenophyllum* (Phaeophyceae) foi coletada na localidade de Praia de Armação do Itapocoroy (Município de Penha, Estado de Santa Catarina, Brasil), em janeiro de 2001. Aproximadamente 1000 g (peso fresco) foram pré-lavados para remoção da matéria residual e enxaguados sob água corrente. O excesso de água foi drenado, e os fragmentos de plantas e animais foram cuidadosamente removidos.

Os procedimentos relativos à extração e à análise química dos polissacarídeos foram conduzidos sob a orientação do Prof. Dr. Marcelo Maraschin, nas dependências do Laboratório de Bioquímica e Morfogênese Vegetal / Depto. de FIT / CCA e de Laboratórios associados.

3.4.1.2. *Extração de polissacarídeos*

Aproximadamente 800g (peso fresco) da biomassa de algas selecionada foram lavados consecutivamente com 3 volumes de água deionizada, secados (65°C) até a obtenção de um peso constante e estocados a -20°C.

Para a finalidade de isolamento de polissacarídeos de parede celular, a biomassa de alga (344 g; peso seco) foi tratada seqüencialmente com 3 volumes de tolueno e EtOH durante 3 dias cada. Após, a amostra foi filtrada, sendo que o sobrenadante foi evaporado (40°C) e o resíduo submetido à agitação por 12 h em 3 volumes de uma solução aquosa de SDS a 1,5 % (pH=5,0) e subseqüentemente centrifugado a 4°C (10.000 rpm/15 min). O citoplasma liberado no sobrenadante (ácidos nucléicos e proteínas) foi monitorado por espectrofotometria, a 260 e 280 nm, respectivamente. A parede celular residual, designada SDS-CW (*cell wall after detergent washing*), foi lavada com 3 volumes de água, tratada 3 vezes com DMSO a 90 % por 12 h sob agitação e centrifugada a 25°C (10.000 rpm/15 min). A extração de polissacarídeos de parede celular foi realizada por meio de KOH 4M, durante 12 h a 25°C em um agitador rotatório, com 10 mg de NaBH₄ adicionado ao meio (Selvendran *et al.*, 1985; Selvendran & O'Neill, 1987; Maraschin *et al.*, 2000). Após o tratamento, a suspensão foi centrifugada (10.000 rpm/15 min a

4°C), o sobrenadante foi coletado, tratado com AcOH (pH = 5,2) e centrifugado. Foi obtida uma fração de polissacarídeo A como precipitado e o sobrenadante foi tratado com um excesso de EtOH (aproximadamente 3 volumes), produzindo a fração de polissacarídeo B. O acetado de potássio residual foi removido através de diálise (peso molecular *cut-off*: 3000 Da) contra 10 volumes de água destilada, *overnight*, com subsequente liofilização e estocagem dos polissacarídeos a -20°C até o momento das análises. Os polissacarídeos obtidos de *Sargassum stenophyllum* (SargA e SargB), em pó, foram inicialmente diluídos a 15 g/100 ml com água deionizada e re-diluídos para as concentrações requeridas (Maraschin *et al.*, 2000).

3.4.1.3. Quantificação de proteínas

O conteúdo de proteínas dos polissacarídeos foi determinado através de dosagem de acordo com o método de Bradford (1976). Esse método possibilita a quantificação de microgramas de proteínas, utilizando o princípio da ligação dessas macromoléculas ao corante Coomassie Brilliant Blue G-250® (CBB G-250).

A reação de ligação da proteína ao corante converte sua coloração vermelha para azul, em aproximadamente 2 minutos, e o complexo formado persiste por cerca de 1 hora (Bradford, 1976). A quantidade total de proteínas nas amostras foi calculada a partir de uma amostra padrão de albumina de soro bovino em concentrações de 0,1 a 100 µg/0,1 ml, sendo os volumes das amostras completados para 100 µl em água. Na preparação do reagente de Bradford, o corante CBB foi dissolvido (0,01 % de CBB G250; 4,7 % de Et-OH e 8,5 % de ácido fosfórico), misturado aos outros reagentes e mantido sob agitação, no

escuro, por 12 h. Após, a solução de corante foi filtrada (em filtro de papel) e estocada no refrigerador, em frasco âmbar. Para a dosagem, foi adicionado um volume de 50 µl da amostra de proteína em 2,5 ml do reagente de proteínas em cada tubo, sendo o conteúdo de cada tubo homogeneizado por inversão e mantido ao abrigo da luz, em temperatura ambiente, por 10 min. A absorbância foi lida a 595 nm em espectrofotômetro (Shimadzu HIS, UV / visível), tendo sido utilizadas cubetas de quartzo e um ciclo de leituras de amostras em temperatura ambiente, no período de 10 - 20 minutos, com subtração automática de absorbância do controle. Foi adotada uma média de 3 medições, a qual foi dividida pelo valor obtido a partir de uma curva de calibração, tendo sido os valores plotados para obter a equação da reta ($y=a+bx$).

3.4.1.4. *Quantificação de ácidos urônicos*

A quantidade de ácidos urônicos dos polissacarídeos foi determinada através da eletroforese em papel, conforme protocolo descrito por Fontana *et al.*, (1988). As corridas eletroforéticas foram realizadas em suporte de papel de acetato de celulose (2.5 x 14 cm - Cellogel® Chemetron, Milan, Italy), conforme segue: tampão acetato de zinco (0,1 M; pH = 6,6), 200 V, 1 h. A detecção foi efetuada por coloração com solução aquosa de azul de toluidina a 0,5 %, e a análise colorimétrica seguiu o protocolo estabelecido por Blumenkrantz & Asboe-Hansen (1973), sendo o ácido D-glucurônico usado como padrão.

3.4.1.5. *Hidrólise química de polissacarídeos*

Amostras de 20 mg de polissacarídeos foram hidrolisadas com TFA 2M/100°C/6h, através da utilização de tubos Kimax® selados. As reações foram bloqueadas em banho-de-gelo (30 min) e o TFA foi evaporado *overnight* em frasco aberto, a 25 °C.

3.4.1.6. *Espectroscopia de infravermelho*

Espectros de infravermelho (IV) foram obtidos a partir da utilização de pastilhas de KBr sobre cada amostra de polissacarídeo em teste (3 mg, pesadas criteriosamente). As análises foram efetuadas utilizando-se um espectrofotômetro de IV (Bomem Michelson), operando com uma frequência de laser a $15.799,7\text{ cm}^{-1}$ considerando-se uma amplitude de frequência (*scanning*) de $4000\text{ a }400\text{ cm}^{-1}$. Os dados registrados foram analisados através do programa Win-Bomem (v. 3.01C).

3.4.1.7. *Cromatografia de camada delgada*

Análises cromatográficas em camada delgada de hidrolisados dos polissacarídeos foram realizadas em placas de alumínio cobertas com sílica G 60®, tendo como fase móvel 2-PrOH/Et-Oac/Nitroetano/AcOH/H₂O (45:25:10:1:19). A detecção preliminar dos monossacarídeos foi efetuada nebulizando-se uma solução de orcinol (0,55 %) em ácido sulfúrico, seguido do aquecimento da placa.

3.4.1.8. Ressonância magnética nuclear de Carbono-13

Espectros de ressonância magnética nuclear de isótopo 13 do átomo de carbono (RMN – ^{13}C) foram obtidos a partir de amostras de polissacarídeos (50 mg) extraídas com KOH 4M e derivatizadas em D_2O , sob agitação por 12 h. O material foi centrifugado (10 Krpm / 5 min) e o sobrenadante foi coletado e liofilizado. A fração solúvel obtida foi re-suspensa em 700 μl de D_2O , centrifugada (10 Krpm / 5 min), e uma alíquota de 500 μl foi transferida para um tubo de 5 mm de diâmetro interno. A fração insolúvel foi re-suspensa em dimetilsulfóxido-deuterado (DMSO-*d*4) e transferida para um tubo com 10 mm de diâmetro interno.

Os experimentos foram conduzidos em equipamento Bruker DRX400, operando em frequência de 400 MHz, *overnight*. Todos os espectros foram obtidos a 28°C, usando-se tetrametil-silano como referência interna. Uma função de multiplicação exponencial, com amplitude de linha igual a 1 para a fração solúvel em D_2O e 15 para a fração solúvel em DMSO-*d*4 foi aplicada ao FID, previamente à transformação de Fourier.

3.4.2. Estudo da atividade inibitória sobre a formação de vasos sanguíneos

3.4.2.1. Ensaio de vasculogênese na vesícula vitelínica do embrião de galinha

Para avaliar a capacidade inibitória dos polissacarídeos sobre a vasculogênese, foi realizado inicialmente o ensaio da vesícula vitelínica do embrião de galinha. Este método foi adaptado do ensaio da membrana corioalantóica (CAM - assay), o qual vem sendo amplamente utilizado para avaliar angiogênese (Jakob *et al.*, 1978; McCormick *et al.*, 1984; Crum *et al.*, 1985; Vu *et al.*, 1985; Peek *et al.*, 1988; Nguyen *et al.*, 1994).

Ovos de galinha foram preliminarmente mantidos em estufa incubadora (Gera-Petersime) equipada com ventilação forçada, controle digitalizado de umidade (33 %) e temperatura (37,5°C), por um período de 36h ou 48h, conforme o método de cultura de embriões, *in vitro* ou *in vivo*.

3.4.2.1.1. Cultura de embriões de galinha *in vivo*

Após as 48h de incubação preliminar, os ovos foram removidos da incubadora, e uma janela (10 mm de diâmetro) foi aberta na casca, na posição adjacente ao embrião (embriões não-viáveis foram descartados) (**Figuras 3.A; 3.B**).

Os tratamentos *in ovo* (n = 8), para a realização do processo de vasculogênese, foram realizados por meio de suportes de metilcelulose em forma de disco (10 µl de volume, 3 mm de diâmetro; 1 disco/embrião), implantados próximo ao embrião na idade de 2 dias (E2; 48 h; estágio 13–HH; Hamburger & Hamilton, 1951), sobre a membrana vascular da vesícula vitelínica (*YSM-assay*), onde ilhotas sangüíneas – primórdios de vasos sangüíneos iniciais – estavam presentes na rede vascular primária (**Figura 3.C**). Cada substância, ou combinação de substâncias em estudo, foi adsorvida em metilcelulose, e a solução (concentração final = 0,45 %) foi secada ao ar em uma bandeja revestida com Teflon®.

Os grupos experimentais incluem doses crescentes dos polissacarídeos (SargA ou SargB, 6 - 1500 µg/disco), isoladamente ou em associação com hidrocortisona (156 µg/disco), hidrocortisona (HC; 156 µg/disco) apenas, heparina sódica (HP; 50 IU/disco), bFGF (50 ng/disco), e SargA, ou SargB (1500 µg/disco) mais bFGF. Discos polimerizados apenas com metilcelulose

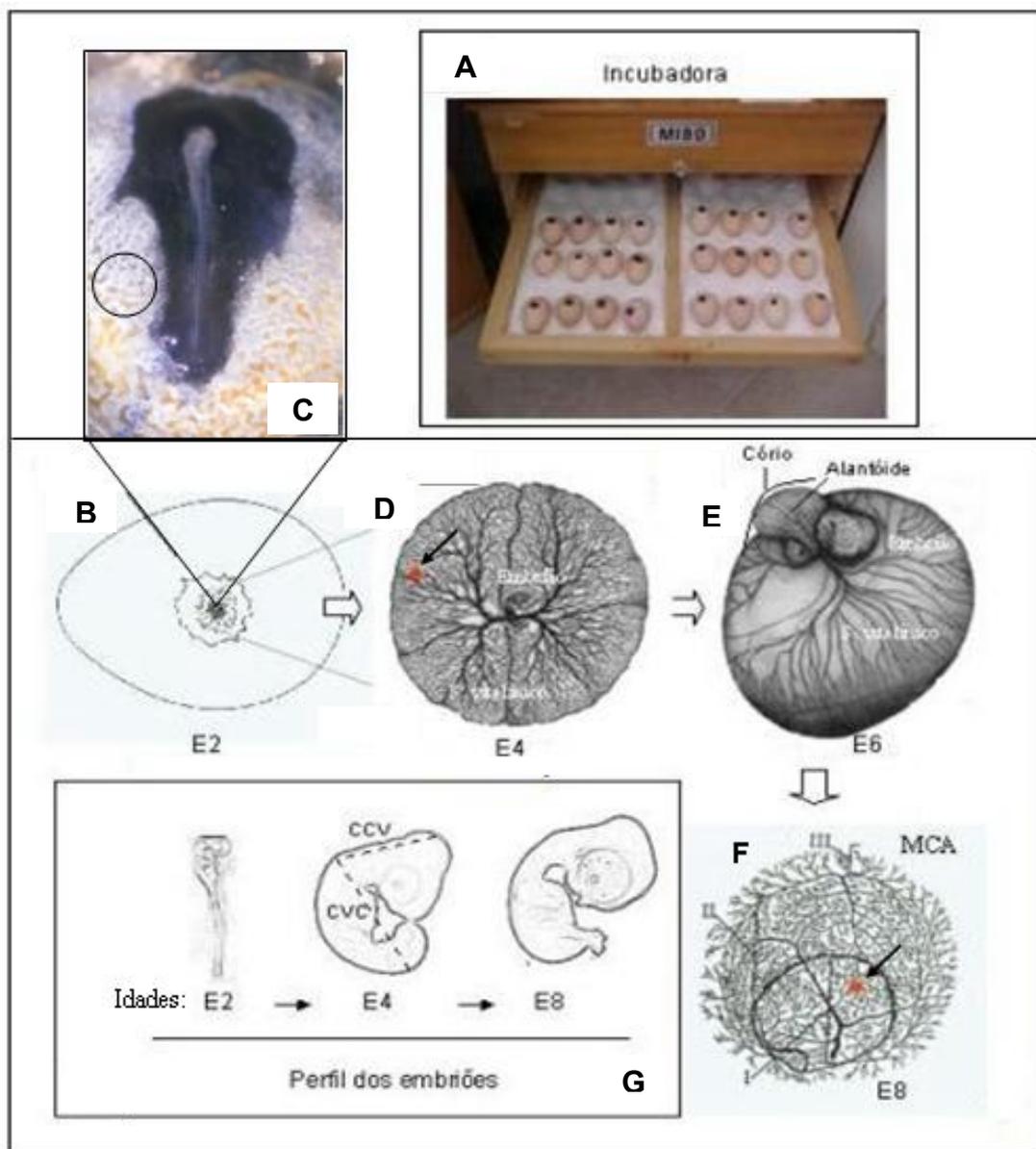


Figura 3 – (A) Imagem fotográfica do sistema de incubação dos ovos de galinha; (B) Esquema mostrando a abertura na casca e em detalhe (C) fotografia de um embrião de 2 dias (E2) com a vesícula vitelínica, onde se visualizam ilhotas sanguíneas (círculo) no local de tratamento, onde é implantado o disco de metilcelulose; (D) Aspecto dos vasos primordiais durante a vasculogênese (embrião de 4 dias; E4) e o local da implantação do disco (seta); (E) Vista geral de um embrião de 6 dias de idade e o início da formação da membrana corioalantóica (MCA); (F) Aspecto da angiogênese na MCA (8 dias de incubação; E8) e o local da implantação do disco (seta); (G) Quadro comparativo dos padrões morfológicos dos embriões nas idades de 2 – 4 dias (com os segmentos de comprimento cefálico-cervical – CCV e cervical-caudal – CVC) e 8 dias.

(água ultra-filtrada como solvente; pH 7,2) e heparina sódica mais hidrocortisona (HP+HC), foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente. As concentrações de hidrocortisona, heparina e bFGF, foram baseadas em quantidades pré-estabelecidas descritas na literatura em modelos similares (Crum *et al.*, 1985; Gagliardi & Collins, 1993; Nguyen *et al.*, 1994).

Após os tratamentos, as janelas na casca foram fechadas com filme de celofane preto e os ovos retornaram à incubadora por mais 48 h até a idade embrionária de 4 dias (E4; 96h; estágio 23–HH).

Concluído o período de incubação de 4 dias, a zona ao redor do disco de metilcelulose foi examinada em um microscópio estereoscópico, acoplado a um sistema fotográfico (Olympus; Tokyo, Japan). A inibição da vasculogênese foi determinada por meio da quantificação dos vasos vitelínicos que interceptavam o limite do disco de metilcelulose e expressa como a porcentagem de vasos em relação ao controle (**Figura 3.D**).

3.4.2.1.2. *Cultura de embriões-totais de galinha in vitro*

O método de cultura de embriões *in vitro*, na ausência de substâncias de reserva presentes na gema dos ovos (vitelo) e das membranas ovulares, oferece vantagens em relação ao método *in vivo*, por exemplo, a não-ocorrência de interação entre os polissacarídeos em estudo e constituintes do vitelo. A principal desvantagem são as restrições ao desenvolvimento desses embriões após as 72 h de incubação.

Após um período preliminar de 36h (1,5 dia) de incubação, os ovos foram removidos da estufa e manuseados de acordo com os procedimentos

descritos por Chapman *et al.* (2001) para a remoção da casca, sendo os embriões inviáveis, descartados. Cada embrião total, localizado na área central do blastoderma (cerca de 20 mm de diâmetro), foi retirado do ovo com auxílio de tesoura e pinças e, juntamente com um segmento da membrana vasculosa, mantido firmemente aderido no centro de uma abertura existente em uma moldura (2 x 2 cm) de papel-filtro (Whatman nº.1), de modo que o embrião foi enquadrado como na montagem de um diapositivo (*slide*).

Cada moldura, contendo um único embrião e o segmento adjacente de membranas da vesícula vitelínica, foi cuidadosamente lavada por imersão em uma solução salina simples (7,19 g/l de NaCl) mais 5 UI/ml de solução penicilina / estreptomicina, em movimentos circulares, e secada por meio de um leve toque sobre um lenço de papel, para descartar excedentes de líquido com o vitelo residual (gema do ovo).

Após a remoção do vitelo, foram imediatamente efetuados os tratamentos *in vitro*, por meio de suportes de metilcelulose em forma de disco (5 µl de volume, 2 mm de diâmetro; 1 disco/embrião), secados ao ar em superfície de Teflon®, foram implantados próximo ao embrião na idade de 1,5 dia (E1,5; 36 h; estágio 10–HH), sobre ilhotas sangüíneas na área vasculosa da vesícula vitelínica.

Os suportes de metilcelulose foram adsorvidos de concentrações crescentes de polissacarídeos (SargA ou SargB; 125 – 500 µg/disco). Discos polimerizados apenas com a metilcelulose (água ultra-filtrada como solvente; pH 7,2) foram utilizados como controle negativo.

Os embriões totais e a rede vascular vitelínica capilar em desenvolvimento (n = 8) foram cultivados por mais 48 h, com a região ventral

voltada para cima, em placas de Petri (13 cm) contendo um meio sólido de agar-albumem (0,72 g de bacto-agar; 120 ml de albumem fino e 120 ml de salina simples), em estufa incubadora (Quimis), a 37 °C, umidade e ar atmosférico suplementado com 5 % de CO₂ (*YSM-in vitro assay* ou *EC-culture*).

Concluído o segundo período de incubação (48 h), as placas contendo os embriões na idade 3,5 dias (E3,5; 84 h; estágio 21-HH) foram removidas da estufa, e a região de implante do disco-suporte foi analisada por transiluminação, em microscópio estereoscópico (Olympus; 25 X), seguindo os mesmos critérios previamente descritos para o sistema de cultura *in vivo*, realizado *in ovo*.

3.4.2.1.3. *Histologia de membranas vascularizadas da vesícula vitelínica*

Pelo fato de a vesícula vitelínica ser mais resistente, facilitando a manipulação, quando comparada com a membrana corioalantóica, foram utilizados segmentos de membranas de vesícula vitelínica – dissecados de embriões de galinha na idade de 4 dias (E4) – dos grupos tratados e controles negativo (água) e positivo (heparina e hidrocortisona; 50 UI/disco e 156 µg/disco, respectivamente), em ensaios de vasculogênese *in vivo*. As membranas foram cuidadosamente lavadas em PBS, fixadas em formaldeído a 10 %, seccionadas ao longo do comprimento (fatias de 5,0 x 0,5 mm), desidratadas em série de etanol – xileno, incluídas em parafina e cortadas no plano transversal. As secções (7 µm de espessura) foram aderidas em lâminas histológicas recobertas com albumina, re-hidratadas, coradas com hematoxilina

e eosina (H-E) e montadas com lamínulas (20 x 20 mm) em preparações permanentes (Beçak & Paulete, 1976).

Em cada preparação, um mesmo número de campos ($n = 16$) de microscopia óptica (400 X; Olympus, equipado com sistema fotográfico) ao longo do comprimento das secções histológicas, foi comparado com auxílio de uma grátícula (100 μm), em relação à densidade e à morfologia dos capilares.

3.4.2.2. *Ensaio de angiogênese na membrana corioalantóica do embrião de galinha*

Para a avaliação do processo de angiogênese, o ensaio *in vivo* da membrana corioalantóica foi executado de acordo com procedimentos previamente descritos (Jakob *et al.*, 1978; McCormick *et al.*, 1984; Crum *et al.*, 1985; Vu *et al.*, 1985; Peek *et al.*, 1988; Nguyen *et al.*, 1994).

A fim de evitar a aderência dos embriões nas membranas ovulares no decorrer do período preliminar de incubação, após 48 h (E2) a partir do início desse procedimento foi aberta uma janela na casca dos ovos (10 mm de diâmetro), na posição adjacente aos embriões (embriões não-viáveis foram descartados). Em seguida, as janelas na casca foram fechadas com filme de celofane preto e os ovos retornaram à incubadora, permanecendo até o 6º dia (total de 144 h de incubação no período preliminar aos tratamentos). Após esse período, os ovos foram novamente retirados da estufa, e as coberturas de celofane foram removidas.

Os tratamentos *in ovo* ($n = 8$) foram realizados por meio de suportes (discos) de metilcelulose (10 μl de volume, 3 mm de diâmetro; 1 disco/embrião), implantados na idade embrionária de 6 dias (E6; estágio

28/29–HH) no terço externo da membrana corioalantóica, onde vasos capilares estavam ainda crescendo. Cada substância, ou combinação de substâncias em estudo, foi adsorvida em metilcelulose, e a solução (concentração final = 0,45 %) foi secada ao ar em superfície de Teflon®.

Os grupos experimentais incluem doses crescentes dos polissacarídeos (frações SargA ou SargB; 2 - 1500 µg/disco), isoladamente ou em associação com hidrocortisona (156 µg/disco), hidrocortisona (HC; 156 µg/disco) apenas, heparina sódica (HP; 50 IU/disco), bFGF (50 ng/disco), e SargA, ou SargB (1500 µg/disco) em associação com bFGF. Discos polimerizados apenas com metilcelulose (água ultra-filtrada como solvente; pH 7,2) e heparina em associação com hidrocortisona (HP+HC) foram utilizados como controles negativo e positivo, respectivamente (Gagliardi & Collins, 1993).

Imediatamente após os tratamentos, as janelas na casca foram novamente fechadas com filme de celofane preto, e os ovos re-incubados (37,5°C) por mais 2 dias (48 h), para a conclusão do experimento.

Concluído o último período de incubação de 2 dias, os embriões encontravam-se em idade embrionária de 8 dias (E8; estágio 34–HH; total de 192 h de incubação do experimento); os ovos foram retirados da estufa, e a região do disco de metilcelulose foi examinada em um microscópio estereoscópico. A inibição da angiogênese (**Figuras 3.D; 3F**) foi determinada pela redução no número de vasos ao redor do disco de metilcelulose (aspecto de uma zona avascular) e expressa como a percentagem de vasos no limite do disco, em relação ao controle.

Especificamente nos processos de vasculogênese e de angiogênese de embriões de galinha *in vivo* - em relação aos efeitos da administração dos

polissacarídeos na ausência e na presença de HC (s/HC e c/HC, respectivamente) - os resultados obtidos foram também comparados através da relação: diferença entre as respostas inibitórias (Δ) = polissacarídeo c/HC \div (polissacarídeo s/HC + HC), sendo que, quando Δ corresponde ao intervalo $[0 < \Delta = 1]$ ou, Δ for maior que 1 ($\Delta > 1$), a resposta é devida (no máximo) a um efeito aditivo, ou refere-se a uma potencialização, respectivamente.

3.4.2.3. *A morfogênese embrionária como um parâmetro da atividade angiostática*

Concluídos os procedimentos de incubação, embriões de galinha utilizados nos ensaios de vasculogênese e de angiogênese foram dissecados das membranas ovulares, dessensibilizados em atmosfera de nitrogênio líquido e fixados em formaldeído a 10%. A Morfogênese embrionária (**Figura 3.G**) foi expressa como a percentagem de comprimento cefálico e determinada através de medidas de comprimento corporal nos segmentos definidos como eixos entre as flexuras cefálica – cervical – caudal. Os eixos de comprimento entre as flexuras cefálica e cervical (CCV) e as flexuras cervical e caudal (CVC), juntamente com a somatória destes dois segmentos embrionários (CCC), foram relacionados por meio da percentagem de comprimento cefálico (CCV/CCC), i.e, o comprimento da região cefálica em relação ao comprimento total do embrião, calculada através da seguinte expressão: $CCV/CCC = [CCV \div (CCV + CVC)] \times 100$.

Quando a percentagem de comprimento cefálico (CCV/CCC) nos grupos tratados resultou significativamente ($P < 0,05$) maior, ou menor, que o valor correspondente ao controle, verificou-se que a taxa de crescimento no

segmento da cabeça foi alterada e isto foi considerado no presente estudo, um indicativo de modificação no padrão de morfogênese embrionária.

3.4.2.4. *Ensaio de angiogênese em adulto através dos implantes de gelfoam*

No presente trabalho, o processo de formação de vasos sangüíneos estudado na fase adulta corresponde a angiogênese, tendo sido utilizados camundongos machos adultos. Os grupos foram tratados com o polissacarídeo SargA ou sargB (1500 µg/animal) e bFGF (50 ng/animal), isoladamente ou em associação. PBS (veículo) ou heparina associada à hidrocortisona (HP, 50 UI/animal + HC, 156 µg/animal) foram usados como controles negativo e positivo de inibição da angiogênese, respectivamente. Esses componentes, isoladamente ou em associação, foram adsorvidos (50 µl) em um implante (*plug*) de esponja de gelatina estéril (gelfoam®; 6mm de diâmetro x 3mm). Cada *plug* de gelfoam foi implantado s.c. no flanco posterior direito de um camundongo (n = 5 - 8).

Após duas semanas, os animais foram sacrificados e a pele foi cuidadosamente afastada para expor o implante de gelfoam intacto. A concentração de hemoglobina (Hb) contida no gelfoam foi determinada com a utilização do reagente de Drabkin (Drabkin & Austin, 1932), para a quantificação da formação de vasos. A concentração de Hb foi determinada com base na absorvância ($\lambda = 540 \text{ nm}$) em um espectrofotômetro Hitachi (modelo U-2001), sendo expressa em mg/dl e calculada por meio da seguinte equação: absorvância (A) da amostra \div A padrão $\times 10$, com base em um padrão de Hb medido simultaneamente, conforme o descrito por Lee *et al.* (2003).

3.4.3. *Estudo da atividade antitumoral*

3.4.3.1. *Cultura de células*

As células do melanoma B16F10 foram mantidas em meio RPMI-1640 suplementado com FBS (10 %) inativado por calor, estreptomicina (1 %), L-glutamina (1 %) e bicarbonato de sódio (2 %). As células foram cultivadas em incubadora a 37°C, em ar atmosférico suplementado com umidade e 5 % de CO₂.

3.4.3.2. *Estudos in vitro*

3.4.3.2.1. *Ensaio de migração celular*

A porção central da monocamada confluyente de células de melanoma B16F10 em placas de 6 poços (Corning, Corning, NY, USA) foi removida por meio de uma raspagem (**Figura 4**), para produzir uma zona livre de células. As células foram lavadas (3 x) com PBS e incubadas por 12 h a 37°C em concentrações crescentes dos polissacarídeos (SargA ou SargB, 50 – 200 µg/ml; 2 ml/poço) em meio RPMI-1640. O controle foi realizado com células incubadas apenas com o meio. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Concluído o experimento, as células foram fixadas em etanol absoluto e coradas através do método de Giemsa. A região central da monocamada, adjacente à superfície raspada através da qual as células migraram, foi examinada por transiluminação em microscopia óptica (100 x).

O número de células em processo de migração, definido em um total de 10 campos ao acaso (1 mm²), foi determinado com auxílio de uma grátula e os resultados são apresentados como o número médio de células migrando por campo (adaptado de Burke, 1973 e Igura *et al.*, 2001).

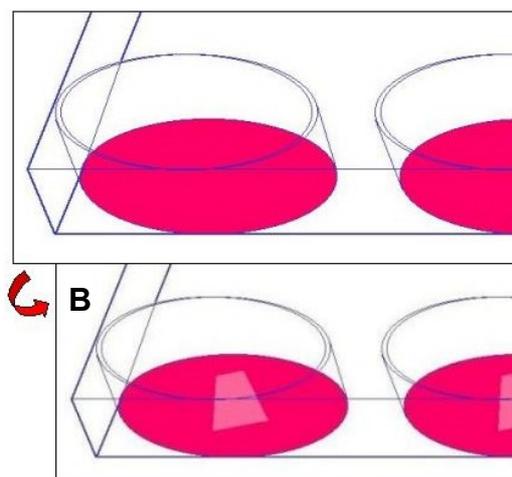


Figura 4 – Esquema representando o aspecto das monocamadas de células de melanoma da linhagem B16F10 no ensaio de migração celular, antes (A) e após (B) a remoção das células (asterisco) na porção central dos poços (2 ml/well) na placa de cultura de 6 wells.

3.4.3.2.2. Ensaio de viabilidade celular

Células de melanoma B16F10 foram semeadas (2.5×10^6 células) em meio RPMI-1640, em placas de 96 poços (Corning, Corning, NY, USA). Após 24 h de incubação (37°C ; umidade; 5 % CO_2 , em ar), as células foram tratadas com concentrações crescentes dos polissacarídeos (SargA, ou sargB; 50 – 2000 $\mu\text{g}/\text{poço}$; 200 $\mu\text{l}/\text{poço}$), em meio RPMI-1640. Três dias após (72h de tratamento), o meio foi removido, e os poços lavados cuidadosamente (PBS; 5 X; 100 $\mu\text{l}/\text{poço}$), para descartar qualquer remanescente dos compostos em teste, antes da incubação das células com o MTT (Mosmann, 1983; Carmichael *et al.*, 1987).

O presente método avaliou a capacidade de metabolização do sal de tetrazólio [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium brometo] em cristais de formazan, envolvendo a participação de enzimas desidrogenases que possuem como co-fator, NADPH ou FADH_2 . As células foram incubadas por 4h, em

solução de MTT (estoque de 5 mg/ml de MTT em PBS, diluído em meio RPMI-1640 na concentração de 1:10), à temperatura de 37°C, com umidade e 5 % CO₂, em ar. Em seguida o meio foi suplementado com 50 µl/poço de solução de SDS a 20 % em HCl 0,02 M, para dissolver o formazan, e as placas foram reincubadas por mais 30 min.

A absorbância ($\lambda = 570 \text{ nm}$) foi determinada com auxílio de uma leitora de placas automática (Wallac, modelo Victor 2 - 1420 Multilabel Counter 2.00.035) – acoplada a uma estação de trabalho. A análise foi realizada através do programa Perkin Elmer Life Sciences (versão 2.0) e os resultados foram expressos como percentagem do controle, examinando-se a relação linear (análise de correlação no modelo linear, expressa pela função: $y = a + bx$) entre a concentração de polissacarídeos e o número de células viáveis. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.4.3.3. *Estudos in vivo*

3.4.3.3.1. *Ensaio de carcinogênese*

Células de melanoma da linhagem B16F10 (1×10^6 células em 200 µl/animal), em meio RPMI-1640, foram inoculadas s.c. na região dorsal de camundongos (n = 7) no dia 0.

Quando o volume do tumor atingiu pelo menos 150 mm³, os animais foram injetados s.c., no sítio adjacente ao tumor, com uma única dose diária de polissacarídeos (SargA, ou SargB; 1,5 e 150,0 µg/animal) durante 3 dias consecutivos. Tumores de tamanho similar foram utilizados tanto nos grupos experimentais como no grupo controle (somente meio RPMI-1640). As medições de volume da massa tumoral e do peso corporal dos animais foram

determinadas a cada 3 dias durante os 15 dias de duração do experimento, e o efeito dos tratamentos no volume tumoral (mm^3) foi avaliado no término do experimento.

O volume do tumor foi determinado com o uso de um paquímetro de precisão (Vonder), e as dimensões da massa tumoral subcutânea foram obtidas, medindo-se a largura (X) a profundidade (Y) e o comprimento (Z). As dimensões do tumor foram comparadas ao volume (V) de um elipsóide, onde $V = 4/3\pi (X \times Y \times Z)$ e $X = Y$. Logo, $V = 4/3\pi [(X/2)^2 \times (Z/2)^2]$, sendo X e Z, respectivamente, as medidas menor (largura) e maior (comprimento). Desse modo, o volume (V) do tumor (mm^3) foi calculado de acordo com a seguinte fórmula: $V = X^2 \times Z \times 0,52$ (Ingber *et al.* 1990).

3.4.4. Critérios para a utilização dos polissacarídeos (frações SargA e SargB)

No presente estudo, foram avaliadas ambas as frações de polissacarídeos (SargA e SargB) nos ensaios sobre a vasculogênese e a angiogênese embrionária realizados *in vivo* e *in vitro*, bem como, nos ensaios de atividade antitumoral realizados *in vitro*. Considerando que as duas frações de polissacarídeos obtidas da alga em estudo são (devido às condições, inerentes ao próprio processo de extração), similares em termos qualitativos em relação aos seus constituintes químicos, e levando-se em conta, ainda, as restrições de ordem ética e operacional (quantidades) vigentes quanto ao uso de animais, optou-se pela escolha de um único polissacarídeo entre as duas frações extraídas, para a realização dos ensaios que tratam da angiogênese e da atividade antitumoral realizados *in vivo* em camundongos adultos. O critério empregado consistiu na utilização, para estes últimos ensaios, exclusivamente

da fração correspondente ao polissacarídeo que apresentou melhor definição na caracterização da estrutura química (principalmente quanto aos espectros de cromatografia e de ressonância). Além disso, foram levadas em conta as respostas mais adequadas apresentadas pelos polissacarídeos (com base na uniformidade dos perfis das curvas de dose-efeito), nos ensaios realizados inicialmente sobre os processos de formação de vasos sanguíneos nos embriões de galinha e subseqüentemente sobre a atividade antitumoral *in vitro*.

3.4.5. *Análise de dados e estatística*

Em cada grupo experimental, todas as respostas obtidas nos grupos tratados com os polissacarídeos SargA ou SargB e associações foram sempre avaliadas em paralelo com as respostas dos tratamentos com o veículo nos respectivos grupos controle, de modo a minimizar a interferência de possíveis flutuações de responsividade.

Os dados foram apresentados como médias \pm E.P.M., obtidos de pelo menos dois experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas através da ANOVA (análise de variância univariada), seguida do método *post-hoc* LSD (*least squares difference*).

As homogeneidades das variâncias e as influências de substâncias, concentrações, bem como de locais e períodos de tratamento foram testados. Os efeitos foram considerados estatisticamente significativos para valores de P menores de 0,05 (*).

4. Resultados

4.1. Caracterização dos polissacarídeos isolados de parede celular de *Sargassum stenophyllum*

Polissacarídeos de parede celular da alga parda *Sargassum stenophyllum* foram isolados por tratamento alcalino (4M KOH, 10 mg NaBH₄, a 25 °C), produzindo as frações polissacarídicas A e B (SargA e SargB), por neutralização (AcOH, pH = 5,2) e precipitação com etanol (3 volumes), respectivamente.

O protocolo de extração resultou em valores de rendimento SargA e SargB, equivalentes a 4,92 % e 4,64 % (p/p), respectivamente, da biomassa inicial (amostra seca) de algas. A eletroforese em papel de acetato de celulose (Cellogel) revelou a existência de um único polissacarídeo em cada fração (presença de uma única banda). Foi observado ainda, um reduzido conteúdo ácido (0,34 e 0,33 mol %) e determinado o teor de proteínas (0,00 e 0,45 %; **Anexo 1**), respectivamente.

No processo de caracterização da estrutura química de SargA e SargB, o espectro de infravermelho (IV; freq. = 15.799,7cm⁻¹) dos polissacarídeos, mostrou sinais característicos para as funções álcool (C-O = 1030 cm⁻¹ e O-H = 3400 cm⁻¹) e aldeído (2929 cm⁻¹). Sinais na região 1715 cm⁻¹ característicos de grupo C=O, indicam serem aldoses os monossacarídeos constituintes dos polissacarídeos SargA e SargB. Os grupos químicos NH (1630 cm⁻¹) e carboxila (1408 cm⁻¹) indicam a presença de grupos ácidos na estrutura química primária, e um sinal típico (817,003 cm⁻¹) sugere a ocorrência de grupos sulfato na posição C-2 e C-3 ou ligado à posição C-6 (**Anexo 2**).

A análise dos espectros de ressonância magnética nuclear de carbono (RMN-¹³C; **Anexo 3**) evidenciou um perfil de leitura bem definido no intervalo de 20 a 110 ppm para o polissacarídeo SargA, enquanto um nível de resolução inferior foi observado para a fração neutra (SargB).

O espectro de RMN-¹³C do polissacarídeo SargA mostrou sinais de ressonância típicos referentes ao ácido idurônico sulfatado, β-D-galactana, ligados a C-4; (δ = 77,7 ppm), ao ácido α-D-glucurônico (δ = 100,8 – 100,9 ppm), além de α-D-glucose e β-D-xilose, ligadas a carbono-3 (C-3) de L-fucose (L-fucana). Por outro lado, não está descartada a existência de α-L-fucose (δ = 100,4 ppm), como constituinte básico, o que sugere a presença de 3 grupos sulfatos ligados a 4-α-L-fucose. Outros sinais (δ) correspondem à ligação de grupamento sulfato em C-6 (67,6 ppm); 1-O-β-D-glicopiranosil-glicerol ligado a C-3 (62,8 ppm) e à existência do radical O-metil (metoxil) (21,9 ppm).

Os resultados referentes à estrutura primária dos polissacarídeos foram corroborados através de cromatografia de camada delgada, que mostrou composição de monossacarídeos caracterizada por unidades de carboidrato de α-L-fucose, β-D-manose, β-D-galactose, β-D-xilose, α-D-glucose e de ácido glucurônico (**Anexo 4**).

4.2. Avaliação da atividade inibitória da formação de vasos sanguíneos

4.2.1. Análise da vasculogênese

4.2.1.1. Vasculogênese em embriões de galinha *in vivo*

Inicialmente, para determinar o efeito de SargA e SargB sobre o processo de vasculogênese, foi realizado um ensaio *in vivo* utilizando-se a

vesícula vitelínica de embriões de galinha. No 2º dia embrionário (idade de 2 dias; E2; 48 h de incubação do ovo), as vesículas vitelínicas foram tratadas por meio de um suporte discóide de metilcelulose (10 µl/disco), com concentrações crescentes dos polissacarídeos (6 – 1500 µg/disco). Um único disco foi implantado na superfície de cada vesícula vitelínica, onde ilhotas sangüíneas e vasos vitelínicos iniciais estavam se estabelecendo.

Na avaliação da atividade antivasculogênica, considerou-se o aparecimento de uma zona avascular ao redor do disco no 4º dia embrionário (idade de 4 dias; E4; 96 h de incubação). Através do ensaio de membrana da vesícula vitelínica, foi possível distinguir no 4º dia de incubação (idade de 4 dias) os vasos capilares formados a partir de ilhotas sanguíneas, após o tratamento no 2º dia embrionário, dos vasos vitelínicos (onfalomesentéricos) anteriormente existentes. O efeito inibitório de SargA, SargB e associações sobre a vascularização de membranas da vesícula vitelínica no período de 2 a 4 dias de idade (48 – 96 h de incubação) é mostrado na **Figura 5**.

Nas membranas do controle, verificou-se que estabeleceram-se, em média, 92 vasos vitelínicos capilares nos limites do disco. Este número de vasos foi considerado o total - padrão de vasos na idade embrionária de 4 dias (100 % de vasos) e referido como ausência de inibição da vasculogênese (**Figura 6**).

Preliminarmente foi avaliado o efeito antivasculogênico de um total de 5 concentrações de heparina (HP; 50 UI/disco) – um polissacarídeo endógeno com funções relevantes no metabolismo do sistema cardiovascular (**Inset na Figura 6**) – e da hidrocortisona (HC; 156 µg/disco), administrados isoladamente (**Figura 6**).

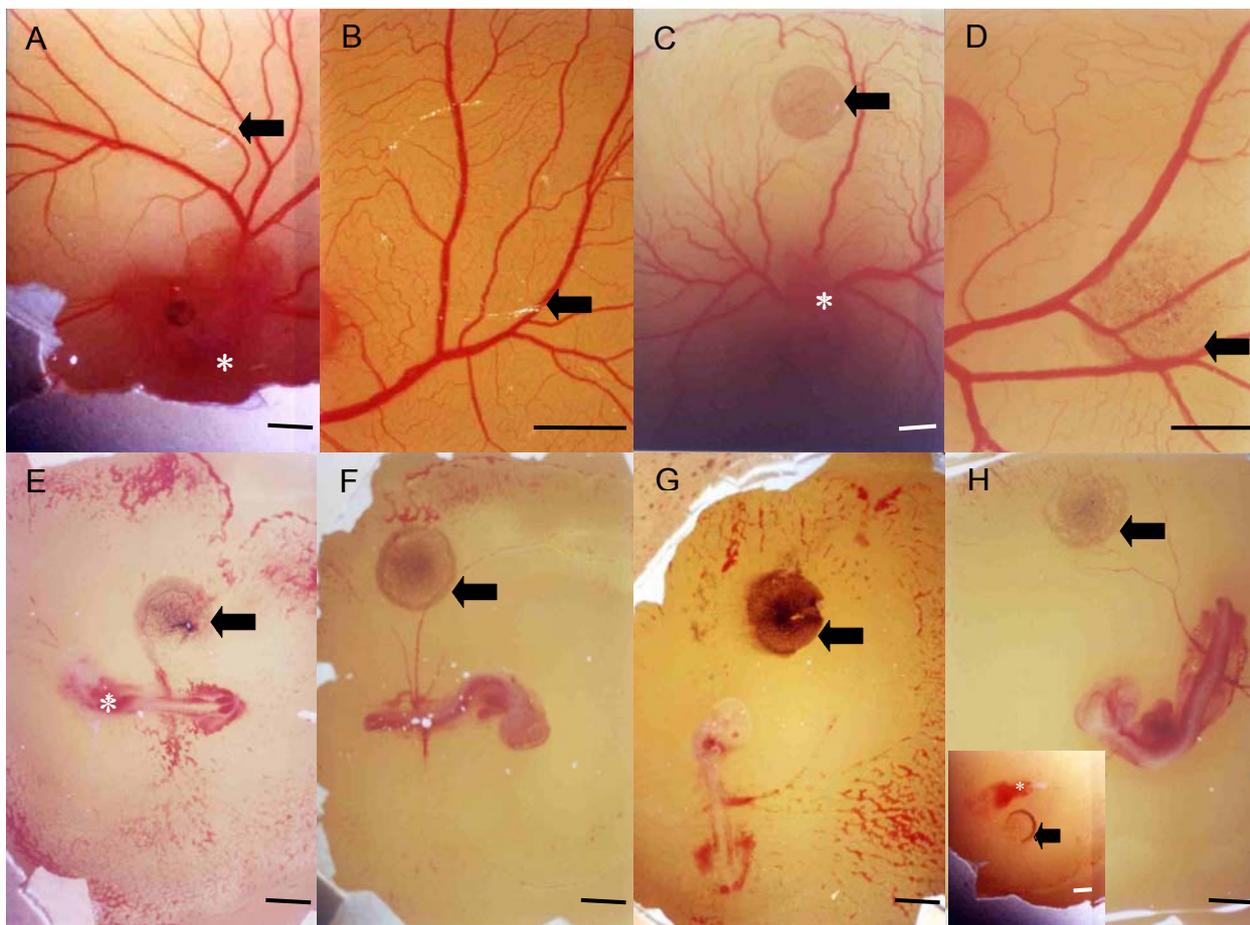


Figura 5 - imagens fotográficas do efeito inibitório dos polissacarídeos SargA e SargB, derivados de parede celular de *Sargassum stenophyllum* administrados na membrana da vesícula vitelínica de embriões de galinha de 4 dias de idade (asteriscos). Em cada ovo, um único disco-suporte contendo as substâncias em estudo foi implantado na vesícula vitelínica, onde ilhotas sangüneas e vasos primários estavam se estabelecendo. Os tratamentos, realizados com 48 h de incubação (idade de 2 dias), correspondem à: **(A)** controle (veículo; água ultrafiltrada); **(B)** em detalhe, no controle, vasos sangüneos capilares ao redor do disco de metilcelulose (setas); **(C)** SargA, 94 µg/disco e **(D)** em detalhe, a zona ao redor do disco contendo 94 µg de SargB; **(E)** SargA, 375 µg; **(F)** SargA, 1500 µg; **(G)** SargB, 1500 µg; **(H)** SargA, 1500 µg + hidrocortisona, 156 µg; (Inset em H) Heparina, 50 UI + hidrocortisona, 156 µg (controle positivo). Aumento: Barras (1,5 mm).

O polissacarídeo (HP), por si só, foi capaz de bloquear a vasculogênese em 97% aproximadamente, enquanto o glicocorticóide (HC) inibiu relativamente esse processo, tendo reduzido a percentagem de vasos vitelinos em aproximadamente 42% comparado com o controle (água) **(Figura 6)**.

No controle positivo, essa figura mostra que a associação entre heparina e hidrocortisona (50 UI/disco e 156 μ g/disco) inibiu a vasculogênese em 100%.

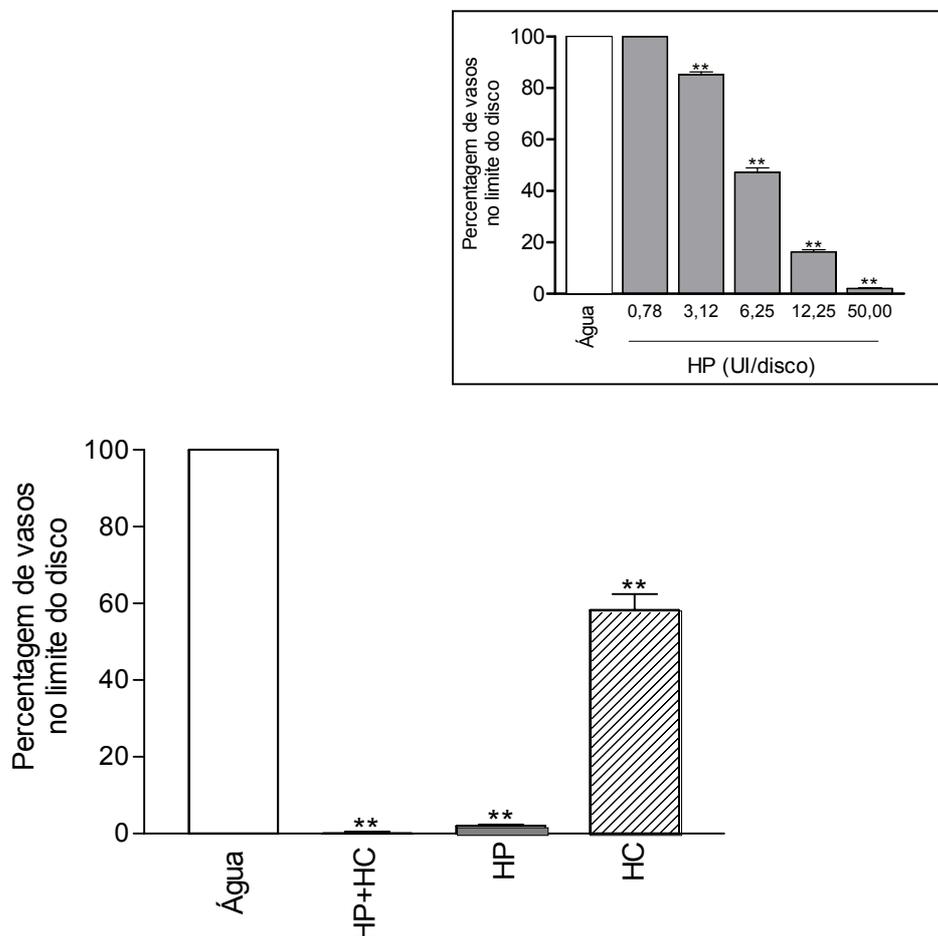


Figura 6 - Efeitos da administração (na idade de 2 dias) de heparina (HP; 50 UI) e hidrocortisona (HC; 156 μ g/disco), isoladamente e em associação (controle positivo de inibição), sobre membranas de vesículas vitelínicas de embriões de galinha de 4 dias, cultivados *in ovo*. *Inset*: curva de dose – efeito da HP (Os resultados entre os grupos são estatisticamente diferentes ao nível de $**P < 0,01$). Discos de metilcelulose contendo somente água ultrafiltrada (veículo) foram utilizados como controle. Os resultados são expressos em porcentagem de vasos capilares no limite do disco-suporte em relação ao número de vasos no controle. Cada coluna e barra vertical representam respectivamente a média \pm E.P.M. de 8 ovos e os asteriscos denotam uma inibição estatisticamente significativa da vasculogênese em relação ao controle (água), ao nível de $**P < 0,01$ (ANOVA seguida do teste LSD).

Embora o tratamento com a HP isoladamente já tenha inibido em aproximadamente 100% a formação dos vasos vitelínicos, a associação entre HP e HC na vasculogênese possibilitou uma comparação com o bem estabelecido efeito inibitório desse tratamento na angiogênese.

Dependendo da concentração de polissacarídeo utilizada, as vesículas vitelínicas expostas tanto ao SargA como ao SargB apresentaram redução no número de vasos vitelínicos. Nas concentrações de 6 a 1500 $\mu\text{g}/\text{disco}$, SargA e SargB mostraram um efeito inibitório da vasculogênese de 23 a 100% e de 11 a 97%, respectivamente (**Figura 7**).

Ambos os polissacarídeos (SargA e SargB; 6 - 1500 $\mu\text{g}/\text{disco}$) quando administrados em associação com a hidrocortisona (156 $\mu\text{g}/\text{disco}$), foram mais efetivos em inibir a vasculogênese, reduzindo de 54 a 100% e de 47 a 98%, respectivamente, a formação de vasos (**Figura 7**). A inibição ao nível de 100%, implica em uma total ausência de novos vasos vitelinos nos limites do disco.

Na análise da diferença nas respostas (Δ), calculada através da equação $\Delta = \text{SargA ou SargB c/HC} \div (\text{SargA ou SargB s/HC} + \text{HC})$ (**Tabela 1**) verificou-se que o polissacarídeo SargA (6 – 375 $\mu\text{g}/\text{disco}$; $\Delta = 1,12$ a 1,42) potencializou o efeito antivasculogênico da HC (156 $\mu\text{g}/\text{disco}$).

A **tabela 1** mostra, ainda, que nos tratamentos referentes ao SargB, excetuando-se a concentração de 24 $\mu\text{g}/\text{disco}$, a única na qual o polissacarídeo potencializou o efeito da HC ($\Delta = 1,03$), foi verificado somente um efeito aditivo sobre a resposta do esteróide ($\Delta = 0,78$ a 0,91).

Não foi observada a presença de trombo, ou outras alterações nos vasos capilares, com qualquer das substâncias acima utilizadas.

Na sequência, foi avaliado o efeito do bFGF isoladamente ou em associação com os polissacarídeos (SargA ou SargB) adicionados concomitantemente a esse fator de crescimento nos discos-suporte (**Figura 8**).

Tabela 1 – Percentagem de inibição da vasculogênese na membrana vitelínica do embrião de galinha (n = 8) no intervalo de idade de 2 a 4 dias de incubação, calculada com base percentagem de vasos ao redor do implante de metilcelulose. Os efeitos da administração do polissacarídeo SargA, ou SargB ($\mu\text{g}/\text{disco}$), ou HP (50 UI/disco) e de 156 $\mu\text{g}/\text{disco}$ de hidrocortisona (HC) foram comparados na ausência e na presença de HC (s/HC e c/HC, respectivamente), através da seguinte equação: $\Delta = \text{polissacarídeo c/HC} \div (\text{polissacarídeo s/HC} + [\text{HC}])$, onde o intervalo $[0 < \Delta = 1]$ pode corresponder à somação (efeito aditivo) e $[\Delta > 1]$ refere-se à potencialização do efeito da HC pelo polissacarídeo.

Polissac.	s/HC	c/HC	s/HC + [HC*]	Δ
HP	97,9	100,0	139,6	0,72
SargA (μg)				
6	0,5	54,4	42,2	1,28
24	2,2	62,5	43,9	1,42
94	22,8	72,6	64,5	1,12
375	30,7	86,4	72,4	1,19
1500	100,0	100,0	141,7	0,70
SargB (μg)				
6	10,9	46,7	52,6	0,89
24	11,7	55,2	53,4	1,03
94	32,9	58,2	74,6	0,78
375	66,0	98,1	107,7	0,91
1500	97,3	98,4	139,0	0,71

(*) Percentagem de inibição da vasculogênese no tratamento com HC (54 vasos), em relação ao controle (92 vasos): 41,7 %.

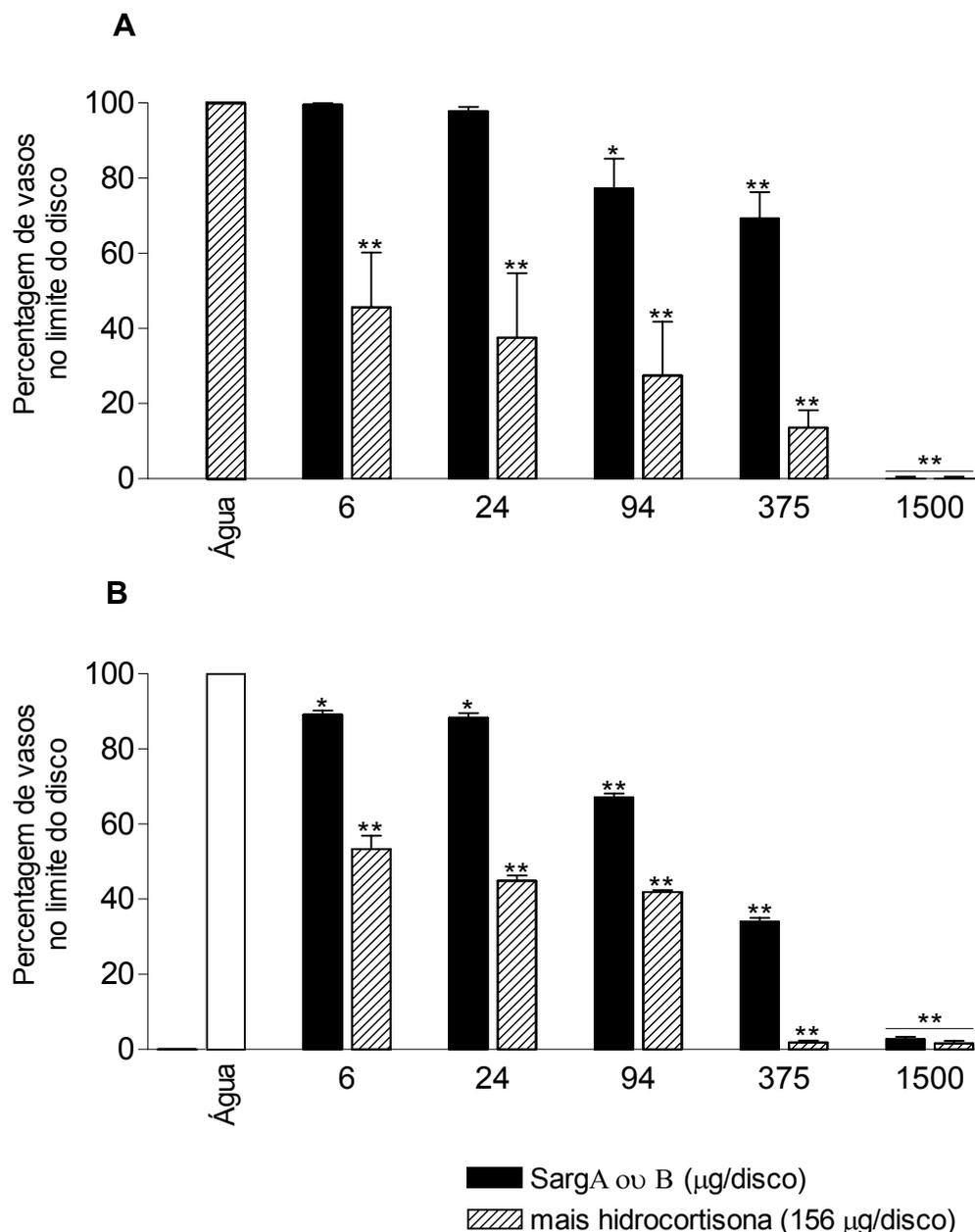


Figura 7 - Efeitos dos polissacarídeos SargA (**A**) e SargB (**B**), administrados (na idade de 2 dias) isoladamente e em associação com a hidrocortisona, sobre membranas de vesículas vitelínicas de embriões de galinha de 4 dias de idade, cultivados *in ovo*. Discos de metilcelulose contendo somente água ultrafiltrada (veículo) foram utilizados como controle. Os resultados são expressos como a porcentagem de vasos capilares nos limites do disco-suporte em relação ao número de vasos no controle. Cada coluna e barra vertical representam respectivamente a média \pm E.P.M. de 8 ovos, e os asteriscos denotam uma inibição estatisticamente significativa da vasculogênese em relação ao controle (água), ao nível de $*P < 0,05$ e $**P < 0,01$ (ANOVA seguida do teste LSD).

A análise da **figura 8** mostra que tanto o SargA como o SargB foram capazes de reduzir ($P < 0,01$) o efeito pró-vasculogênico do bFGF *per se*, correspondente a 144% em comparação com o controle (água). Apenas o polissacarídeo SargB foi capaz de reverter parcialmente (em 10%; $P < 0,05$) o efeito pró-vasculogênico do bFGF em relação ao controle. Além disso, observa-se que o efeito da associação de SargA, ou SargB, com o bFGF diferiu estatisticamente ($P < 0,01$) do efeito do tratamento com o bFGF isoladamente.

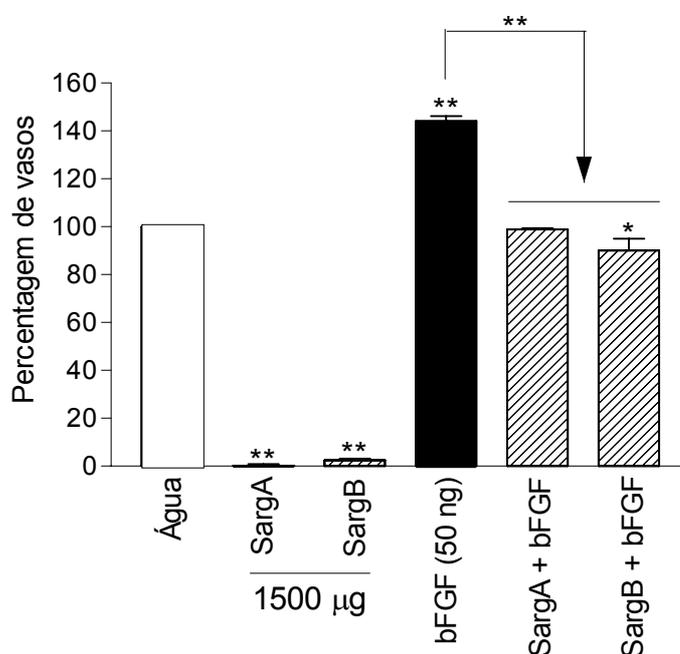


Figura 8 - Percentagem de microvasos na vesícula vitelínica de embriões de galinha de 4 dias de idade, cultivados *in ovo*, nos tratamentos (realizados na idade de 2 dias) com os polissacarídeos SargA ou SargB, isoladamente ou em associação com bFGF. Discos de metilcelulose contendo somente água ultrafiltrada (veículo) foram utilizados como controle. Os resultados são expressos em percentagem de vasos nos limites do disco-suporte, em relação ao número de vasos presente no controle. Cada coluna e barra vertical representam respectivamente a média \pm E.P.M. de 8 ovos, e os asteriscos denotam uma inibição estatisticamente significativa da vasculogênese ao nível de * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$, em relação ao controle (água), bem como na comparação entre o tratamento com o bFGF e os dois grupos tratados com a associação de SargA ou SargB com bFGF (setas). ANOVA seguida do teste LSD.

4.2.1.2. Vasculogênese em embriões de galinha *in vitro*

O vitelo do ovo – a gema - é uma reserva de substância nutritiva de composição heterogênea proveniente da célula germinativa (ovócito) da ave, que está presente na vesícula (ou saco) vitelínico, viabilizando os aportes nutricionais necessários ao crescimento e desenvolvimento do embrião. Entre os inúmeros componentes do vitelo, estão compostos bioativos com potencial atividade sobre a vascularização, tais como a insulina e fatores de crescimento, a exemplo do fator de crescimento semelhante à insulina (*insulin-like growth factor*; IGF) (Houillon, 1972; De Pablo *et al.*, 1982; Dias & Muller, 1999).

Para investigar se o efeito inibitório dos polissacarídeos sobre a vasculogênese poderia estar relacionado à interação dos polissacarídeos em estudo com componentes do vitelo do ovo, embriões-totais de galinha na idade de 36 h (E1,5; um dia e meio de incubação) aderidos a molduras de papel-filtro juntamente com as membranas da vesícula vitelínica sem vitelo, foram dispostos em placas de Petri (*Inset* da **Figura 9** – seta) e incubados em meio agar-albumem, em presença ou ausência de SargA ou SargB.

Decorridas as 48 h finais da incubação, as placas contendo os embriões de três dias e meio de idade (E3,5; 84 h) foram removidas do incubador, e a área vascular ao redor dos discos-suporte foi analisada por meio de transiluminação, através de um microscópio estereoscópico (25x), seguindo-se os mesmos critérios previamente descritos no sistema de cultura *in vivo*.

O efeito antivasculogênico produzido por ambos os polissacarídeos *in vitro* (**Figura 9**) foi similar ao efeito observado no ensaio *in vivo* (**Figura 5**), indicando que a resposta não foi influenciada por componentes do vitelo.

Nos ensaios de vasculogênese inicial, nos embriões com um dia e meio de idade (E1,5; 36h) incubados *in vitro*, foram comparadas somente respostas aos tratamentos entre o SargA e o SargB, isoladamente.

Outras três amostras de embriões iniciais (E 1,5) foram expostas ao transresveratrol (t-Resv) – uma substância com efeito inibitório bem documentado sobre a formação de tubo vascular (Frémont, 2000; Igura *et al.*, 2001). Além desse aspecto, a utilização do t-Resv nos experimentos *in vitro* baseou-se no fato dessa substância possuir reconhecida propriedade antioxidante, antimutagênica e antitumoral (Frémont, 2000), tendo sido também descrita como um fito-estrógeno (agonista para receptor de estrógenos). O t-Resv apresenta, em sua estrutura química (polifenólica), três radicais hidroxila distribuídos em posições bastante similares ao que ocorre na molécula do hormônio esteróide hidrocortisona (HC) – utilizada no presente trabalho como controle positivo nos experimentos sobre a formação de vasos em embriões *in vivo*. De fato, por inibir especificamente a COX-1, também foram atribuídas propriedades antiinflamatórias ao t-Resv (Gehm *et al.*, 1997).

A substituição no uso da HC pelo do t-Resv também teve como premissa a minimização dos riscos de ocorrência de teratogênese e/ou mutagênese, potencialmente exercidos pelo uso da HC e outros hormônios esteróides em embriões pouco desenvolvidos (idade inferior a dois dias) e mais susceptíveis ao ambiente, como o da incubação *in vitro*.

A inibição da vasculogênese *in vitro*, expressa pela percentagem de vasos vitelínicos no limite do disco de metilcelulose em resposta ao tratamento com SargA e SargB (125 - 500 µg/disco), variou de 44 a 56 % e de 47 a 65 %, respectivamente (**Figura 10**).

O *inset* na **Figura 10** mostra a atividade antivasculogênica nos embriões incubados *in vitro* após os tratamentos com t-Resv (0,005 – 0,5 $\mu\text{g}/\text{disco}$).

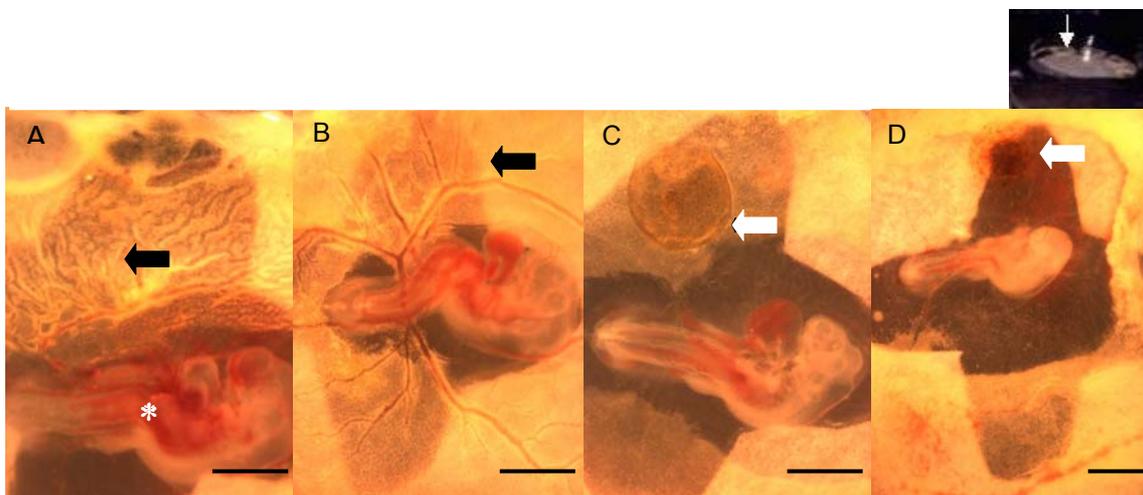


Figura 9 - imagens fotográficas do efeito inibitório dos polissacarídeos SargA e SargB derivados de parede celular de *Sargassum stenophyllum*, administrados (idade de 1,5 dia) na membrana da vesícula vitelínica de embriões de galinha de 3,5 dias de idade cultivados *in vitro*: **(A)** Controle (veículo); **(B)** SargA, 125 $\mu\text{g}/\text{disco}$; **(C)** SargA, 500 μg ; **(D)** SargB, 500 μg . Um único disco-suporte de metilcelulose (setas) contendo as substâncias em estudo foi implantado na vesícula vitelínica, onde ilhotas sangüíneas e vasos primários estavam se estabelecendo. Aumento: Barras (1,5 mm). *Inset*: placa de cultura.

Nas concentrações de 0,005 - 0,5 $\mu\text{g}/\text{disco}$, o t-Resv reduziu de 12 a 46% o número de vasos vitelinos no limite do disco em relação ao controle (água; veículo). O efeito do tratamento com Et-OH (100%) – veículo da solução-estoque de t-Resv (438,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) – foi avaliado, apesar desse álcool ser descartado por evaporação, durante o processo de polimerização dos discos-suporte de metilcelulose (secagem-ao-ar) (*Inset na Figura 10*).

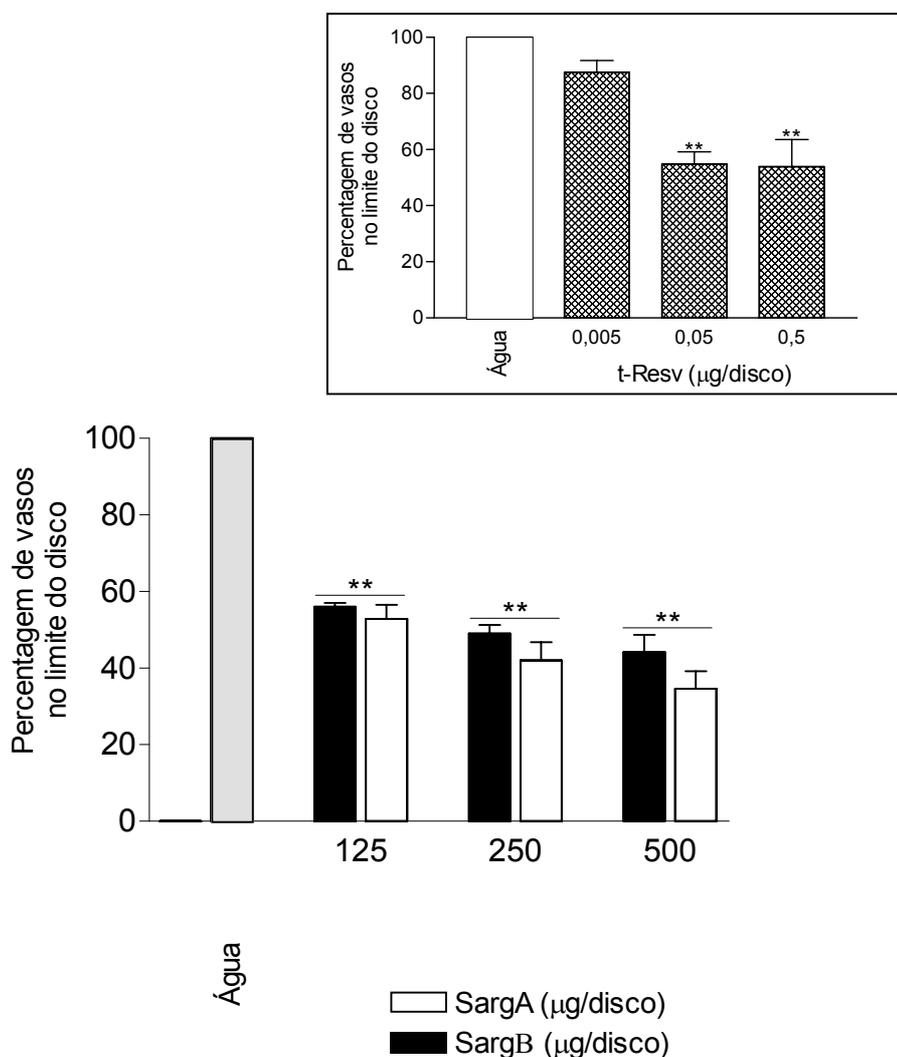


Figura 10 - Efeitos dos polissacarídeos SargA e SargB sobre membranas de vesículas vitelínicas de embriões de galinha de 3,5 dias de idade, cultivados *in vitro* (no período de 36 – 84 h do tratamento). Discos de metilcelulose contendo somente água ultrafiltrada (veículo) foram utilizados como controle. O *inset* mostra os efeitos do tratamento com trans-resveratrol (t-Resv). Os resultados foram expressos em porcentagem de vasos capilares no limite do disco-suporte em relação ao controle. Cada coluna e barra vertical representam respectivamente a média \pm E.P.M. de 8 ovos e os asteriscos denotam uma inibição estatisticamente significativa da vasculogênese em relação ao controle (água), ao nível de $**P < 0,01$ (ANOVA seguida do teste LSD).

4.2.1.3. *Análise da vasculogênese com base na histologia de membranas da vesícula vitelínica*

Secções de membranas de vesículas vitelínicas dissecadas dos embriões de 96 h de incubação (E4; cultivados *in vivo* durante 4 dias nos grupos tratado e não-tratado com os polissacarídeos, foram manuseadas conforme o descrito na metodologia. Em cada preparação histológica, um mesmo número de campos de microscopia ao longo de cada secção, foi comparado em relação à densidade e à morfologia dos vasos capilares.

Os cortes histológicos (**Figura 11**) evidenciam a baixa densidade de vasos sangüíneos nas membranas expostas a 1500 µg/disco de SargA e de SargB (**Figura 11. C**), bem como à associação entre heparina (50 IU/disco) e hidrocortisona (156 µg/disco) – controle positivo (**Figura 11. B**), em comparação à densidade de vasos no controle com veículo (**Figura 11. A**).

Foram observadas estruturas semelhantes a vesículas, contendo substância hetero-corada com eosina – efeito também verificado nas membranas do controle positivo – e alterações no calibre dos vasos sangüíneos. Outras anomalias ao nível dos vasos vitelinos capilares incluem diversos pontos de microruptura e redução na espessura da parede vascular, nas membranas expostas ao SargA (1500 µg/disk), tanto isoladamente (**Fig. 11. C**) como na associação com 156 µg/disco de hidrocortisona (**Fig. 11. D**).

Os efeitos acima descritos, sobre a espessura e a integridade da parede vascular, não foram observados nas membranas tratadas com o SargB (1500 µg/disk) isoladamente (**Figura 11. E**), mas foram detectadas micro-rupturas em vasos das membranas expostas ao SargB (1500 µg/disk) em associação com 156 µg/disco de hidrocortisona (**Figura 11. F**).

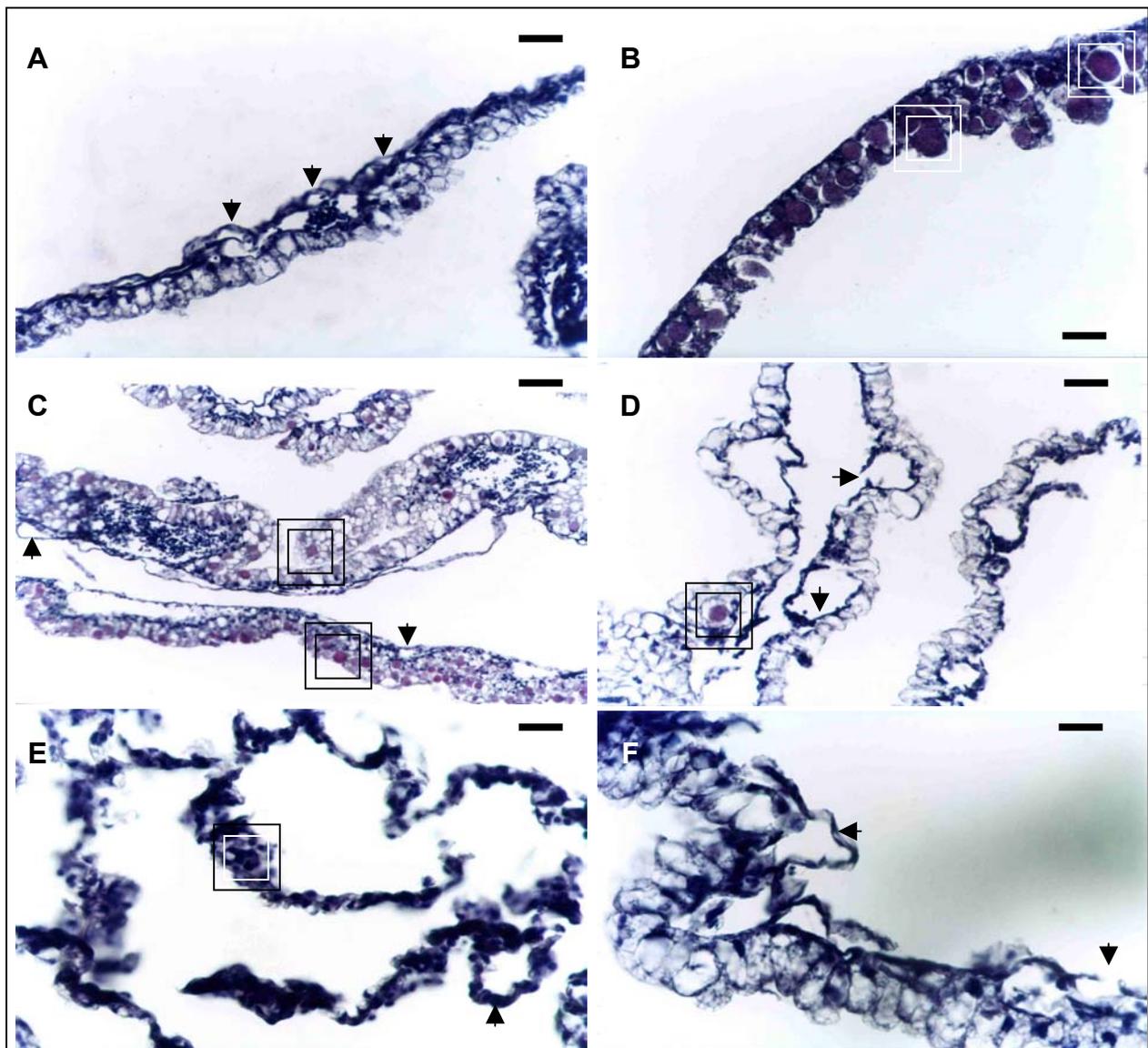


Figura 11 - Imagens fotográficas de secções histológicas (5 μm) de membranas de vesículas vitelínicas de embriões de galinha de 4 dias de idade, nos tratamentos (via suportes de metilcelulose): **(A)** Água ultrafiltrada (veículo; controle); **(B)** 50 UI/disco de heparina mais 156 μg de hidrocortisona (controle positivo); **(C)** 1500 μg de SargA; **(D)** 1500 μg de SargA associado a 156 μg de hidrocortisona; **(E)** 1500 μg de SargB; **(F)** 1500 μg de SargB associado a 156 μg de hidrocortisona;. As lâminas foram coradas através do método de hematoxilina e eosina. Os vasos sanguíneos e as estruturas hetero-coradas pela eosina (coloração vermelha) são indicadas, respectivamente, através de setas e retângulos. Aumento: Barras (A – E) 150 μm ; (F) 300 μm .

4.2.1.4. *Morfogênese embrionária no período da vasculogênese*

4.2.1.4.1. *Análise da morfogênese de embriões incubados in vivo*

Inicialmente, para avaliar se a redução no número de vasos sangüíneos, em resposta aos tratamentos com SargA ou SargB poderia resultar em modificações no padrão de morfogênese embrionária, foi determinado o comprimento total dos embriões de 96h de incubação (E4; idade de 4 dias) (**Figura 12.A**). Essa figura mostra que tanto SargA como SargB (1500 µg/disco), reduziram significativamente ($P < 0,01$) o comprimento total dos embriões para 34,7% e 39,6%, respectivamente, do comprimento embrionário relativo ao controle (veículo). Constatou-se a existência de correlação entre o comprimento dos embriões e a atividade antivasculogênica provocada tanto pelo SargA (99 %; $R^2 = 98,7$ %), como pelo SargB (76 %; $R^2 = 61,0$).

Na seqüência, foi calculada a percentagem de comprimento cefálico dos embriões estudados acima (inset da **Figura 12.B**). No presente trabalho, essa percentagem foi considerada parâmetro de morfogênese, em função da relevância da medida de comprimento da cabeça em relação ao comprimento total, durante o período de desenvolvimento embrionário.

A percentagem de comprimento cefálico (CCV/CCC) está relacionada à taxa de crescimento da região cefálica, i.é., a taxa de crescimento no segmento corpóreo entre a flexura cefálica e a flexura cervical (eixo CCV), em relação à taxa de crescimento no embrião total, dado pela somatória dos eixos CCV + CVC (segmento entre a flexura cervical e a flexura caudal).

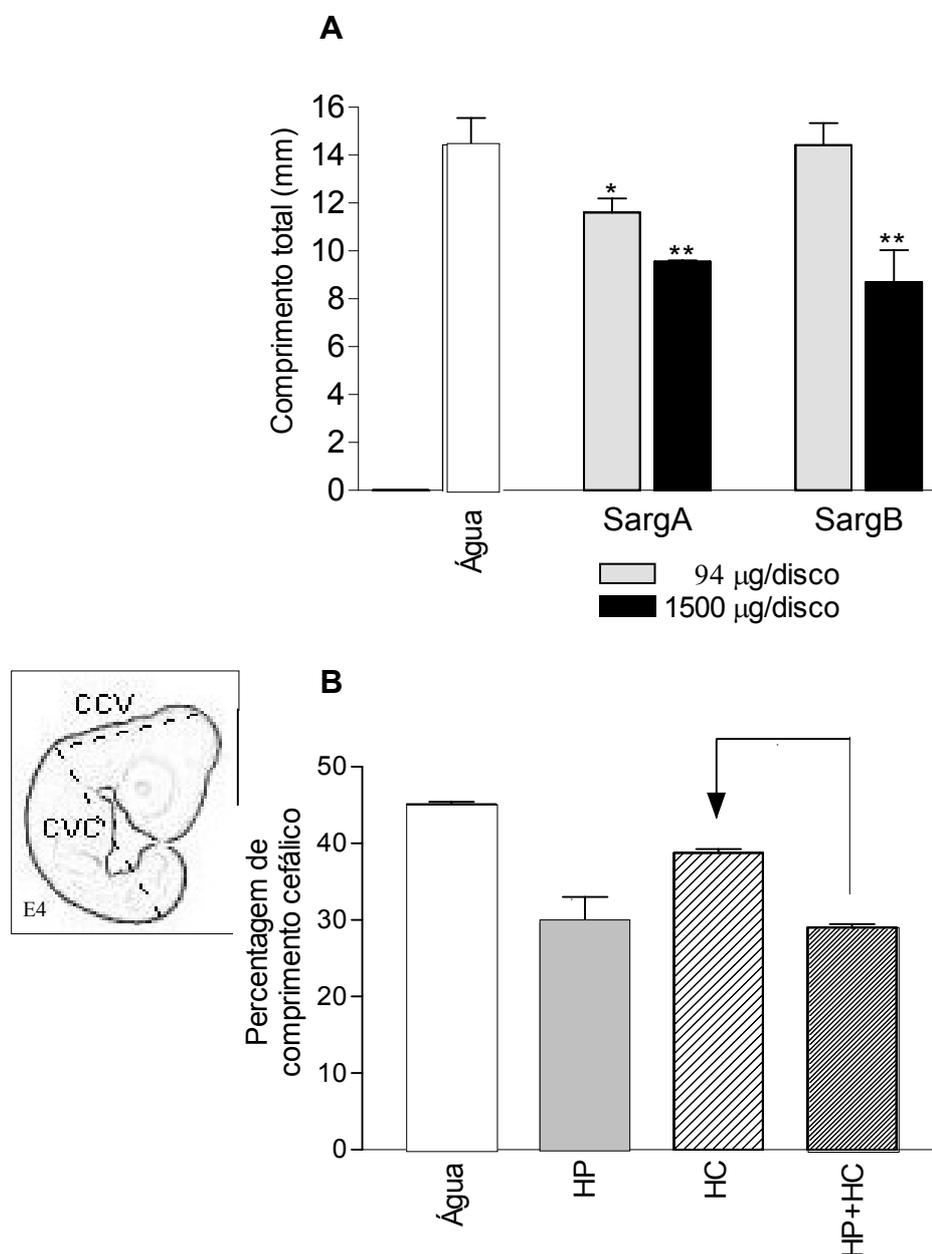


Figura 12 - (A) Atividade dos polissacarídeos SargA e SargB na biometria de embriões de galinha na idade E4 (4 dias de incubação) com base no comprimento total (cefálico – cervical – caudal). **(B)** Efeitos da administração (na idade de 2 dias) de heparina (HP; 50 UI) e hidrocortisona (HC; 156 µg/disco), isoladamente e em associação (controle positivo), sobre a morfogênese dos embriões de galinha (período de tratamento de 48 – 96 h), com base na porcentagem de comprimento cefálico (segmento corpóreo CCV) (*inset* em **B**). Discos de metilcelulose contendo somente água ultrafiltrada (veículo) foram utilizados como controle. Cada coluna e barra vertical representam respectivamente a média ± E.P.M. de 8 embriões, e os asteriscos denotam modificações estatisticamente significativas da morfogênese em relação ao controle (água) como também entre os dois grupos tratados com HC, ao nível de **P < 0,01 e *P < 0,05, respectivamente (ANOVA seguida do teste LSD).

De acordo com o critério descrito na metodologia, quando a percentagem de comprimento cefálico for significativamente maior, ou menor, do que o respectivo valor no controle na idade de 4 dias ($45 \pm 0.33 \%$), a taxa de crescimento no eixo corpóreo anterior (CCV) foi alterada, o que pode ser considerado um indicativo de mudança no padrão de morfogênese embrionária.

Heparina (50 UI/ disco) e hidrocortisona (156 $\mu\text{g}/\text{disco}$) administradas isoladamente e em associação modificaram o padrão de morfogênese embrionária na idade de 4 dias, reduzindo de modo significativo a percentagem de comprimento cefálico para 29, 39 e 29%, respectivamente, em relação ao controle (**Figura 12.B**).

Os tratamentos com SargA e SargB, isoladamente, modificaram o padrão de morfogênese embrionária na idade de 4 dias exclusivamente na concentração de 1500 $\mu\text{g}/\text{disco}$ (**Figura 13**), tendo as duas frações de polissacarídeos reduzido significativamente ($P < 0,01$) a percentagem de comprimento cefálico dos embriões para 38 e 35%, respectivamente, comparado com o controle (45 %).

Na associação com a hidrocortisona (156 $\mu\text{g}/\text{disco}$), o polissacarídeo SargA, nas concentrações de 6; 94; 375 e 1500 $\mu\text{g}/\text{disco}$, reduziu a percentagem de comprimento cefálico para 41, 40, 38 e 22%, respectivamente, comparado com o controle (45 %) (**Figura 13.A**). Esta figura mostra que o polissacarídeo SargB (24, 94, 357 e 1500 $\mu\text{g}/\text{disco}$), em associação com a hidrocortisona (156 $\mu\text{g}/\text{disco}$), também reduziu a percentagem de comprimento cefálico (36, 38, 31 e 29%, respectivamente) comparado com o controle (45 %) (**Figura 13.B**).

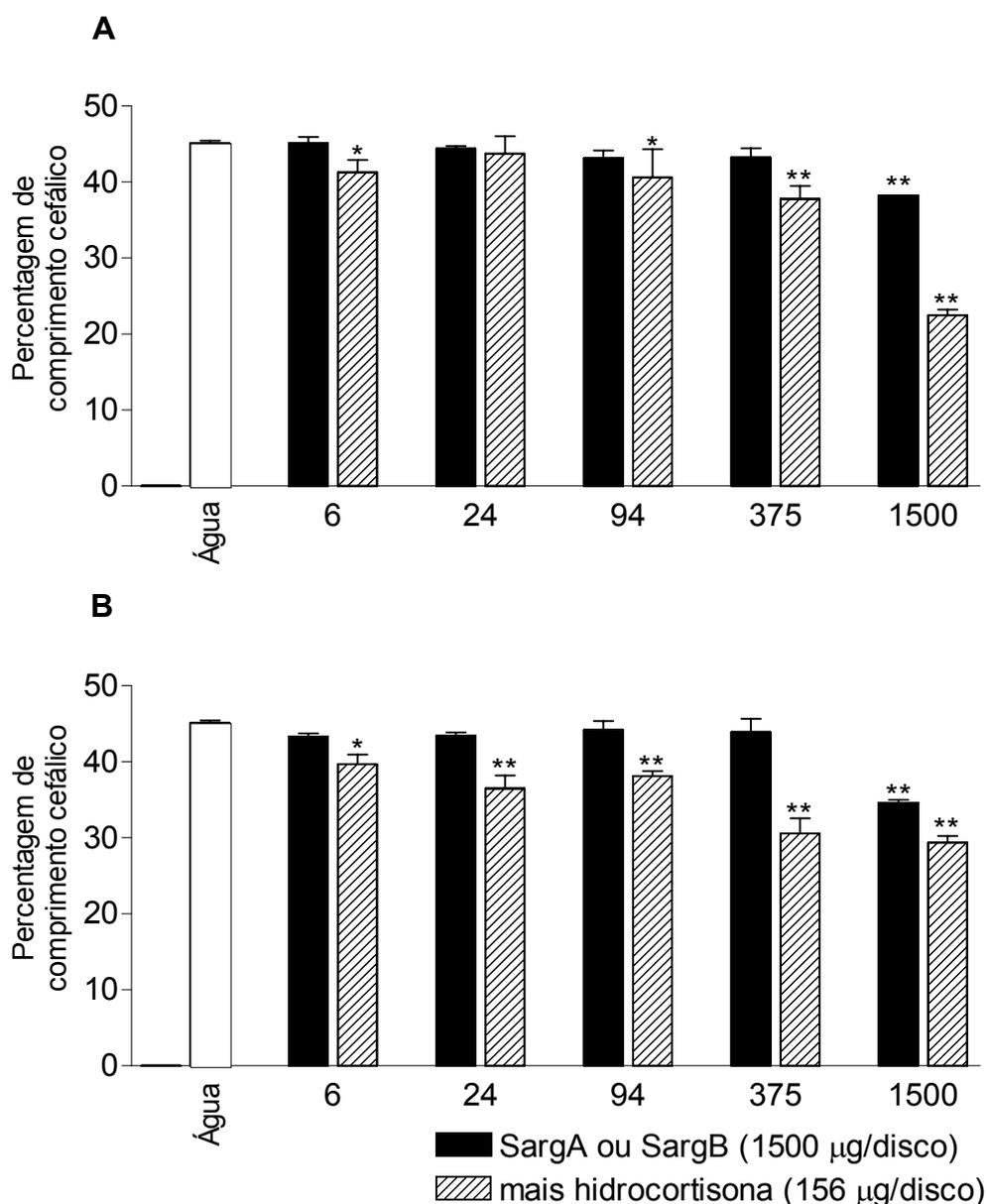


Figura 13 - Efeitos dos polissacarídeos SargA (**A**) e SargB (**B**) administrados (na idade de 2 dias), isoladamente e em associação com a hidrocortisona, sobre a morfogênese de embriões de galinha de 4 dias de idade, com base na percentagem de comprimento cefálico (CCV). Discos de metilcelulose contendo somente água ultrafiltrada (veículo) foram utilizados como controle. Cada coluna e barra vertical representam respectivamente a média \pm E.P.M. de 8 embriões, e os asteriscos denotam modificações estatisticamente significativas da morfogênese em relação ao controle (água), ao nível de $**P < 0,01$ e $*P < 0,05$ (ANOVA seguida do teste LSD).

Na seqüência, foram determinados os efeitos da administração de SargA ou do SargB (1500 µg/disco) sob a ação concomitante do bFGF (50 ng/disco) – um fator angiogênico capaz de atuar também como um morfógeno sobre a percentagem de comprimento cefálico (**Figura 14**). Verificou-se que o tratamento com o bFGF, isoladamente, não modificou o parâmetro de morfogênese embrionária na idade de 4 dias em comparação com o controle (45 %) e os polissacarídeos por si só não modificaram a resposta ao tratamento com bFGF.

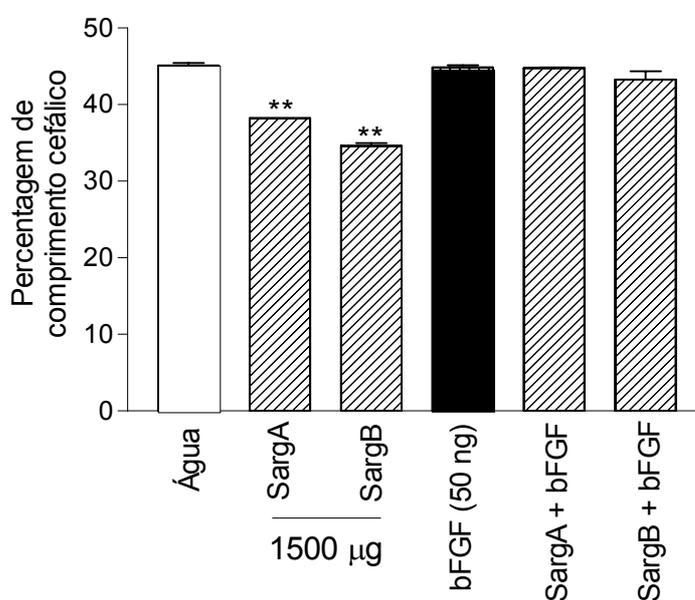


Figura 14 - Percentagem de comprimento cefálico (CCV) de embriões de galinha de 4 dias de idade, cultivados *in ovo*, nos tratamentos (realizados na idade de 2 dias) com os polissacarídeos SargA ou SargB isoladamente ou em associação com bFGF. Discos de metilcelulose contendo somente água ultrafiltrada (veículo) foram utilizados como controle. Cada coluna e barra vertical representam respectivamente a média \pm E.P.M. de 8 embriões, e os asteriscos denotam modificações estatisticamente significativas da morfogênese em relação ao controle (água), ao nível de $**P < 0,01$ (ANOVA seguida do teste LSD).

Os resultados acima, concernentes à atividade dos polissacarídeos SargA e SargB no processo de morfogênese dos embriões de 4 dias de idade cultivados *in vivo* (48 – 96 h de tratamento), foram comparados com os dados obtidos com embriões de 3,5 dias de idade cultivados *in vitro* (36 – 84 h de tratamento) (**Figura 15.A**). Esta figura mostra que ocorreu uma redução na percentagem de comprimento cefálico dos embriões, em resposta aos tratamentos (125, 250 e 500 $\mu\text{g}/\text{disco}$), no grupo tratado com o polissacarídeo SargB, bem como, no grupo tratado com o SargA, apenas nas duas últimas concentrações.

4.2.1.4.2. *Análise da morfogênese de embriões incubados in vitro*

Para determinar se os polissacarídeos estariam modificando a percentagem de comprimento cefálico dos embriões de 4 dias em razão de uma redução específica do comprimento no eixo cefálico – cervical (CCV), e não devido a uma elevação do comprimento no eixo cervical – caudal (CVC), foram confrontadas ambas as medidas de eixo corpóreo (CCV e CVC) obtidas dos embriões incubados *in vitro* (**Figura 15.B; C**).

Na análise desses resultados, não foram constatadas diferenças significativas ($P < 0,05$) quanto à medida de comprimento no eixo CVC entre os grupos tratados com SargA ou SargB em relação aos respectivos controles. Tais resultados indicam que a desproporção envolvendo os eixos CCV e CVC é devida especificamente à redução na taxa de crescimento da cabeça dos embriões, refletida na redução da percentagem de comprimento cefálico.

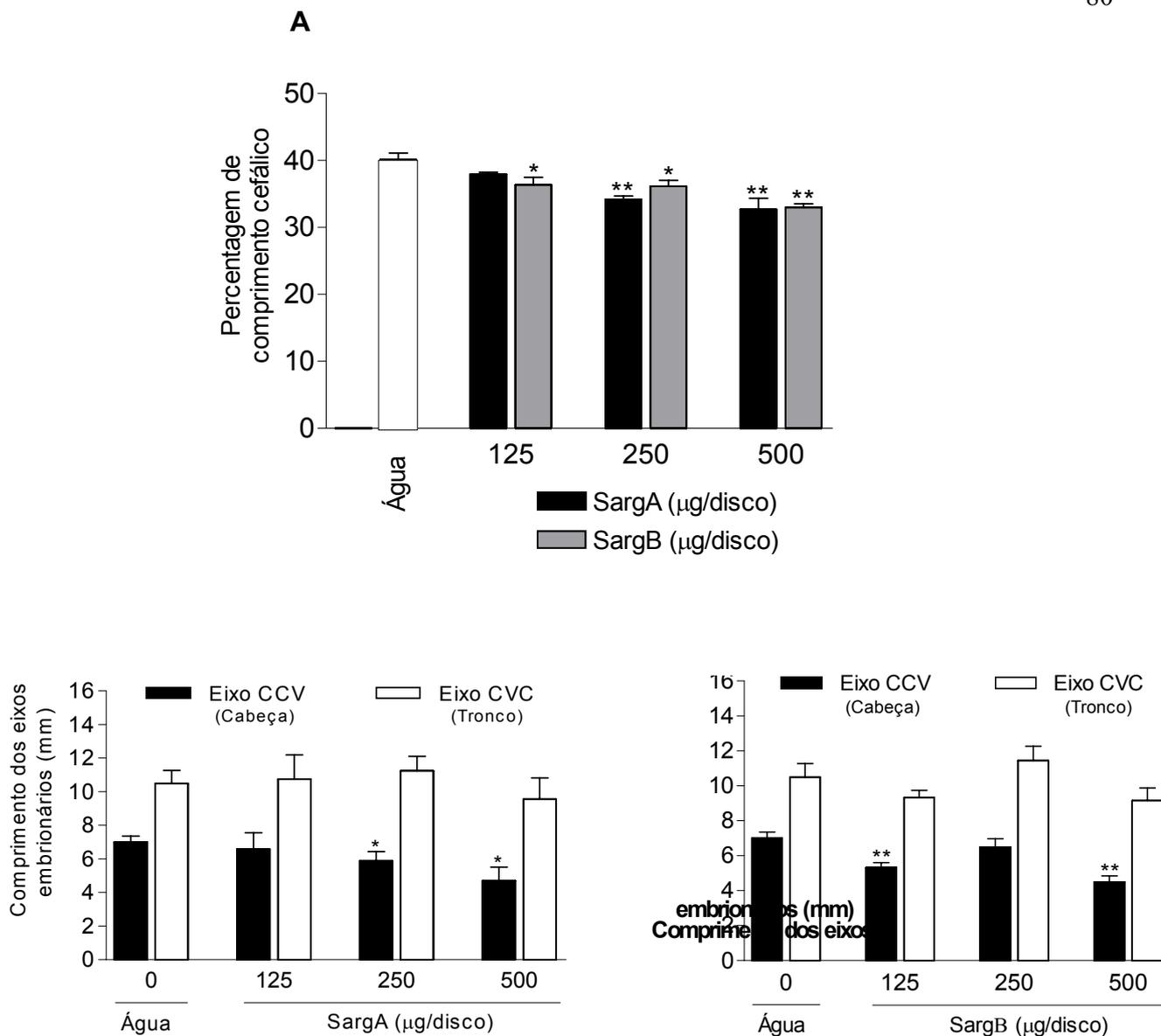


Figura 15 - Percentagem de comprimento cefálico (CCV) de embriões de galinha de 3,5 dias de idade, cultivados *in vitro* (84h de incubação) nos tratamentos (realizados na idade de 1,5 dia) com os polissacarídeos SargA ou SargB (**A**). Discos de metilcelulose contendo somente água ultrafiltrada (veículo) foram utilizados como controle. Nesses embriões, foram comparadas as medidas de comprimento nos segmentos cefálico – cervical (eixo CCV) e cervical – caudal (eixo CVC), nos tratamentos com 1500 µg/disco de SargA (**B**), ou de SargB (**C**). Cada coluna e barra vertical representam respectivamente a média \pm E.P.M. de 8 embriões, e os asteriscos denotam modificações estatisticamente significativas da morfogênese em relação ao controle (água), ao nível de **P < 0,01 e *P < 0,05 (ANOVA seguida do teste LSD).

A percentagem de comprimento cefálico de embriões de 3,5 dias de idade cultivados *in vitro* (período de tratamento de 36 – 84 h) foi significativamente reduzida em resposta à exposição ao t-Resv (0; 0,005; 0,05 ou 0,5 µg/disco) para 40%; 29%, 29% ($P < 0,01$) e 32% ($P < 0,05$), respectivamente, comparado com o controle (água) (**Figura 16.A**). No grupo de embriões tratados com Et-OH (veículo na solução estoque de t-Resv), a percentagem de comprimento cefálico não diferiu estatisticamente do controle (água).

A comparação entre as medidas dos eixos cefálico – cervical (CCV) e cervical – caudal (CVC), nos embriões tratados com t-Resv, revelou diferenças exclusivamente no comprimento do segmento do tronco (CVC), o qual mostrou-se significativamente maior que a medida CVC no grupo controle (água), sendo que o comprimento no segmento cefálico (CCV) não sofreu alteração estatisticamente significativa (**Figura 16.B**). Este padrão de comprimento é o oposto do observado nos embriões tratados com os polissacarídeos, em que foi registrada redução específica do segmento cefálico (CCV) (**Figura 15.B;C**).

As modificações relativas no comprimento cefálico, observadas nos tratamentos realizados com SargA e SargB, não resultaram em distorções ou qualquer outra evidência de embriotoxicidade. Não foi verificada mortalidade entre embriões tratados com os polissacarídeos e, monitorados até o 8º dia de incubação.

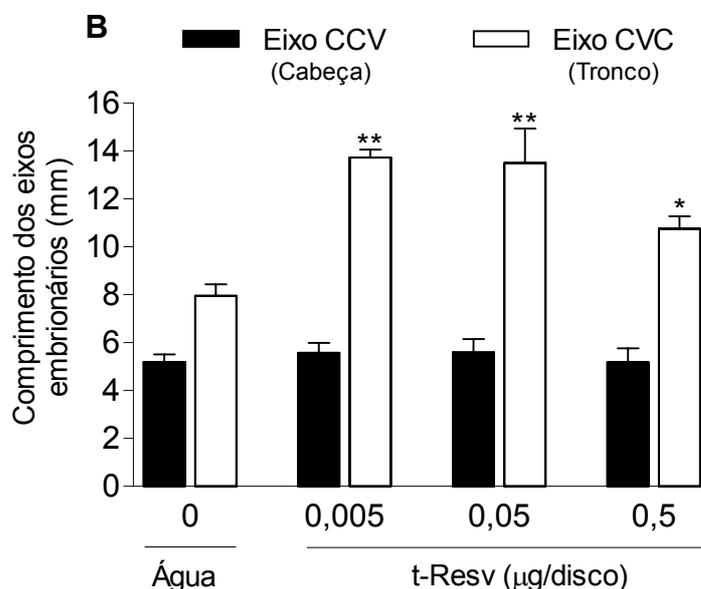
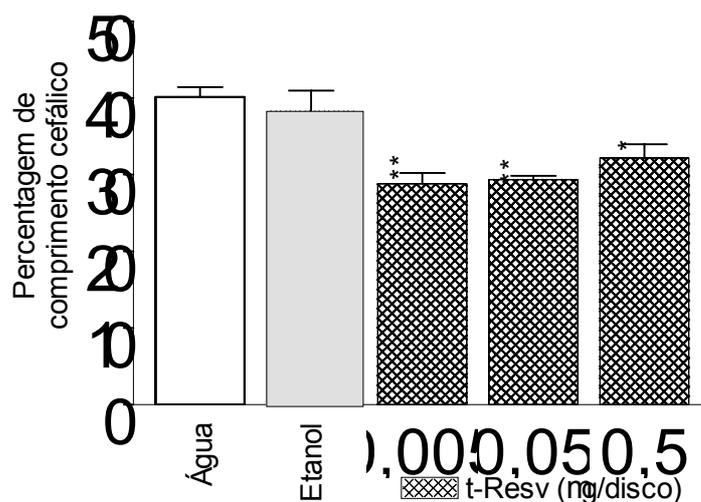


Figura 16 - (A) Porcentagem de comprimento cefálico (CCV) de embriões de galinha de 3,5 dias (84h) de idade, cultivados *in vitro*, nos tratamentos (no 2º dia de idade) com trans-resveratrol (t-Resv) em relação ao controle (água). Também foi avaliado o efeito do etanol (veículo da solução-estoque de t-Resv). (B) Adicionalmente foram comparadas as medidas de comprimento nos segmentos cefálico – cervical (eixo CCV) e cervical – caudal (eixo CVC) dos embriões. Discos de metilcelulose contendo somente água ultrafiltrada (veículo) foram utilizados como controle. Cada coluna e barra vertical representam respectivamente a média \pm E.P.M. de 8 embriões, e os asteriscos denotam modificações estatisticamente significativas da morfogênese em relação ao controle, ao nível de **P < 0,01 e *P < 0,05 (ANOVA seguida do teste LSD).

4.2.2. Análise da angiogênese

4.2.2.1. Angiogênese em embriões de galinha *in vivo*

O desenvolvimento de vasos sangüíneos formados a partir de vasos pré-existentes foi analisado através do ensaio da membrana corioalantóica (*CAM-assay*) para determinar a atividade dos polissacarídeos SargA e SargB e associações, sobre a angiogênese (**Figura 17**). As membranas do grupo controle (veículo) apresentaram uma média de 103 vasos nos limites dos discos-suporte de metilcelulose.

As **figuras 17.F e 18** mostram que no controle positivo, realizado com a associação de heparina (HP; 50 UI/disco) com a hidrocortisona (HC; 156 µg/disco), o número de capilares sangüíneos na membrana corioalantóica foi reduzido em 90%.

Comparando-se os efeitos da HC (156 µg/disco) e da HP (50 UI/disco) administrados isoladamente, verificou-se que o glicocorticóide reduziu em 30% o número de vasos, enquanto que a heparina não produziu efeito inibitório significativo sobre a angiogênese (**Figura 18**).

A análise da diferença entre as respostas, acima, mostra que a HP potencializou ($\Delta > 1$) fortemente o efeito antiangiogênico da HC ($\Delta = 2,37$), em comparação com o controle (**Tabela 2**).

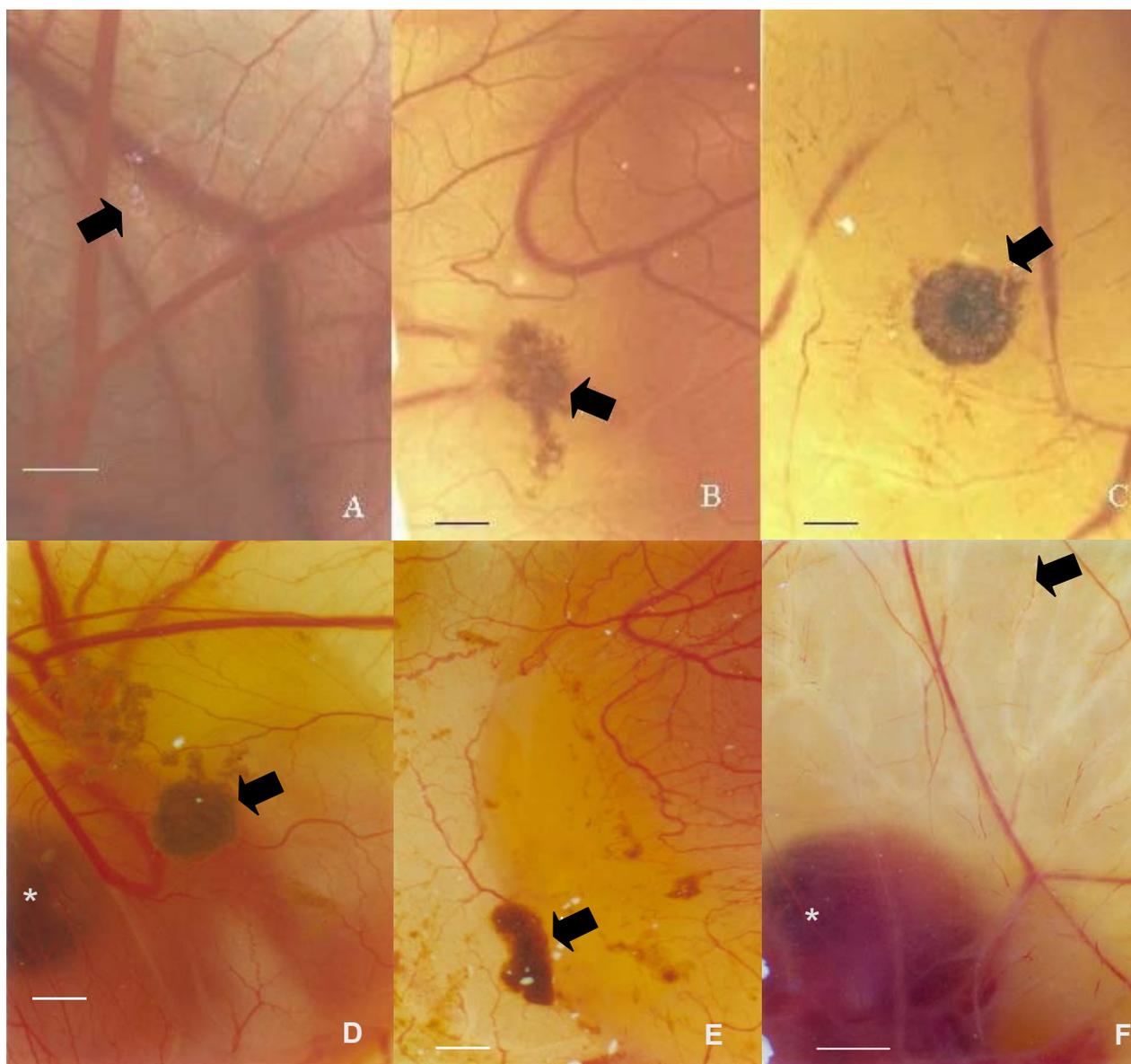


Figura 17 - Imagens fotográficas mostrando o efeito dos polissacarídeos SargA e SargB sobre a angiogênese na membrana corioalantóica do embrião de galinha na idade de 8 dias (E8). Um único disco-suporte (setas) contendo as substâncias em estudo foi implantado no 6º dia de incubação (E6), sobre cada membrana, onde capilares ainda estavam crescendo; **(A)** Controle negativo (água ultrafiltrada; veículo); **(B)** SargA, 1500 µg/disco; **(C)** SargA + hidrocortisona (1500 µg/disco + 156 µg/disco; **(D)** SargB, 1500 µg/disco; **(E)** SargB + hidrocortisona (1500 µg/disco + 156 µg/disco); **(F)** Heparina e hidrocortisona (50 UI + 156 µg/disco; controle positivo). Vesícula óptica dos embriões (asterisco). Aumento: Barras (2 mm).

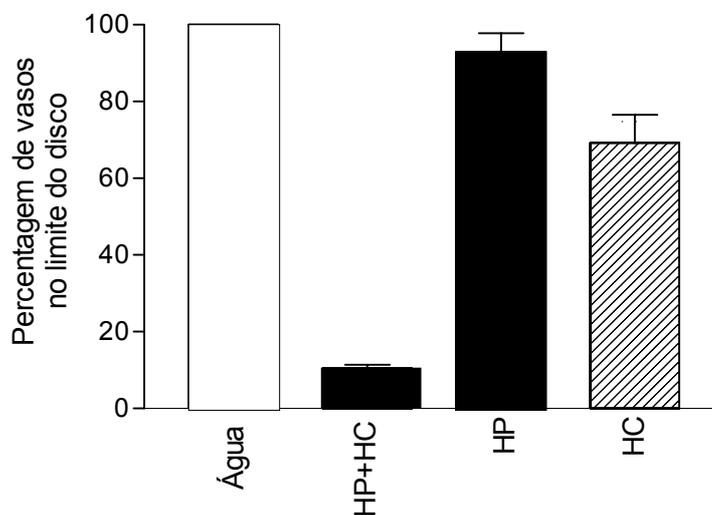


Figura 18 - Efeitos da administração (na idade de 6 dias) de heparina (HP; 50 UI) e hidrocortisona (HC; 156 μ g/disco), isoladamente e em associação (controle positivo de inibição), sobre membranas corioalantóicas de embriões de galinha de 8 dias de idade, cultivados *in ovo*. Discos de metilcelulose contendo somente água ultrafiltrada (veículo) foram utilizados como controle. Os resultados são expressos em porcentagem de vasos capilares no limite do disco-suporte em relação ao controle. Cada coluna e barra vertical representam respectivamente a média \pm E.P.M. de 8 ovos, e os asteriscos denotam uma inibição estatisticamente significativa da angiogênese em relação ao controle (água), ao nível de $**P < 0,01$ (ANOVA seguida do teste LSD).

Tabela 2 – Percentagem de inibição da angiogênese na membrana corioalantóica do embrião de galinha (n = 8) no intervalo de idade de 6 a 8 dias de incubação, com base na redução do número de vasos ao redor do implante de metilcelulose. Os efeitos da administração do polissacarídeo SargA, ou SargB ($\mu\text{g}/\text{disco}$), ou HP (50 UI/ disco) e de 156 $\mu\text{g}/\text{disco}$ de hidrocortisona (HC) foram comparados na ausência e na presença de HC (s/HC e c/HC, respectivamente), através da seguinte equação: $\Delta = \text{polissacarídeo c/HC} \div (\text{polissacarídeo s/HC} + [\text{HC}])$, onde o intervalo $[0 < \Delta = 1]$ pode corresponder à somação (efeito aditivo) e $[\Delta > 1]$ refere-se à potencialização do efeito da HC pelo polissacarídeo.

Polissac.	s/HC	c/HC	s/HC+[HC*]	Δ
HP	7,0	89,6	37,8	2,37
SargA (μg)				
2	5,3	30,8	36,2	0,85
18	35,2	44,2	66,0	0,67
167	61,9	79,1	92,7	0,85
1500	64,1	81,3	94,9	0,86
SargB (μg)				
2	57,3	93,3	32,8	2,84
18	62,9	96,1	93,7	1,02
167	55,1	98,3	85,9	1,14
1500	97,8	100,0	128,6	0,78

(*) Percentagem de inibição da angiogênese, no tratamento com HC (71 vasos), em relação ao controle (103 vasos): 30,8 %.

Os tratamentos com SargA e SargB (2 – 1500 $\mu\text{g}/\text{disco}$) produziram efeito angiostático significativo sobre a membrana corioalantóica, tendo reduzido o número de novos vasos em 35 – 64 % e 57 – 98 % respectivamente em relação ao controle (**Figura 19**).

A **Figura 19** mostra que em associação com a hidrocortisona (156 $\mu\text{g}/\text{disco}$) a administração do polissacarídeo (SargA ou SargB; 2 - 1500 $\mu\text{g}/\text{disco}$) elevou o efeito inibitório sobre a angiogênese embrionária, tendo reduzido em 30 - 81 % e 93 - 100 % respectivamente o número de vasos corioalantóicos.

Em relação à diferença entre as respostas dos polissacarídeos em presença ou na ausência de HC (Δ), a **tabela 2** demonstra que o polissacarídeo SargA (6 – 375 $\mu\text{g}/\text{disco}$; $\Delta = 1,12 - 1,42$) produziu, no máximo, um efeito aditivo (somação; $\Delta = 0,67 - 0,86$, respectivamente) na resposta antiangiogênica da HC (156 $\mu\text{g}/\text{disco}$). É possível verificar, ainda, que durante o processo de angiogênese o polissacarídeo SargB (2 – 167 $\mu\text{g}/\text{disco}$) foi capaz de potencializar o efeito inibitório da HC ($\Delta = 2,84 - 1,02$ respectivamente).

A administração de SargA ou SargB em associação com o bFGF foi capaz de reverter parcialmente (em 68 e 38 % respectivamente) o efeito pró-angiogênico do bFGF isoladamente (**Figura 20**). O efeito antiangiogênico do tratamento com SargA associado ao bFGF foi significativo ($P < 0,01$) em relação ao controle (Água). No tratamento através da associação do SargB com o bFGF o resultado não diferiu do observado no controle. Além disso, observou-se que o efeito da associação de SargA ou SargB com o bFGF diferiu estatisticamente ($P < 0,01$) do tratamento realizado com o bFGF isoladamente.

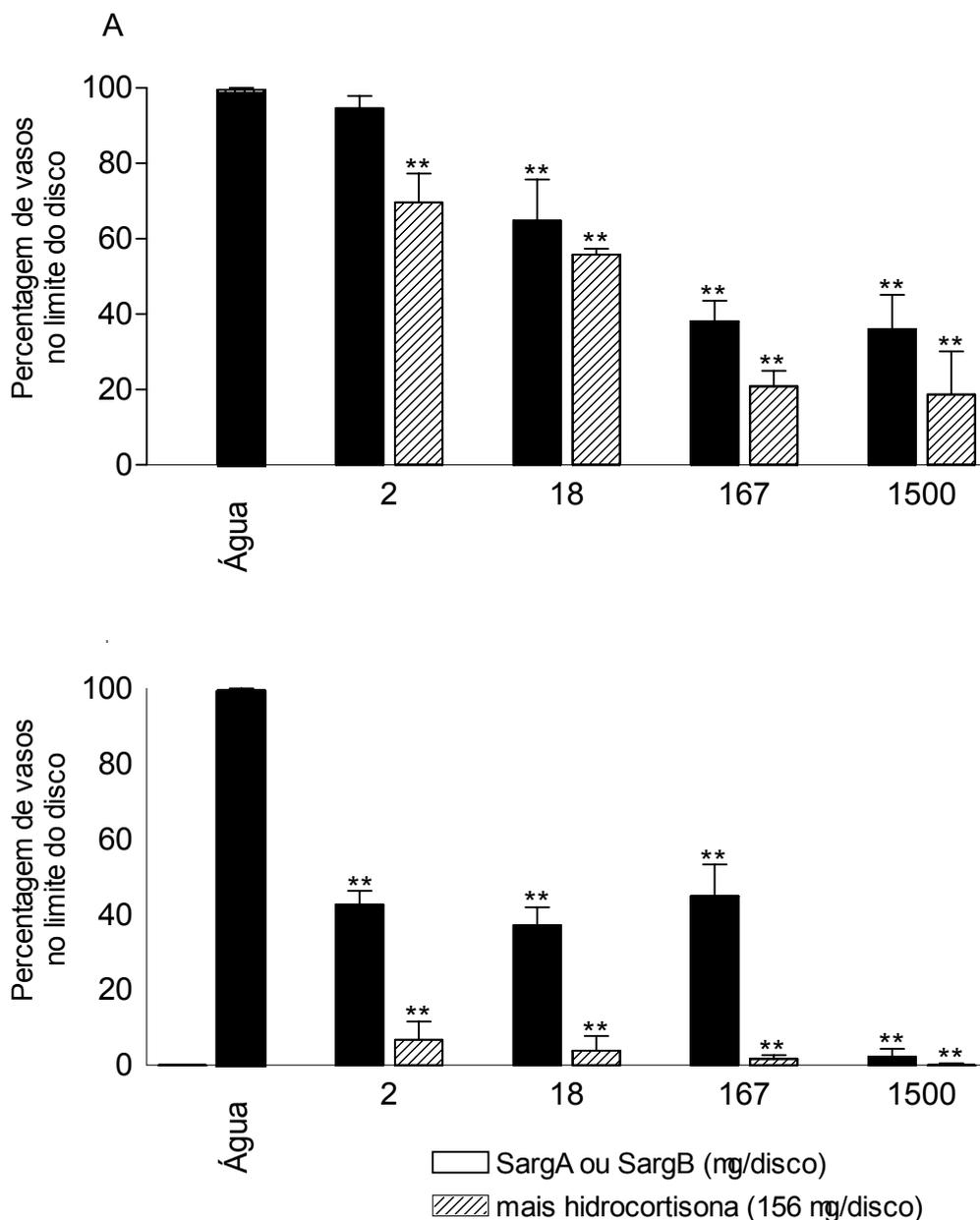


Figura 19 - Efeitos dos polissacarídeos SargA (A) e SargB (B), administrados (na idade de 6 dias) isoladamente e em associação com a hidro cortisona, sobre membranas corioalantóicas de embriões de galinha de 8 dias de idade, cultivados *in ovo*. Discos de metilcelulose contendo somente água ultrafiltrada (veículo) foram utilizados como controle. Os resultados são expressos em percentagem de vasos capilares no limite do disco-suporte em relação ao número de vasos no controle. Cada coluna e barra vertical representam respectivamente a média \pm E.P.M. de 8 ovos, e os asteriscos denotam uma inibição estatisticamente significativa da angiogênese em relação ao controle (água) ao nível de $**P < 0,01$ (ANOVA seguida do teste LSD).

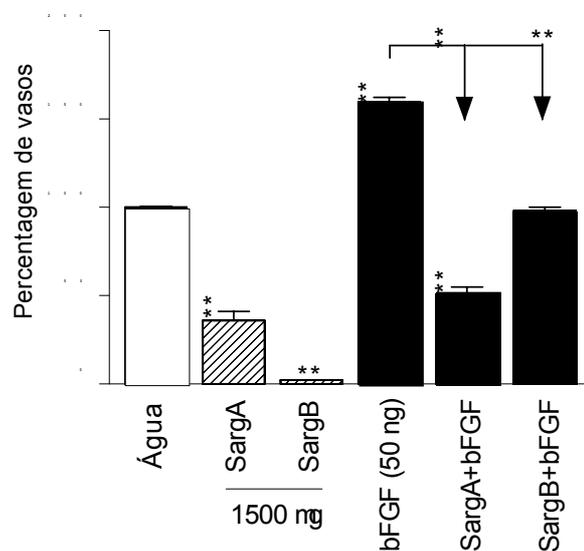


Figura 20 - Percentagem de microvasos na membrana corioalantóica de embriões de galinha de 8 dias de idade, cultivados *in ovo*, nos tratamentos (no 6º dia) com os polissacarídeos isoladamente ou em associação com bFGF. Discos de metilcelulose contendo somente água ultrafiltrada (veículo) foram utilizados como controle. Os resultados são expressos em percentagem de vasos capilares no limite do disco-suporte em relação ao número de vasos no controle. Cada coluna e barra vertical representam respectivamente a média \pm E.P.M. de 8 ovos, e os asteriscos denotam uma inibição estatisticamente significativa da angiogênese ao nível de *P < 0,05 e **P < 0,01, em relação ao controle (água), bem como na comparação entre o tratamento com o bFGF e os dois grupos tratados com a associação de SargA e SargB com bFGF (setas) (ANOVA seguida do teste LSD).

Não foram observadas anomalias morfológicas nos embriões de 8 dias, nem trombos ou qualquer outra anormalidade visível nos vasos corioalantóicos expostos aos polissacarídeos e às demais substâncias estudadas.

4.2.2.1.1. *Morfogênese embrionária no período da angiogênese*

Para determinar se a inibição da angiogênese na membrana corioalantóica, em resposta aos tratamentos com os polissacarídeos, poderia modificar de modo característico a morfogênese dos embriões de galinha, foi inicialmente determinado o comprimento embrionário total (somatório dos eixos de segmento corpóreo CCV + CVC) na idade de 8 dias (**Figura 21.A**). Nenhum dos tratamentos com os polissacarídeos SargA e SargB, efetuados com duas das quatro concentrações utilizadas nos ensaios de angiogênese (18 e 1500 $\mu\text{g}/\text{disco}$), produziu alteração significativa ($P < 0,05$) sobre a medida de comprimento total dos embriões em relação ao controle (veículo; $29,62 \pm 1,28$ mm).

A percentagem de comprimento cefálico, utilizada como parâmetro de morfogênese para embriões de galinha no período de 8 dias de idade (E8; 8 dias de incubação) submetidos à avaliação do processo de angiogênese, seguiu os mesmos critérios utilizados anteriormente para embriões (E3,5 e E4; 3,5 e 4 dias de idade, respectivamente), que foram submetidos à avaliação do processo de vasculogênese. Assim, de acordo com o descrito anteriormente, quando a percentagem de comprimento cefálico (CCV/CCC) for significativamente maior ou menor do que o respectivo valor no controle (na idade de 8 dias; CCV/CCC = $35,32 \pm 0,06$ %), a taxa de crescimento no eixo corpóreo anterior (CCV) estaria alterada, indicando que ocorreu uma modificação no padrão de morfogênese embrionária.

Quando foram administradas isoladamente, HP (50 UI/disco) e HC (156 $\mu\text{g}/\text{disco}$) não modificaram o padrão de morfogênese embrionária. Quando em associação, essas duas substâncias modificaram significativamente ($P < 0,05$)

o padrão de morfogênese elevando a percentagem de comprimento cefálico em dois pontos percentuais (37%) em comparação com o controle (35%) (**Figura 21.B**).

Nos tratamentos realizados com os polissacarídeos SargA e SargB (2 – 1500 $\mu\text{g}/\text{disco}$), não foram observadas modificações estatisticamente significativas no padrão de morfogênese embrionária (**Figura 22**).

Também a associação entre o polissacarídeo SargA (6 – 1500 $\mu\text{g}/\text{disco}$) e a HC (156 $\mu\text{g}/\text{disco}$) não produziu modificações na morfogênese dos embriões (**Figura 22.A**). Diferentemente, o tratamento com SargB em associação com a HC modificou, à exceção da maior dose utilizada (1500 $\mu\text{g}/\text{disco}$), a percentagem de comprimento cefálico (CVC/CCC), elevando esta medida até seis pontos percentuais (18 $\mu\text{g}/\text{disco}$; 41%) aproximadamente, em relação ao controle (35%) (**Figura 22.B**).

Confrontando-se as medidas de comprimento nos segmentos CCV e CVC (*Inset* da **Figura 22.B**) de embriões nos tratamentos com SargB + HC (amostra em que se verificou aumento na percentagem de comprimento cefálico) constata-se que os valores correspondentes a essa percentagem (CCV/CCC) são decorrentes de uma redução no comprimento do tronco dos embriões (segmento CVC), especificamente. Este dado indica que, na idade de 8 dias, os embriões tratados com SargB + HC apresentaram um *deficit* de crescimento no todo ao invés de uma inibição do processo de crescimento na parte correspondente à cabeça (segmento cefálico, *i.é.*, eixo CCV), registrado nos embriões em idade de 4 dias.

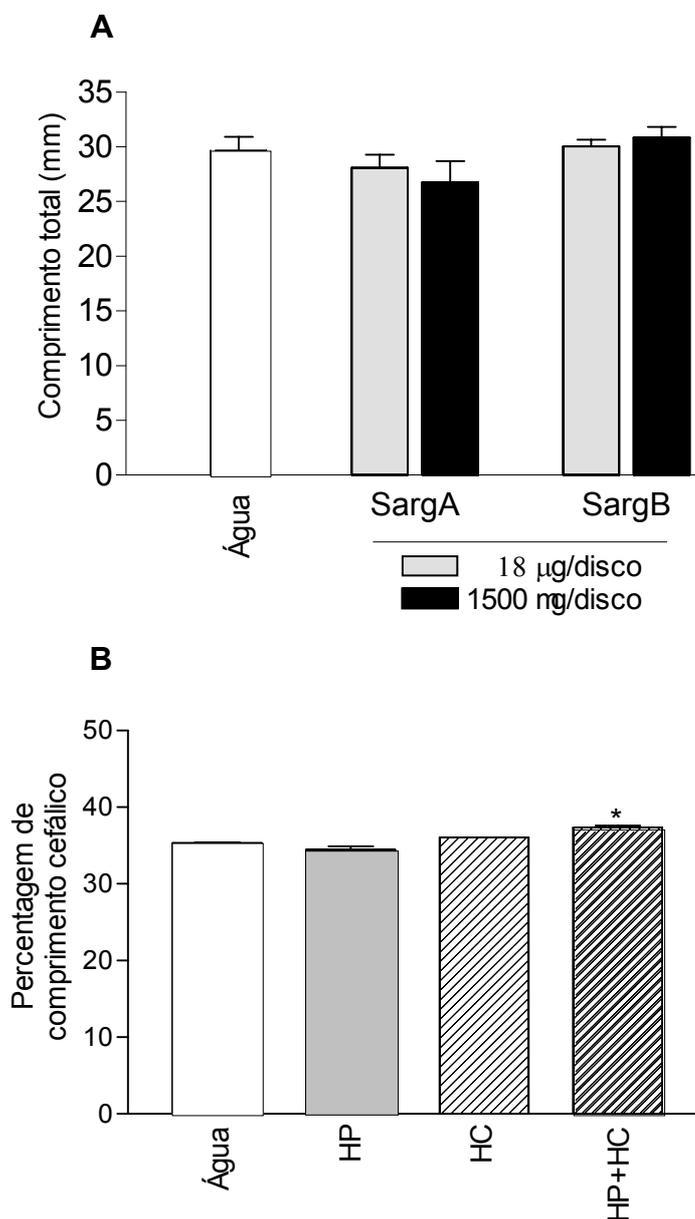


Figura 21 - **(A)** Atividade dos polissacarídeos SargA e SargB na biometria de embriões de galinha de 8 dias de idade com base no comprimento total (cefálico – cervical – caudal). **(B)** Efeitos da administração (no 6º dia de idade) de heparina (HP; 50 UI) e hidrocortisona (HC; 156 µg/disco), isoladamente e em associação (controle positivo), sobre a morfogênese de embriões de galinha de 8 dias de idade, com base na porcentagem de comprimento cefálico (segmento corpóreo CCV). Discos de metilcelulose contendo somente água ultrafiltrada (veículo) foram utilizados como controle. Cada coluna e barra vertical representam respectivamente a média \pm E.P.M. de 8 embriões e o asterisco denota uma modificação estatisticamente significativa da morfogênese em relação ao controle (água) ao nível de $*P < 0,05$ (ANOVA seguida do teste LSD).

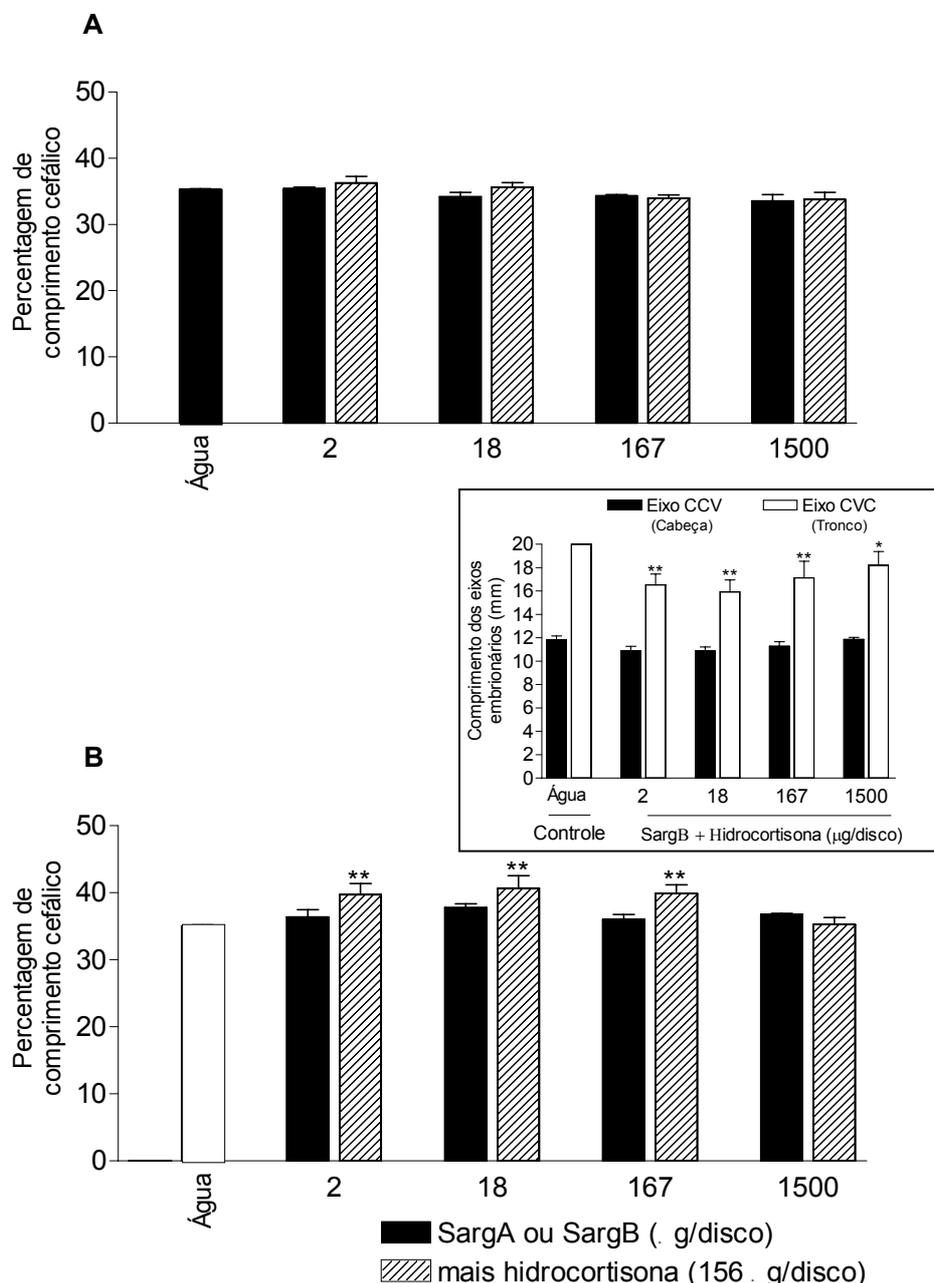


Figura 22 - Efeitos dos polissacarídeos SargA (**A**) e SargB (**B**), administrados (na idade de 6 dias) isoladamente e em associação com a hidrocortisona, sobre a morfogênese de embriões de galinha na idade de 8 dias, com base na porcentagem de comprimento cefálico (CCV). Foram comparadas as medidas de comprimento nos segmentos cefálico – cervical (eixo CCV) e cervical – caudal (eixo CVC), nos tratamentos com o SargB (*inset* em **B**). Discos de metilcelulose contendo somente água ultrafiltrada (veículo) foram utilizados como controle. Cada coluna e barra vertical representam respectivamente a média \pm E.P.M. de 8 embriões e os asteriscos denotam modificações estatisticamente significativas da morfogênese em relação ao controle (água), ao nível de $**P < 0,01$ e $*P < 0,05$ (ANOVA seguida do teste LSD).

Do mesmo modo que o realizado na amostra de embriões em idade de 4 dias (E4), foram determinados os efeitos da administração de SargA e SargB (1500 μ g/disco) sob a ação concomitante do bFGF (50 ng/disco), na percentagem de comprimento cefálico (CCV/CCC) de embriões em idade de 8 dias (E8) (**Figura 23**). Esta figura mostra que nos tratamentos efetuados com bFGF apenas, bem como com SargA ou SargB isoladamente, ou em associação com o bFGF, não foram observadas modificações no padrão de morfogênese embrionária em relação ao controle.

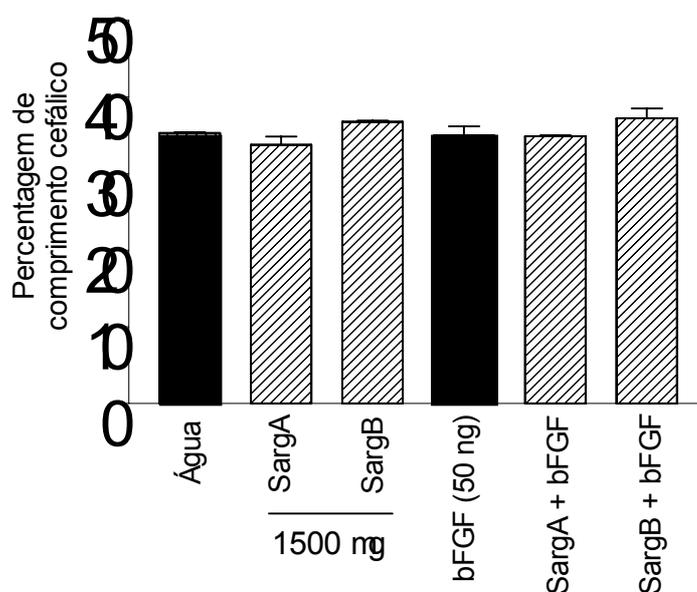


Figura 23 - Percentagem de comprimento cefálico (eixo cefálico – cervical; CCV) de embriões de galinha de 8 dias de idade, cultivados *in ovo*, nos tratamentos com os polissacarídeos SargA e SargB isoladamente ou em associação com bFGF em relação ao controle. Discos de metilcelulose contendo somente água ultrafiltrada (veículo) foram utilizados como controle. Cada coluna representa a média \pm EPM de 8 embriões (*P < 0,05). ANOVA seguida do teste LSD.

4.2.2.2. Angiogênese induzida em camundongos adultos

Conforme a justificativa que consta no item 3.4.4 da metodologia, nos ensaios *in vivo* com animais adultos realizados no presente estudo, foi utilizado exclusivamente um dos polissacarídeos. No presente experimento sobre a angiogênese em animal adulto, optou-se pela utilização do polissacarídeo SargA, pois o mesmo apresentou um rendimento relativamente maior que o polissacarídeo SargB e revelou perfis de ressonância mais nítidos, com menor teor de ruído nos espectros, o que possibilitou uma melhor condição de avaliação dos respectivos constituintes químicos. A opção pelo SargA está baseada também na análise dos resultados referentes às atividades antivasculogênica e, principalmente, antiangiogênica, sendo que as curvas de dose-efeito referentes ao polissacarídeo SargA foram as que apresentaram um perfil de respostas mais uniforme sobre as membranas embrionárias vascularizadas.

A angiogênese é um processo típico de formação de vasos sangüíneos em indivíduos adultos, no qual os novos capilares são formados a partir de brotamentos de vasos pré-existentes). Para investigar se o efeito antiangiogênico do SargA, verificado em embriões, seria reproduzido na vascularização (angiogênese) do animal adulto, foi realizado o ensaio do implante s.c. de gelfoam, em camundongos. Neste experimento, foi avaliada a formação de vasos sangüíneos no interior do *plug* de gelfoam implantado sob a pele dos animais, adjacente ao local da cirurgia (**Figura 24**).

Conforme a metodologia, decorridos 15 dias da cirurgia de implante, os animais foram sacrificados e o *plug* de gelfoam foi removido, permitindo a visualização de vasos no seu interior.

No controle (veículo; PBS) observou-se macroscopicamente a presença de novos vasos sanguíneos, derivados do tecido circundante, sendo a quantidade de hemoglobina (Hb) presente no implante de gelfoam equivalente a um valor basal (680,17 mg/dl). A associação de 50 UI/implante de HP com 156 µg/implante de HC (controle positivo) resultou em um conteúdo de novos vasos, significativamente reduzido em comparação com o controle (38,46 mg/dl) (**Figura 24**).

Essa figura demonstra que, no grupo tratado com 50 ng/implante de bFGF isoladamente, ocorreu um crescimento de vasos sanguíneos muito acentuado.

Em todos os grupos amostrais, os vasos apresentavam-se íntegros e continham as células sanguíneas vermelhas, indicando tratar-se de uma vascularização funcional, distribuída uniformemente no interior do implante de gelfoam.

No tratamento efetuado com SargA (1,5 mg/implante) em associação com bFGF (50 ng/implante) foi observado um conteúdo relativamente reduzido de vasos capilares, indicando que o polissacarídeo inibiu significativamente a angiogênese, mesmo na presença de um agente indutor desse processo (**Figura 24**).

A inibição da angiogênese, determinada com este ensaio, não provém do veículo do bFGF (PBS), e a região em que foram realizados os implantes não mostrou sinais de inflamação ou hemorragias.

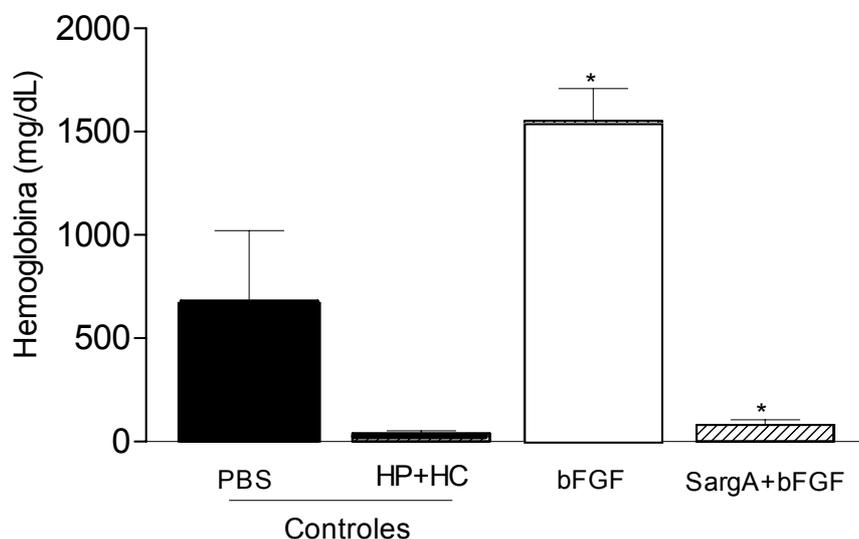


Figura 24 – Efeito do polissacarídeo SargA (1500 $\mu\text{g}/\text{disco}$) na angiogênese induzida por bFGF em *plugs* de gelfoam[®] (esponja de gelatina estéril) implantados (s.c.) em camundongos adultos, com base no conteúdo de hemoglobina existente no gelfoam (570 nm). Nos tratamentos os implantes foram adsorvidos de um volume de 50 μl de bFGF (50 ng), em presença ou ausência do polissacarídeo. Nos controles, foram utilizados 50 μl de PBS (veículo) e heparina (HP; 50 UI/implante) mais hidrocortisona (HC; 156 μg) como controles negativo e positivo, respectivamente. Cada coluna e barra vertical representa a média \pm E.P.M. de pelo menos 5 animais e os asteriscos denotam inibição da angiogênese, estatisticamente significativa ao nível de $*P < 0,05$ em relação ao controle (ANOVA seguida do teste LSD).

4.3. Avaliação da atividade antitumoral

4.3.1. Atividade antitumoral *in vitro*

4.3.1.1. Análise da migração celular

Inicialmente, camadas confluentes de células de melanoma da linhagem B16F10 (cultivadas em placas de 6 poços) foram raspadas com auxílio de uma lâmina de aço inoxidável, de modo que o processo de migração celular, a partir da linha de demarcação da monocamada de células adjacente à raspagem, pudesse ser avaliado.

Tanto o polissacarídeo SargA como o SargB (50, 100; 200 $\mu\text{g/ml}$) foi efetivo em inibir, de modo concentração – dependente, a migração celular a partir das bordas da raspagem em 55; 77; 95 % e 64; 91; 95 %, respectivamente (**Figura 25**).

O potente efeito inibitório da migração das células de melanoma pelos polissacarídeos SargA e SargB, em particular na concentração de 200 $\mu\text{g/ml}$ (**Figura 25.C;D**), foi acompanhado de um número acentuado de células-redondas (conformação celular não-espraiada), sugerindo que adicionalmente ao efeito sobre a migração, possam ter ocorrido danos ao processo de proliferação ou adesão celular ou mesmo, apoptose. O mesmo efeito foi observado no tratamento com a heparina (800 UI/ml; controle positivo).

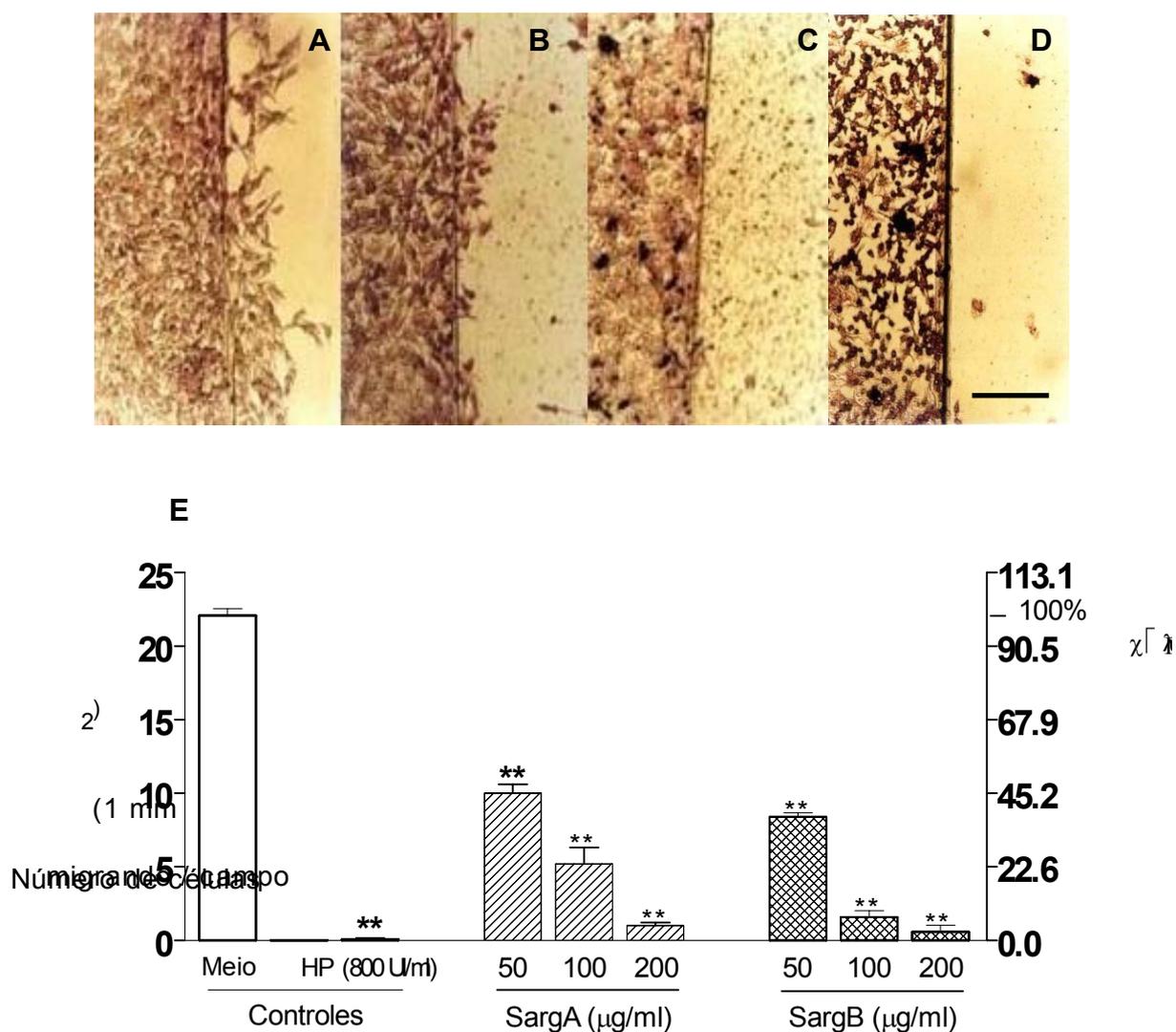


Figura 25 - Nas imagens fotográficas, monocamadas confluentes de células de melanoma B16F10, incubadas por 12 h (placas de 6 poços; 2ml/poço) com: (A) controle - meio de cultura RPMI-1640 apenas (veículo); (B) SargA (50 µg/ml); (C) SargA (200 µg/ml); (D) SargB (200 µg/ml). Aumento: 100 X (Barra = 127 µm). No gráfico (E) estão plotados os efeitos dos polissacarídeos na migração celular. Cada coluna e barra vertical representam respectivamente a média ± E.P.M. do número absoluto de células migrando em 10 campos (1 mm²) adjacentes (ordenada à esquerda) e a respectiva percentagem em relação ao controle (ordenada à direita). Os asteriscos denotam uma inibição estatisticamente significativa da migração celular ao nível de *P < 0,05 e **P < 0,01, em relação ao grupo controle. (ANOVA seguida do teste LSD)

4.3.1.2. Determinação da viabilidade celular

O efeito de tratamentos com concentrações crescentes de SargA e SargB (50 – 2000 $\mu\text{g}/\text{poço}$; placas de 96 poços) sobre a viabilidade das células de melanoma B16F10 foi determinado através do ensaio do MTT. Verificou-se que, no período de incubação de 72h, os polissacarídeos exerceram um efeito negativo sobre a viabilidade celular, particularmente no intervalo de concentrações entre 200 e 2000 $\mu\text{g}/\text{poço}$ (viabilidade inferior a 50 %). Nesta última concentração, os polissacarídeos SargA e SargB reduziram o número de células viáveis em 78% e 71%, respectivamente (**Figura 26**).

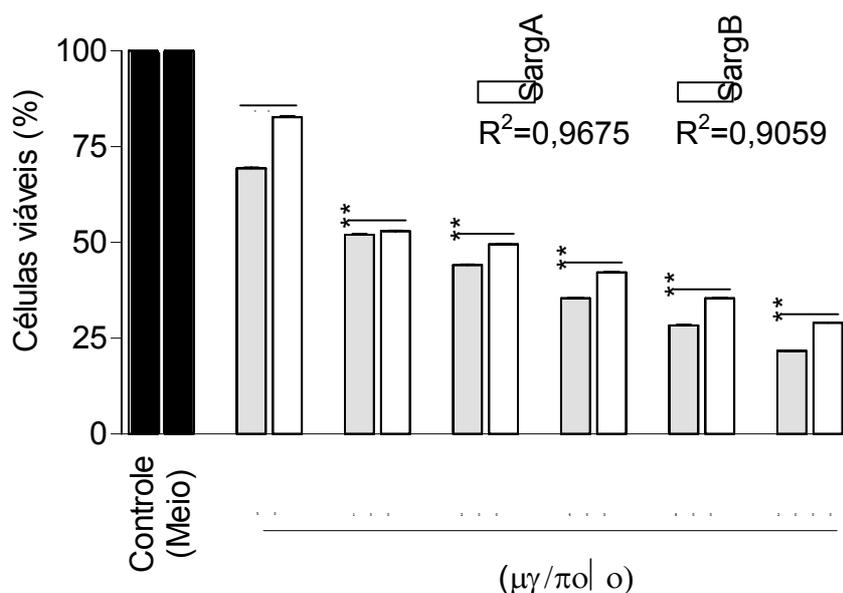


Figura 26 - Atividade dos polissacarídeos SargA e SargB (50 – 2000 $\mu\text{g}/\text{poço}$) na viabilidade de células de melanoma B16F10 ($2,5 \times 10^6/\text{poço}$). Após 72h de exposição aos polissacarídeos, foi determinada a percentagem de células viáveis através da incubação (4h) com o MTT. Os experimentos foram realizados em triplicata, e os resultados expressos no modelo linear como percentagem do controle (meio RPMI-1640). As colunas denotam diferenças estatisticamente significativas ao nível de $**P < 0,01$, em relação a cada grupo controle (ANOVA seguida do teste LSD).

Em média, considerando todas as concentrações (**Figura 26**), a viabilidade das células expostas ao SargA foi cerca de 30% menor que a viabilidade nas células expostas ao SargB. Evidenciou-se uma relação linear significativa ($R^2 = 0,96$ para SargA e $R^2 = 0,90$ para SargB) entre o número médio de células viáveis e as concentrações de polissacarídeos.

4.3.2. Atividade antitumoral *in vivo*

Para a seleção do polissacarídeo a ser avaliado no ensaio de atividade antitumoral *in vivo*, foi adotado o mesmo critério utilizado no experimento sobre a angiogênese em camundongos. Assim, optou-se pela utilização do polissacarídeo SargA devido, em parte, às suas características químicas e por apresentar um padrão de respostas biológicas mais uniforme que o SargB nos ensaios de migração e de viabilidade das células tumorais.

4.3.2.1. Análise do crescimento do tumor sólido

Na avaliação *in vivo* do efeito do SargA sobre o crescimento do tumor, foram utilizados camundongos adultos machos, inoculados (s.c.) com células de melanoma da linhagem B16F10 (1×10^6 células; 200 μ l/animal), monitorando-se a formação dos tumores sólidos (**Figura 27**).

Na análise da **figura 27**, comparando-se as imagens **C** com **D** e **E** com **F**, observa-se uma concentração aberrante de vasos sangüíneos morfológicamente atípicos, nas adjacências da massa tumoral.

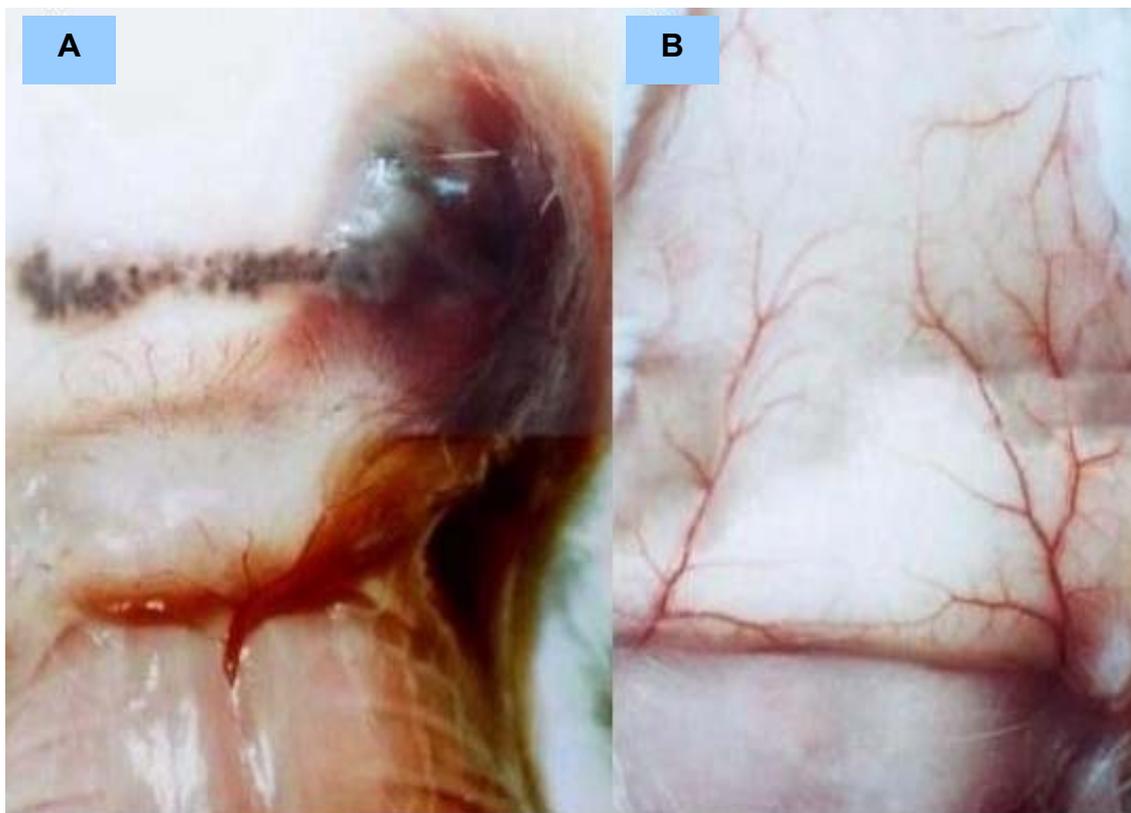


Figura 27 - (A) Crescimento da massa tumoral em animal inoculado s.c. com células de melanoma B16F10 (volume <math>< 150 \text{ mm}^3</math>; tumor não-palpável) e presença de vasos sanguíneos atípicos (seta), originados na região pulmonar, subsidiando o tumor; (B) Vascularização no animal normal (controle; inoculado somente com o meio RPMI -1640).

Nos animais do grupo controle, os quais receberam como tratamento terapêutico apenas uma injeção de meio de cultura RPMI-1640, os tumores (encapsulados) cresceram rapidamente, atingindo volumes superiores a 4000 mm^3 (7486 mm^3) (**Figura 28.A**).

O tratamento terapêutico efetuado (s.c) através de uma única dose diária ($100 \mu\text{l}$) de SargA ($1,5$ ou $150 \mu\text{g/animal}$), durante 3 dias consecutivos, reduziu o volume tumoral para $55 - 72 \%$, respectivamente, comparado ao controle (meio RPMI-1640). Isto implica em que o tratamento acima retardou por pelo menos $2,5 - 5$ dias, respectivamente, o crescimento dos tumores primários ao longo de 12 dias, em um total de 15, do experimento (**Figura 28.A**), o que sugere uma ação citotóxica sobre as células de melanoma B16F10.

Por outro lado, nos animais tratados com o SargA não foram observadas mortes e a **figura 28.B** mostra que o peso dos animais portadores de tumor, tratados com SargA, manteve-se estável (sem perda significativa) no período de 15 dias, não diferindo estatisticamente do peso dos animais no controle. Contudo, a tendência discreta ao aumento de peso, verificada no grupo controle, está diretamente relacionada ao peso dos tumores sólidos, muito volumosos nos respectivos animais.

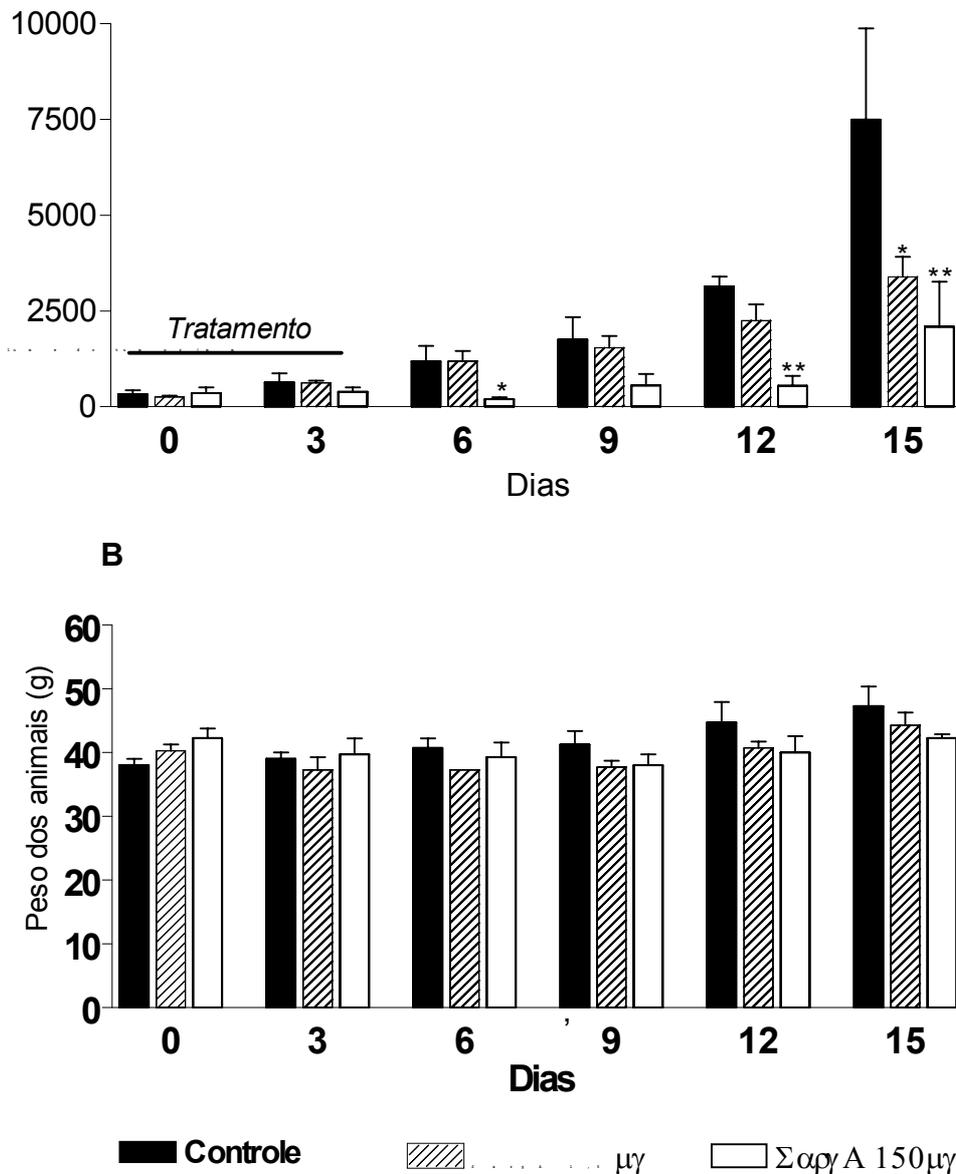


Figura 28 – Efeito do SargA sobre o crescimento do tumor sólido. Células de melanoma B16F10 (1×10^6 em $200 \mu\text{l}/\text{animal}$) foram inoculadas (s.c.) em camundongos ($n = 8$) no dia 0. **(A)** Quando o volume do tumor atingiu 150 mm^3 , os animais receberam (s.c.) uma única dose diária de SargA ($1,5 - 150 \mu\text{g}$), durante 3 dias. Os animais do controle receberam meio RPMI-1640 (veículo) apenas, sendo o volume tumoral medido a cada 3 dias em um total de 15. **(B)** Peso dos animais portadores de tumor. Cada coluna e barra vertical representam respectivamente a média \pm E.P.M. referente a menos 8 animais e os asteriscos denotam inibição estatisticamente significativa do crescimento do tumor ao nível de $*P < 0,05$ e $**P < 0,01$ em relação ao grupo controle (ANOVA seguida do teste LSD).

5. Discussão

O descontrole no processo de angiogênese tem sido implicado no crescimento de tumores e nas metástases, e na progressão de distúrbios conhecidos como “doenças angiogênicas”, tais como hemangiomas, psoríase e artrite reumatóide (Carmeliet, 2003). Esses aspectos, aliados ao fato de a angiogênese de indivíduos adultos desempenhar um papel crucial em diversos processos fisiológicos, a exemplo do reparo tecidual e da inflamação, despertam crescente atenção endereçada ao desenvolvimento de novas estratégias farmacológicas para a abordagem, tanto pré-clínica como clínica, desse processo. (Cristofanilli *et al.*, 2002). Nesse contexto, o presente trabalho demonstra que SargA e SargB, polissacarídeos isolados de parede celular de *S. stenophyllum*, inibem efetivamente a angiogênese e a vasculogênese em embriões de galinha e também a migração e a viabilidade de células de melanoma *in vitro*. O polissacarídeo SargA inibiu a vascularização de implantes subcutâneos de gelatina de colágeno (gelfoam) e o crescimento do tumor de células de melanoma em camundongos.

A vasculogênese é um termo que designa a vascularização primordial dos embriões, a partir de células precursoras endoteliais – os angioblastos (Risau *et al.*, 1988). A maior distinção entre a formação de vasos sanguíneos nos tecidos embrionários e a que ocorre em tecidos de adultos, reside no fato de que, durante a embriogênese, as células precursoras endoteliais circulantes (típicas da vasculogênese) podem contribuir na formação dos novos vasos, concomitantemente à angiogênese (Simons & Ware, 2003; Ribatti *et al.*, 2001).

Embora a vasculogênese seja um processo considerado virtualmente irrelevante no organismo adulto (Folkman & Shing, 1992; Yancopoulos *et al.*, 2000), mais recentemente o termo vasculogênese foi empregado para descrever processos similares em adultos (Kuwama *et al.*, 2004). Segundo esses autores, no organismo do adulto as células precursoras endoteliais, que normalmente residem na medula óssea, poderiam vir a ser mobilizadas para a circulação através de sinais vasculares, como citocinas e fatores de crescimento, sendo incorporadas nos locais de atividade angiogênica, onde ocorre a sua diferenciação em células endoteliais, que formarão novos vasos durante a regeneração de tecidos e tumores.

A despeito do consistente conceito de que a neovascularização dos tumores parece ocorrer de um modo geral via angiogênese (neoangiogênese), o mesmo processo que atua no embrião – vasculogênese – tem, sob certas condições, sido adaptado para atuar também no adulto. Em tumores, os precursores de células endoteliais recrutados da medula óssea são transportados através da corrente sanguínea, incorporando-se à população de células que compõe a parede de vasos em desenvolvimento (Rafii & Lyden, 2003). De acordo com Hess *et al.*, (2002), células de melanoma, em cultura, foram capazes de expressar genes associados ao endotélio para formar redes capilares com o alto teor de matriz extracelular – típico da vasculogênese – similares às observadas em tumores de pacientes com câncer. Tal vascularização parece recapitular os vasos vitelinos iniciais das redes vasculogênicas primordiais encontradas durante o desenvolvimento embrionário (*vasculogenic mimicry*). “Mimetismo vasculogênico” é um conceito

(Maniotis *et al.*, 1999) revisado por outros pesquisadores (Folberg *et al.*, 2000; Shubik & Warren, 2000; Hendrix *et al.*, 2003).

Muitos fatores de crescimento angiogênicos são encontrados também na vasculogênese, o que sugere fortemente a existência de mecanismos de regulação similares, entre ambos os processos (Risau *et al.*, 1988). Entretanto, tem sido demonstrado, tanto *in vivo* como *in vitro*, que processos de formação de redes vasculares de tumores, os quais envolvem recrutamento de células precursoras endoteliais – similarmente ao que ocorre na vasculogênese – são relativamente não-susceptíveis à ação de agentes angiogênicos, como a endostatina (van der Schaft, 2003). Assim, a vasculogênese tende a ser um fator relevante a ser considerado no *design* de terapias antivasculares, na neoangiogênese.

No presente trabalho, inicialmente foi investigada a atividade dos polissacarídeos isolados de *S. stenophyllum* (6 – 1500 µg/disco) no processo de vasculogênese da vesícula vitelínica, considerando-se os eventos desde a formação das ilhotas sangüíneas, até a organização das primeiras redes de capilares.

Os polissacarídeos SargA e SargB bloquearam a formação de vasos vitelinos de embriões de galinha, tanto nos ensaios *in vivo* como *in vitro*, no período de 2 - 4 e 1,5 – 3,5 dias de desenvolvimento, respectivamente. O efeito antivasculogênico do SargB foi significativo nas 5 concentrações testadas, sendo portanto mais abrangente que o efeito do SargA. No entanto, o polissacarídeo SargA foi mais efetivo que o SargB ao potencializar o efeito inibitório da hidrocortisona.

A atividade antivasculogênica *in vivo* desencadeada tanto por SargA como por SargB, nos embriões em período de incubação de 2 a 4 dias, é compatível com os resultados obtidos no período de incubação de 1,5 dia a 3,5 dias nos ensaios *in vitro*. Isto indica que a resposta não foi devida à interação de SargA, ou SargB, com componentes da gema do ovo (vitelo), como fatores de crescimento ou outras moléculas com propriedades funcionais, provenientes do processo de vitelogênese. O efeito inibitório sobre a vasculogênese em resposta à administração *in vitro* de SargA e SargB, respectivamente (500 µg/disco), é comparável aos 100 % de inibição obtida no tratamento *in vivo* (1500 µg/disco), sendo, portanto, o tratamento *in vitro*, quase duas vezes mais efetivo que o realizado *in vivo*. Essa diferença na relação dose-resposta entre os dois tipos de ensaio pode estar relacionada a uma maior susceptibilidade por parte dos embriões aos polissacarídeos, devido ao período crítico (precoce) de desenvolvimento no qual são realizados os tratamentos pelo método (YSM) de cultura *in vitro*.

A heparina controla uma variedade de processos biológicos, particularmente no sistema cardiovascular, por interagir com peptídeos como os fatores de crescimento (Folkman *et al.*, 1988; Fairbrother *et al.*, 1998). Heparina padrão e heparinas de baixo peso molecular são polissacarídeos comumente utilizados na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares (Sinaÿ, 1999). A heparina sódica, tanto isoladamente como em associação com a hidrocortisona, inibiu em 100% a formação de vasos vitelinos, diferindo, de forma marcante, do efeito observado no processo de angiogênese. Esses resultados são corroborados pelos dados obtidos por Tobelem (1990), o qual cita que o tratamento com heparina e hidrocortisona, utilizado no presente

trabalho como controle positivo, é capaz de bloquear o processo de formação de vasos sanguíneos.

Embora os tratamentos acima realizados com a administração de heparina e hidrocortisona (controle positivo) não tenham causado morte embrionária, não está descartada a possibilidade de que essas substâncias exerçam alguma ação embriotóxica. A análise histológica de membranas da vesícula vitelínica nesse controle revelou a absoluta ausência de vasos. Esse achado relativo a vasculogênese não é corroborado pelas observações de Ribatti *et al.* (1987), sobre efeitos pró-vasculogênicos decorrentes do tratamento com heparina na membrana corioalantóica de embriões de galinha de cinco dias de idade. E evidenciam que o efeito desse polissacarídeo sobre a vascularização é, de fato, complexo e depende inclusive das condições e do método de cultura (Tobelem, 1990).

Nos ensaios de vasculogênese realizados com embriões cultivados *in vitro*, além dos tratamentos com os polissacarídeos SargA e SargB, foi também avaliada a ação do trans-resveratrol sobre a formação dos vasos vitelinos. A hidrocortisona, como outros hormônios esteróides, é uma substância potencialmente teratogênica (Bowden *et al.*, 1993; Katzung, 1998). Para reduzir a incidência de malformações e outros danos nos embriões em desenvolvimento muito inicial (i.é., com um dia e meio de idade) optou-se pela utilização do trans-resveratrol – que possui propriedades antimutagênica e antitumoral (Jang *et al.*, 1997; Frémont, 2000) – ao invés do glicocorticóide, no controle positivo nos ensaios de vasculogênese *in vitro*.

O efeito inibitório da vasculogênese, no grupo tratado com o polifenol, ocorreu sem registros de embriotoxicidade, similarmente ao efeito registrado nos tratamentos com os polissacarídeos SargA e SargB. Estes resultados, com o trans-resveratrol, são corroborados pelos achados de Frémont (2000) e Igura *et al.* (2001), relativos ao efeito inibitório da formação de tubo vascular avaliado *in vitro*.

Sem desconsiderar a diferença entre os compostos, é possível notar que o trans-resveratrol apresenta algumas semelhanças na estrutura química, com compostos esteróides, em face da sua constituição polifenólica contendo três radicais-hidroxila distribuídos em posições relativamente similares àquelas na molécula de hidrocortisona. Além disso, já foi descrito o seu efeito agonista (fito-estrógeno) sobre o receptor de estrógenos (Gehm *et al.*, 1997). Os mecanismos envolvidos na atividade do trans-resveratrol, tanto quanto dos assim chamados esteróides angiostáticos, permanecem desconhecidos; contudo, um mecanismo alternativo para a ação de esteróides na angiogênese (Gagliardi & Collins, 1993) sugere que a resposta angiostática, elicitada por antagonistas parciais de estrógenos, ocorreria, provavelmente, mais em resposta à inibição da proteína quinase C (PKC), do que através da competição pelo receptor de estrogênios.

Administrados concomitantemente ao fator de crescimento (bFGF; 50 ng/disco), tanto o SargA como o SargB reverteram parcialmente o potente efeito pró-vasculogênico do bFGF na vesícula vitelínica (144% comparado com o controle). Porém, esse efeito somente diferiu estatisticamente do controle (água) no grupo tratado com o SargB mais bFGF. Esses resultados permitem sugerir que ambos os polissacarídeos poderiam suprimir o desenvolvimento de

primórdios de vasos anormais. Além disso, os resultados indicam que o bFGF desempenha um papel relevante no efeito inibitório elicitado tanto por SargA como por SargB sobre o processo de vasculogênese.

Fatores de crescimento ativadores da vascularização, como o bFGF e o VEGF – membros de grandes famílias de proteínas estruturalmente relacionadas (Fachinger *et al.*, 1999; Nugent & Iozzo, 2000; Yancopoulos *et al.*, 2000) – interagem com glicosaminoglicanas e proteoglicanas, como as de sulfato de heparana (HSPG) na matriz extracelular, na lâmina basal e ao nível de receptores de superfície celular, regulando o crescimento, a proliferação, a migração, a diferenciação e a sobrevivência de células endoteliais, entre uma variedade de tipos celulares (Gallagher, 1994; Chipperfield *et al.*, 2002).

Grupos de sulfato das HSPGs podem interagir com o bFGF e regiões específicas de seus receptores (FGFRs), formando complexos de ativação de alta afinidade (Nugent & Iozzo, 2000). Moléculas de HSPG específicas são essenciais no transporte e na disponibilização do bFGF ao receptor (Gallagher, 1994; Dowd *et al.*, 1999). Por exemplo, alterações nas ligações bFGF-HSPG devidas à degradação proteolítica de HSPGs, ou à presença de antagonistas competitivos do sulfato de heparana ou ainda de análogos de heparina solúveis, podem mobilizar moléculas de bFGF a partir de sítios da matriz extracelular (Mundhenke *et al.*, 2002). Nesse contexto, é possível sugerir que polissacarídeos estruturalmente análogos a heparina (heparinóides), a exemplo do SargA (**Anexo 3**), possam ligar-se aos fatores de crescimento e modular ou antagonizar o sinal pró-angiogênico na superfície da célula, através da formação de complexos de afinidade superior à existente nos complexos mediados pelas moléculas de sulfato de heparana endógenas (**Figura 29**).

Também é instigante sugerir como um mecanismo indireto adicional para inibição da vasculogênese, que os polissacarídeos SargA e SargB sejam capazes de seqüestrar o bFGF na matriz extracelular, de modo que a ligação ao receptor e sua ativação sejam bloqueados (**Figura 29.A**).

A histologia possibilita inferir que as alterações estruturais observadas nos vasos sangüíneos das membranas de vesículas vitelínicas expostas à associação de SargA com hidro cortisona guardam alguma similaridade com as alterações em vasos capilares de roedores, relatadas por Jones *et al.* (2001). Esses autores publicaram imagens fotográficas de secções transversais de vasos sangüíneos corados com H-E, que apresentavam diversas anomalias vasculares, tais como, calibre de artérias e veias maior que o normal e rupturas nos vasos.

Os danos descritos por Jones *et al.* (2001), vinculados à fina espessura de parede dos vasos, devido à perda de células endoteliais, foram atribuídos a uma mutação no gene TIE2, o qual expressa o receptor (Tie2), que é ativado por angiopoietina-1 (Ang1), uma molécula promotora de sobrevivência no sistema vascular (**Figura 30**).

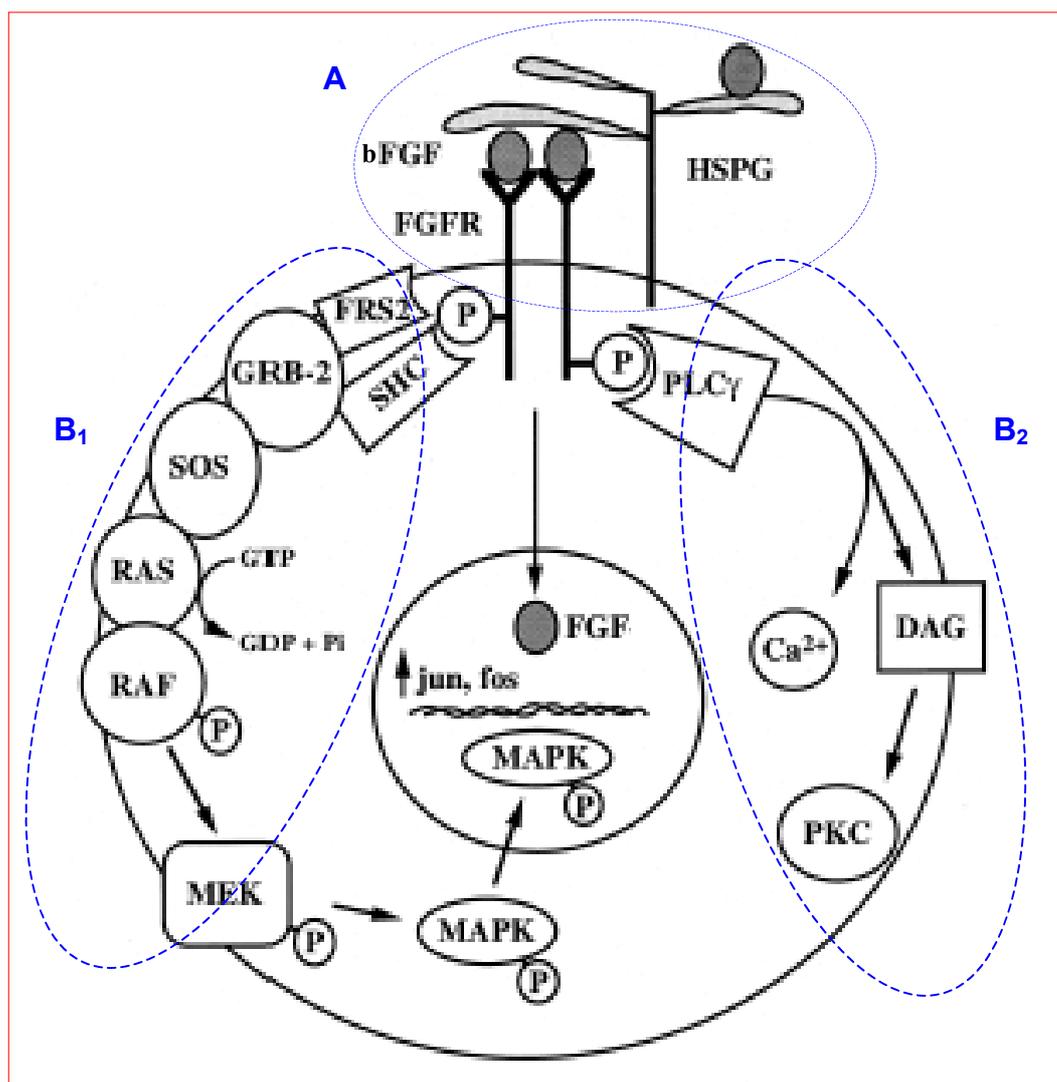


Figura 29 – Esquema representativo de vias de sinalização angiogênica envolvendo interação de bFGF com HSPG na matriz extracelular (MEC) e na superfície da célula (A). Muitos mediadores foram excluídos para tornar o esquema mais objetivo. Alguns dos resíduos de tirosina são sítios de ligação para fosfolipases como o FRS2 (*Fibroblast growth factor receptor substrate-2*) e o SHC (B₁), ambos com função *docking*, pois se ligam a complexos protéicos como GRB-SOS-RAS, tendo como consequência a ativação seqüencial de quinases, tais como RAF-1, MEK e MAPK (*mitogen activated protein kinases*). MAPKs translocam-se para o núcleo, ativando fatores de transcrição. Outra possibilidade é a ativação da fosfolipase C (PLC), com consequente liberação de cálcio e ativação da proteína quinase C (PKC) (B₂). Sinalização direta a partir da formação de complexos de HSPGs na superfície celular, ou do bFGF intracelular ou nuclear poderia transduzir estímulos à proliferação ou à migração celular. O sítio (A) e as vias (B_{1;2}) são possíveis alvos de polissacarídeos exógenos para a ação inibitória da formação de vasos sanguíneos (adaptado de Nugent & Iozzo, 2000).

No presente estudo, os cortes das membranas vitelínicas de embriões tratados *in vivo* com SargA ou SargB (1500 µg/disco) e hidrocortisona (156 µg/disco), mostraram que ocorreu também uma diminuição na espessura da parede vascular, além de diversas rupturas nos vasos.

Embora a causa permaneça obscura, tais alterações morfológicas, juntamente com a inibição da vasculogênese e, possivelmente, a regressão de vasos, permitem especular um possível envolvimento do receptor de angiopoietina -1 (Tie2) nesse tipo de resposta uma vez que o bloqueio na atividade do receptor Tie-2 (Jones *et al.*, 2001) levou a alterações similares.

As numerosas estruturas com aspecto vesicular coradas por eosina, nos cortes de membranas vitelínicas tratadas com heparina ou SargA associados à hidrocortisona, como também com SargA isoladamente, sugerem que o conteúdo seja proteína do vitelo. Neste caso, a presença de substâncias como a lipoproteína vitelina, por exemplo, estaria refletindo as deficiências ocorridas na distribuição de nutrientes ou de produtos metabólicos, devido à diminuição do número de vasos nas membranas da vesícula vitelínica.

O ensaio da membrana corioalantóica de embriões de galinha (CAM assay; no período de 6 a 8 dias de idade) é talvez o modelo *in vivo* mais amplamente empregado para estudar o desenvolvimento de vasos sangüíneos (Jakob *et al.*, 1978; McCormick *et al.*, 1984; Vu *et al.*, 1985; Strick *et al.*, 1991; Nguyen *et al.*, 1994; Iruela-Arispe *et al.*, 1995). SargA (de um modo dose dependente; 2 – 167 µg/disco) e SargB inibiram fortemente a formação de redes de vasos capilares a partir de vasos pré-existentes (angiogênese).

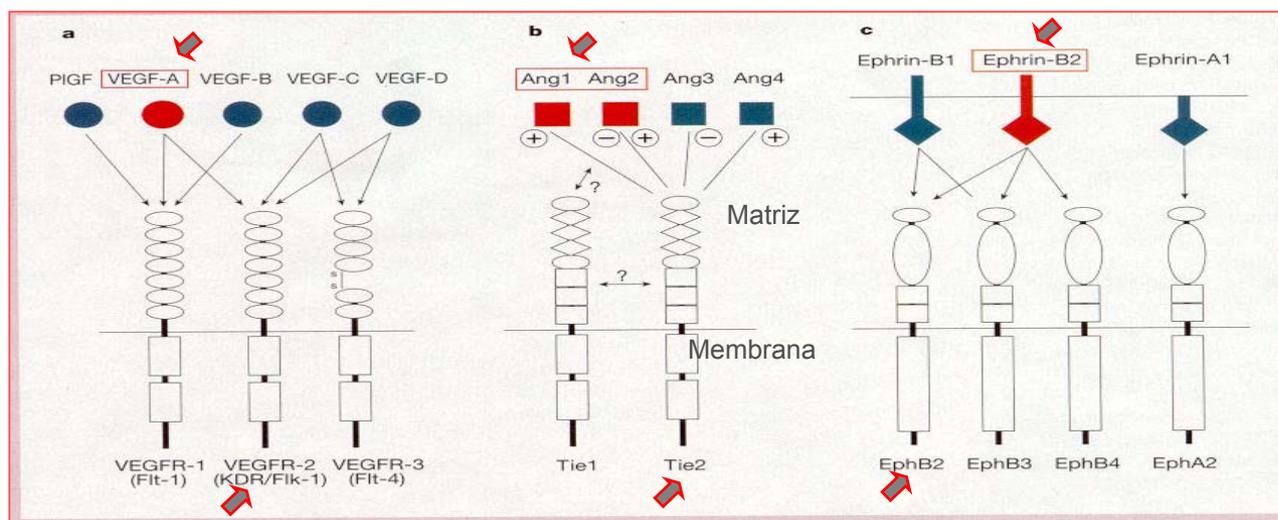


Figura 30 - Ilustração das diferentes famílias de moléculas sinalizadoras de processos de formação de vasos (a) - VEGFs; PIGF; (b) - Angs; (c) – Efrinas (*Ephrins*) e sua atividade (setas) “-” antagonista ou “+” agonista) sobre os seus receptores. Em uma simplificação do modelo referente ao papel dessas diferentes vias, a ativação dos receptores VEGFR-2, Tie2 e EphB2 pelos respectivos agonistas - VEGF-A, Ang2 e Ephrin-B2 (setas) – promove respectivamente a proliferação (a), a sobrevivência (b) e a diferenciação de células endoteliais nos diferentes tipos de vasos (c) (Adaptado de Yancopoulos *et al.*, 2000).

Similarmente ao que ocorreu no ensaio da vasculogênese, o efeito antiangiogênico do SargB foi significativo em todas as concentrações testadas sendo, portanto, mais abrangente, em relação às doses, que o efeito da administração de SargA. Entretanto, os perfis das curvas de dose-resposta do polissacarídeo SargB, nos ensaios de vasculogênese e de angiogênese, sugerem que o mesmo tende a apresentar uma resposta do tipo “tudo ou nada”, diferindo assim do padrão de respostas mais uniforme verificado no tratamento com o SargA.

Ao contrário do observado no ensaio de vasculogênese, o SargB (2 - 167 $\mu\text{g}/\text{disco}$) foi efetivo em potencializar (93,3 - 98,3 %) o efeito inibitório da hidrocortisona (156 $\mu\text{g}/\text{disco}$; 30,8 % de inibição em relação ao controle).

Surpreendentemente, no entanto, o efeito antiangiogênico no modelo da membrana corioalantóica (CAM) produzido pela co-administração do SargA (18 – 1500 µg/disco) com a hidrocortisona foi, no máximo, meramente aditivo. Não obstante, a inibição provocada pela maior dose de SargA foi aproximadamente o dobro daquela atribuída à hidrocortisona (156 µg/disco) somente.

Em contraste com a ação dos polissacarídeos, o glicocorticóide hidrocortisona pode ter inibido a angiogênese por meio de um efeito angiostático mediado via bloqueio de receptor de estrógeno e/ou diretamente pela estimulação da PKC. Além disso, o efeito antiangiogênico da hidrocortisona foi fortemente potencializado pelo tratamento combinado com a heparina (controle positivo), a qual, administrada isoladamente, não inibiu a angiogênese, diferindo assim do que foi observado no ensaio de vasculogênese. Estes resultados concordam com aqueles obtidos por Ribatti *et al.* (1987) em membranas corioalantóicas de embriões de 5 a 7 dias de idade e sugerem que a ação da heparina na vascularização depende da idade e/ou do tipo de membrana extraembrionária considerada. Os resultados referentes aos 90 % de inibição da angiogênese, obtidos com a associação de heparina com hidrocortisona, estão em conformidade com os dados obtidos por Tobelem (1990).

Embora o ensaio da membrana corioalantóica (CAM assay) tenha sido desenvolvido originalmente como um ensaio qualitativo, diferentes procedimentos foram posteriormente acrescentados ao modelo, para viabilizar uma quantificação precisa dos efeitos de inibidores ou de ativadores da angiogênese (Nguyen *et al.*, 1994).

O *CAM assay* é particularmente útil na avaliação inicial (*screening*), de agentes potencialmente pró e antiangiogênicos. Além disso, mostrou ser uma abordagem experimental relativamente simples, rápida, onde vasos crescem espontaneamente, sem a necessidade da adição de fatores de crescimento exógenos à cultura (Yancopoulos *et al.*, 2000).

O modelo da membrana corioalantóica (*CAM*) não necessariamente distingue vasos recém formados (após a aplicação, na *CAM*, dos discos contendo drogas) daqueles já presentes no dia 6, idade em que os discos foram implantados. Assim, é especialmente digno de nota que 64 e 98 % de redução na densidade vascular ao redor dos limites do disco na *CAM*, produzida pela maior dose de SargA e SargB respectivamente, indica que nenhum novo microvaso foi detectado. Como suporte a esta concepção, o SargA reverteu significativamente, comparado ao controle (água), embora de forma parcial, o bem conhecido efeito angiogênico do bFGF exógeno, quando ambos os agentes foram aplicados concomitantemente no disco, sobre a *CAM* (160 % em relação ao controle), ou em implante subcutâneo no dorso de camundongos (228 % em relação ao controle) – efeito avaliado com base na diminuição do conteúdo de hemoglobina do *plug* de gelfoam. Os dados na **figura 20** sugerem que a sinalização angiogênica mediada por bFGF possa estar mais relacionada, qualitativamente, ao efeito inibitório produzido pelo SargA, do que ao produzido pelo SargB.

Houve um aumento de 60 a 128 % na população de vasos nos tratamentos realizados com bFGF no período de experimentos de 6 dias (*CAM assay*) ou 15 dias (ensaio do gelfoam), respectivamente. Estes resultados obtidos de ensaios *in vivo* estão em conformidade com os dados publicados

por Ziche *et al.* (1994), o qual estima que em um período de 5 dias, o fator de crescimento de fibroblastos – tipo básico é capaz de prover um incremento de até 72% na população de células endoteliais em cultura.

De um modo mais abrangente, os resultados descritos acima são consistentes com a hipótese de que a suplementação do tratamento com bFGF, exerce um efeito protetor sobre a angiogênese. Uma evidência desse efeito foi fornecida através dos ensaios com a CAM de embriões de galinha, durante os tratamentos com os polissacarídeos. Considerando que no período de desenvolvimento de 6 a 10 dias de idade ocorre normalmente uma diminuição significativa na concentração de HSPGs na CAM (aproximadamente 25% menos, em relação ao total de proteoglicanas sulfatadas da matriz) (Burg *et al.*, 1995) e que HSPGs, tais como perlecana e sindecana, apresentam além de alta afinidade, um efeito potencializador sobre a atividade do bFGF (Matou *et al.*, 2002), é possível argumentar que este fator de crescimento tenha compensado o déficit de HSPGs nos embriões durante os tratamentos, no período de incubação de 6 a 8 dias.

A interação entre bFGF e moléculas de HSPGs, considerada anteriormente no estudo do processo de vasculogênese, parece crucial no microambiente da angiogênese (Nugent & Iozzo, 2000). Proteoglicanas sulfatadas endógenas são essenciais ao transporte na membrana celular, em razão da estabilização do complexo formado entre o bFGF e o respectivo receptor, através de ligação com cadeias distintas de espécies de sulfato de heparana (Fairbrother *et al.*, 1998; Gallagher, 1994; Dowd *et al.*, 1999). Por exemplo, alterações nas ligações bFGF-HSPG devidas à degradação proteolítica de HSPGs, ou à presença de antagonistas competitivos do sulfato

de heparana, ou ainda, de análogos de heparina solúveis, podem mobilizar moléculas de bFGF a partir de sítios da matriz extracelular, reduzindo a sua disponibilidade para a ativação do receptor (Mundhenke et al., 2002). Entretanto, dependendo da sua estrutura particular, polissacarídeos, geralmente sulfatados, podem seqüestrar bFGF prevenindo a ativação do respectivo receptor, levando assim à inibição da angiogênese (**Figura 29**).

A capacidade de um determinado polissacarídeo exibir propriedades angiogênicas ou antiangiogênicas parece depender, em grande parte, do seu grau de sulfatação (Soeda et al., 2000; Matou et al., 2002). Desse modo, a atividade angiogênica ou fracamente antiangiogênica de fucoidanas nativas, obtidas de algumas espécies de algas, pode ser respectivamente revertida ou incrementada, se essas moléculas forem, por exemplo, supersulfatadas (Koyanagi et al., 2003). A presença de sulfato e carboxila na estrutura dos polissacarídeos (**Anexos 2 e 3**) permite inferir que a atividade angiostática observada esteja relacionada à participação desses grupos químicos.

Compostos polianiônicos como o suramin – uma naftiluréia polisulfatada – e seus análogos também podem inibir de forma potente a angiogênese, ao bloquearem a ligação de bFGF, TGF- β e EGF aos seus respectivos receptores (Myers et al., 1992; Pesenti et al., 1992, Meyers et al., 2000). Gagliardi et al. (1992) demonstraram que a adição de suramin a glicocorticóides potencializou a ação inibitória da angiogênese – um efeito similar, mas de intensidade superior ao da heparina – em concentrações iguais. Isto sugere que polissacarídeos extraídos de algas pardas, os quais possuem entre seus constituintes grupos polianiônicos (Collins & Ferrier, 1996), poderiam

sequestrar sinais angiogênicos como o bFGF e mimeticamente interferir com a habilidade de HSPGs em modularem a angiogênese.

Uma questão adicional abordada no presente trabalho foi a possível conexão entre o processo de desenvolvimento da forma dos embriões (morfogênese) e a vascularização. O comprimento e a morfogênese embrionária foram avaliados para determinar se características biométricas e morfológicas refletiriam modificações no microambiente dos vasos sanguíneos, que subsidiam o crescimento. O fato de que moléculas envolvidas diretamente na sinalização de processos de formação de vasos medeiam a morfogênese embrionária (Moore & Perseaud, 2004; Vokes *et al.*, 2004) confere suporte a essa hipótese.

Segundo Herkovits (1977), a morfogênese resulta de grande número de processos celulares coordenados no tempo e no espaço, durante o desenvolvimento embrionário. Neste período, moléculas de sulfato de heparana (HSs) endógenas ligam-se não somente a fatores de crescimento, mas também a morfógenos – marcadores teciduais expressos por gradientes em diferentes domínios do organismo – por exemplo, Wnt (*Wnt*), SHH (*Sonic hedgehog*), RA (*retinoic acid* – também um fator angiostático) e BMP-4 (*Bone Morphogenetic Protein-4*) (Wolpert, 1998; Dhoot *et al.*, 2001; Princivalle & Agostini, 2002).

Recentemente, foi demonstrado (Aybar & Mayor, 2002) que o fator angiogênico bFGF – entre outros membros dessa superfamília – constitui um morfógeno, atuando na especificação do tubo neural de embriões de galinha. De acordo com esses autores, a função do bFGF está relacionada à indução da crista neural (um tecido cujo ritmo de diferenciação acompanha o

desenvolvimento embrionário ao longo dos domínios cefálico e caudal). As células da crista neural migram com destinos diversos para alvos nos domínios antero-posteriores, definidos como cefálico e truncal (cardíaco, vagal e sacral) sendo que, no embrião de galinha, a crista neural cefálica pode ser subdividida em diencefálica, mesencefálica e branquial, originando tecidos específicos, como cartilagem e músculo cardíaco (Wilting *et al.*, 1994; Gilbert & Raunio, 1997).

As flexuras (flexões) do tubo neural (Huettner, 1949), além de constituírem um produto estrutural do desenvolvimento do sistema nervoso central, podem ser tratadas como um indicador (tempo – espaço) das transformações na morfologia do organismo durante um determinado período da embriogênese. (Hamburger & Hamilton, 1951; Takamatsu & Fujita, 1987; Männer *et al.*, 1993; Simon *et al.*, 1995). No presente estudo, o padrão de morfogênese embrionária foi baseado na percentagem de comprimento cefálico (comprimento do segmento entre as flexuras cefálica e cervical) dos embriões.

Por hipótese, alterações na sinalização indutiva dos processos de modelagem do corpo dos embriões – como no exemplo do bFGF – poderiam resultar em uma redução na taxa de crescimento da região cefálica. Os resultados obtidos com os ensaios de vasculogênese mostram que os embriões tratados com SargA e SargB, isoladamente apresentaram uma redução significativa no comprimento total. Além disso, ambos os polissacarídeos em associação com a hidrocortisona foram capazes de modificar o padrão de morfogênese embrionária (na idade de 4 dias), com base, especificamente, na diminuição do comprimento cefálico.

Durante os experimentos *in vivo* relativos ao processo de vasculogênese (idade de 2 a 4 dias), os polissacarídeos SargA e SargB, isoladamente, reduziram a percentagem de comprimento cefálico (CCV/CCC) para 38 e 36 %, respectivamente, em relação à percentagem de 45 %, no controle, somente quando administrados na maior concentração (1500 µg/disco).

Por outro lado, tanto o SargA como o SargB (6 – 1500 µg/disco), associados à hidrocortisona (CCV/CCC = 39 %) reduziram de forma marcante a percentagem de comprimento cefálico.

Nesse período (2 a 4 dias) de desenvolvimento, a administração de bFGF não foi capaz de elevar, por si só, a percentagem de comprimento cefálico em relação ao controle e não produziu qualquer outro efeito sobre os embriões. Entretanto, nem SargA, nem SargB em associação com o bFGF, foram capazes de reduzir a percentagem de comprimento cefálico. Esses resultados, sobre os efeitos do bFGF, não pareiam com os resultados obtidos por Miquerol *et al.*, (2000), concernentes à interrupção do desenvolvimento embrionário causada por incremento discreto na expressão do gene do VEGF (um peptídeo angiogênico, mas não um morfógeno com as mesmas propriedades do bFGF).

Nos ensaios *in vitro*, o trans-resveratrol não influenciou o comprimento cefálico (segmento cefálico - cervical); ao contrário, elevou significativamente o comprimento do tronco (segmento cervical - caudal) dos embriões (3,5 dias de idade), o que permite supor que aquele fitoestrógeno (Gehm *et al.*, 1997) tenha apresentado um efeito anabolizante, favorecendo preponderantemente o crescimento da porção correspondente ao tronco dos embriões (**Figura 16**). Portanto, esses resultados apontam para a existência de mecanismos de ação

distintos em relação aos polissacarídeos em estudo e ao polifenol trans-resveratrol.

Ao contrário do observado durante os experimentos sobre a vasculogênese, nos experimentos (*in vivo*) relativos ao processo de angiogênese (idade de 6 a 8 dias), ambos os polissacarídeos, isoladamente, não foram capazes de modificar a morfogênese embrionária com base na percentagem de redução do comprimento cefálico, nem de reduzir o comprimento total dos embriões em relação ao controle. Além disso, a associação entre o SargB e a hidrocortisona, o único tratamento em que ocorreu modificação na percentagem de comprimento cefálico, revelou que não houve diminuição significativa no crescimento cefálico, mas um aumento no comprimento médio do tronco dos embriões.

Comparados no todo, os resultados dos tratamentos com os dos polissacarídeos sobre a vasculogênese (na vesícula vitelínica; 2 – 4 dias) e a angiogênese (na CAM; 6 – 8 dias) mostram que, no primeiro processo, o SargB é o mais efetivo em reverter o efeito do bFGF, enquanto o SargA efetivamente potencializa a atividade antivasculogênica da hidrocortisona. Curiosamente, no processo de angiogênese observa-se o oposto, sendo SargA o mais efetivo em reverter o efeito do bFGF, enquanto o SargB potencializa a atividade antiangiogênica da hidrocortisona.

As diferenças observadas quanto à potencialização do efeito da hidrocortisona sugerem a existência de sinergismo entre os mecanismos de ação das vias do glicocorticóide e dos polissacarídeos SargA e SargB na atividade antivasculogênica e antiangiogênica, respectivamente. Entretanto, até o presente, não está claro se os efeitos inibitórios do SargA e do SargB no

desenvolvimento dos vasos sangüíneos e na morfogênese são devidos ao bloqueio seletivo de mecanismos mediados por bFGF e/ou à sua interferência com a atividade de outros fatores de crescimento endógenos.

A inibição da vasculogênese *in vivo*, após a administração de SargA e SargB na vesícula vitelínica, foi acompanhada de uma diminuição nos valores das medidas, tanto de comprimento total como de percentagem de comprimento cefálico (morfogênese) dos embriões. Estes resultados, referentes a embriões muito jovens – por exemplo, de 2 a 4 dias de desenvolvimento – podem estar refletindo um déficit nutricional provocado pelo efeito inibitório dos polissacarídeos sobre a vascularização vitelínica, assim como uma redução na disponibilidade de bFGF, tanto no seu papel de fator de crescimento vasculogênico, como na atividade morfogenética. Essa hipótese é consistente com o efeito da administração *in vitro* (idade de 1,5 – 3,5 dias) de SargA ou SargB, que reduziu a percentagem de comprimento cefálico dos embriões (CCV/CCC) para 34 e 33 % e 36 – 33 %, respectivamente.

A inibição da angiogênese, verificada na membrana corioalantóica em função da administração de SargA, ou SargB, não foi acompanhada da diminuição dos valores de comprimento total dos embriões de 8 dias de idade (**Figura 22**). Isto permite considerar que os vasos da CAM possam não estar envolvidos, tão diretamente, no processo de nutrição do organismo, quanto os vasos vitelínicos. Além disso, embriões relativamente tardios (6 – 8 dias) possuem curva de crescimento menos acentuada que embriões jovens (1,5 – 4 dias) e provavelmente um mecanismo regulador de manutenção da proporcionalidade no crescimento do corpo menos susceptível à interferência de fatores extrínsecos, como os tratamentos com os polissacarídeos em estudo

(Dias & Müller, 1998). Resta determinar se tal mecanismo seria o responsável pela diminuição ou manutenção do comprimento total do corpo de embriões de galinha nas idades de 4 e 8 dias respectivamente, ou se reflete somente um impacto no *status* nutricional.

Um dado marcante obtido a partir dos ensaios de vasculogênese e angiogênese é a inexistência de mortes entre os embriões tratados com o SargA ou SargB, mesmo nos grupos (embriões de 3,5 e 4 dias de desenvolvimento) em que foram registrados os menores valores de comprimento. A inexistência de mortes de embriões tratados no período de 2 – 4 dias, mas mantidos em cultura e monitorados por até 8 dias, permite considerar que o efeito inibitório da vasculogênese, obtido com a administração de SargA ou SargB, não envolva embriotoxicidade. Relatos de atividade antioxidante (Lim *et al.*, 2002) e, portanto, citoprotetora, obtida a partir dos extratos de uma outra espécie de alga parda (*Sargassum siliquastrum*), confere algum suporte a essa hipótese.

Um outro achado relevante do presente estudo foi o pronunciado efeito antitumoral do polissacarídeo SargA em camundongos portadores de tumor de melanoma da linhagem B16F10, sem produzir qualquer sinal evidente de toxicidade geral (tais como mortes ou perda de peso corporal) durante um período de observação de 2 semanas. Foram aplicadas injeções subcutâneas de SargA nas adjacências do tumor sólido e, após um período de tratamento de apenas 3 dias, SargA (150 µg/animal) retardou o crescimento do tumor ao longo dos 12 dias remanescentes do experimento, reduzindo o volume da massa tumoral em até 72 %.

Em abordagens *in vitro* SargA e SargB reduziram efetivamente a migração de células de melanoma B16F10. Em outro ensaio (método do MTT) ambos os polissacarídeos, mas principalmente SargA, reduziram a viabilidade de células dessa linhagem de melanoma. O MTT é um sal de tetrazólio reduzido a um derivado formazan, de cor azulada, devido à atividade oxidativa, que indica a existência de função mitocondrial e, por conseguinte, a viabilidade da célula (Mosmann, 1983; Carmichael *et al.*, 1987). Desde que a redução no número de células viáveis ocorreu sob concentrações de polissacarídeos cerca de 80 % maiores do que a dose inibitória efetiva na migração celular, é possível considerar que o efeito antitumoral exibido por SargA e SargB não seja devido exclusivamente à toxicidade.

Tem sido demonstrado que diversos polissacarídeos exibem propriedades antitumorais, incluindo a heparina (Folkman, 1971; Crum *et al.*, 1985; Zhang & Deuel, 1999), glucanas (Takaku *et al.*, 2001), sulfato de pentosana (Nguyen *et al.*, 1993), oligômeros de hialurana (Zeng *et al.*, 1998), derivados de polissacarídeos sulfatados (Leali *et al.*, 2001) e, especialmente, fucoidanas supersulfatadas (Soeda *et al.*, 1992, 1997, 2000; Koyanagi *et al.*, 2003). Além disso, o composto polianiônico suramin também é capaz de suprimir o crescimento de tumores (Coffey *et al.*, 1987; La Rocca *et al.*, 1990; Pesenti *et al.*, 1992). Portanto, é possível esperar que o mecanismo de ação antitumoral do SargA seja mediado, ao menos em parte, via propriedades antiangiogênicas (Sasisekharan *et al.*, 2002). Apesar disso, a evidência de que SargA e SargB também inibiram *in vitro* a migração de células de melanoma B16F10 e sua viabilidade, indica a existência de um mecanismo de ação antitumoral citotóxico-específico, adicional, desses polissacarídeos, o que

possivelmente contrasta com a ação antitumoral de outros agentes antiangiogênicos (Belo *et al.*, 2001) como a talidomida. A ação citotóxica (*in vivo* e *in vitro*) seletiva sobre determinadas linhagens de células tumorais (via ativação de macrófagos, liberação de citocinas – TNF- α – ou apoptose) desencadeada por alguns polissacarídeos, vem sendo publicada (Fujimiya *et al.*, 1998; Nakajima *et al.*, 2002; Shimizu *et al.*, 2002; Shu *et al.*, 2003).

Os resultados, no presente estudo, dos tratamentos *in vivo* e *in vitro* com os polissacarídeos sugerem que a atividade antitumoral seja resultante tanto de uma ação antiangiogênica como citostática; esta última, possivelmente em razão de falhas de mobilidade da matriz intracelular e/ou na adesão da célula ao substrato. Efeitos semelhantes, registrados a partir da administração de oligômeros de hialuronana (1 mg/ml), os quais competem pela ligação de moléculas de adesão celular CD44 com as glicosaminoglicanas da matriz, impedindo assim o crescimento das células de melanoma B16F10 (Zeng *et al.*, 1998), conferem algum suporte a essa idéia.

O bFGF vem sendo implicado no desenvolvimento de diversas patologias, entre as quais o câncer, em quase todos os sistemas orgânicos (Folkman, 1971; Bikfalvi *et al.*, 1997). Foi proposto que esse fator seja liberado das células como resultado de danos ou morte celular, sendo então estocado na membrana basal ou na matriz extracelular através de ligação a proteoglicanas (HSPGs) (Folkman *et al.*, 1988; Fachinger *et al.*, 1999). A interação do bFGF com a heparina o protege contra a desnaturação por efeito do calor, da acidez ou da ação de proteases (Nugent & Iozzo, 2000).

As proteoglicanas de sulfato de heparana estão envolvidas na transformação da célula normal em célula tumoral (Blackhall *et al.*, 1991).

Citocinas, como *pleiotrophin* e *midkine*, são conhecidas por se ligarem a glicosaminoglicanas. O complexo resultante poderia transduzir sinais oncogênicos para o interior da célula (Zhang & Deuel, 1999). Isso indica que uma seqüência específica de compostos heparinóides sulfatados, a exemplo do SargA, poderia ligar-se a proteínas específicas na superfície celular, interferindo no processo de transformação oncogênica. A estabilização dos dímeros de bFGF, ou VEGF, nos respectivos receptores, provida pelas moléculas de heparina (Fairbrother *et al.*, 1998) permite especular que o SargA poderia ligar-se ao fator de crescimento, inibindo assim seus efeitos biológicos na célula tumoral.

Alguns resultados aparentemente contraditórios têm sido reportados na literatura referente à atividade de polissacarídeos na vascularização. Estudos *in vitro*, relacionados à formação de vasos, indicam que os efeitos biológicos de polissacarídeos derivados de algas, parecem estar diretamente relacionados não só ao tipo de estrutura química, mas também ao seu peso molecular e, inclusive, ao modelo de estudo utilizado.

De acordo com Jackson *et al.* (1994), polissacarídeos sulfatados, tais como polisulfato de pentosana, heparina – um complexo polissacarídico típico que transporta grupamentos carregados negativamente (aniônicos), carboxilatos e sulfatos (Sinaÿ, 1999), sulfato de heparana, sulfato de dextrana e sulfato de condroitina podem estimular a formação de vasos (tubulogênese), enquanto os polissacarídeos não-sulfatados, como as xilanas e as dextranas, não mostram qualquer efeito. Outros estudos revelaram que o sulfato de pentosana, isoladamente ou em combinação com hidrocortisona, é um potente

inibidor angiogênico no ensaio da membrana corioalantóica (Nguyen *et al.*, 1993, 1994).

Por outro lado, resultados demonstram que hialuranas (polissacarídeos não-sulfatados) de alto peso molecular exibiram atividade antiangiogênica, enquanto os oligossacarídeos das hialuranas, ao contrário, estimularam tanto a proliferação de células endoteliais, como a tubulogênese (Miao *et al.*, 1997). As dextranas quimicamente modificadas aumentaram o efeito pró-angiogênico do bFGF (Rahmanian *et al.*, 1997), enquanto alguns compostos polianiónicos não-sulfatados e oligossacarídeos inibiram a proliferação de células endoteliais induzida por bFGF (Desgranges *et al.*, 1997). Além disso, a subsulfatação de glicosaminoglicanas reduziu a proliferação *in vitro* de células de uma linhagem de leucemia e de glioma (Alvarez-Silva & Trentin, 1996; Mendes de Aguiar *et al.*, 2002).

Segundo Matou *et al.* (2002) fucoidanas podem acentuar a tubulogênese *in vitro*, induzida por bFGF. Em contraste, outros trabalhos (Soeda *et al.*, 1997; 2000) utilizando modelos de estudo da angiogênese (matrigel® e gel de colágeno) revelaram que fucoidanas supersulfatadas inibiram a tubulogênese *in vitro*. Curiosamente, este último efeito foi observado tanto em ausência do bFGF, no modelo do matrigel®, como na presença do fator de crescimento em experimentos com o modelo do gel de colágeno. Entretanto, as fucoidanas nativas, i.é, não-supersulfatadas (controle) não produziram qualquer efeito.

Os estudos clínicos, realizados com o suramin confirmaram a potente atividade antitumoral dessa substância (Stein *et al.*, 1989; Myers *et al.*, 1992). A evidência de que compostos polianiónicos, tais como o suramin e moléculas análogas, podem mimetizar constituintes de matriz extracelular sugere que

outros compostos polianiônicos estejam aptos a se ligar ao bFGF. (Coffey *et al.*, 1987; Yayon & Klagsbrun, 1990; Pesenti *et al.*, 1992; Jackson *et al.*, 1994; Firsching *et al.*, 1995; Gagliardi *et al.*, 1998).

Embora o processo de extração utilizado no presente trabalho tenha produzido dois polissacarídeos de *S. stenophyllum* homogêneos, um estudo prévio (Duarte *et al.*, 2001) detectou a presença de duas frações distintas de fucoïdanas, entre outras frações de polissacarídeos, em extratos dessa espécie de alga. Assim, parece altamente provável que frações de fucoïdana obtidas naquele estudo, com procedimentos de extração ligeiramente diferentes, constituem produtos fracionados de SargA e SargB.

Entre os polissacarídeos encontrados na parede celular e na matriz de algas pardas (Phaeophyta) incluem-se os ácidos urônicos, manurônicos e gulurônicos dos alginatos, além de fucose, xilose e ácido glucurônico, provavelmente complexados em polímeros de glucurono-xilofucanas (Lobban & Wynne, 1981). Segundo esses autores, o sulfato de fucana presente em espécies de algas pardas como *Fucus vesiculosus* e *Ascophyllum nodosum* é geralmente descrito em separado como fucoïdana, ou como parte integral da glucuronoxilofucana, a qual pode ser também referida como ascofilana.

Segundo o estudo realizado por Duarte *et al.* (2001), sobre as características químicas de dois polissacarídeos isolados de amostras de *S. stenophyllum* coletadas no sul do Brasil, a diferença entre os dois subconjuntos de fucoïdanas é caracterizada pela existência de percentagens elevadas de ácido glucurônico e menor número de grupamentos-sulfato, sendo estes últimos situados em unidades de açúcares distintos. A α -L-fucose mostrou-se o componente majoritário da estrutura polissacarídica, mas outros açúcares,

como β -D-galactose, β -D-manose, α -D-ácido glucurônico, α -D-glucose e β -D-xilose, também foram detectados em quantidades substanciais. No presente trabalho, os ensaios de cromatografia de camada delgada revelaram uma composição de monossacarídeos similar, caracterizada por unidades de carboidrato de α -L-fucose, β -D-manose, β -D-galactose, β -D-xilose, α -D-glucose e de ácido glucurônico (**Anexo 4**).

Entre as moléculas de monossacarídeos constituintes dos polissacarídeos da espécie *S. stenophyllum*, os gliceraldeídos (em termos de carboidratos, gliceroses) são as aldoses mais simples (uma triose contendo um grupamento aldeído), possuindo um centro assimétrico e, portanto, dois enantiômeros (Orr, 1954; Lobban & Wynne, 1981; Collins & Ferrier, 1996). As restrições, no estudo das aldoses, estão relacionadas principalmente à duração das análises, uma vez que, conforme Collins & Ferrier (1996), “um único experimento com este grupo de açúcar toma mais tempo, em semanas, do que todas as outras classes de componentes sob análise geralmente consomem, em horas”.

Os espectros de infravermelho (**Anexo 2**) revelaram a presença dos grupamentos funcionais álcool, aldeído, amina e carboxila na estrutura química primária de SargA e SargB. Entretanto, a interpretação da estrutura de componentes ou frações de polissacarídeos, com base na utilização de espectros de infravermelho, é dificultada em razão da indisponibilidade de padrões suficientemente específicos para as comparações entre essas macromoléculas (Lim *et al.*, 2002). Isto demanda, adicionalmente, a utilização de outros métodos de análise da estrutura química, como a ressonância magnética nuclear (^{13}C -NMR) (**Anexo 3**).

De acordo com Duarte *et al.* (2001), as fucoidanas (**Anexo 3**) apresentam, entre outras características funcionais, as propriedades anticoagulante e antitrombótica, que são determinadas principalmente por cadeias de fucose sulfatadas (CFSs), especialmente, unidades de fucosila dissulfatadas. Corroborando esses achados, Mourão *et al.*, (1996) reportou a diminuição significativa nos níveis de atividade anticoagulante da condroitina fucosilada derivada do pepino-do-mar da espécie *L. grisea*, devido à remoção de CFSs. Outros estudos relativos ao efeito anticoagulante e/ou ao tempo de trombina de polissacarídeos sulfatados extraídos de organismos marinhos, conferem suporte adicional à inter-relação entre radicais de sulfato e a atividade antitrombótica (Nishino *et al.*, 1989; Nishino & Nagumo, 1992; Mauray *et al.*, 1995; Carlucci *et al.*, 1997; Trento *et al.*, 2001; Dias *et al.*, 2005 – No prelo).

Nos espectros de ^{13}C -NMR (**Anexo 3**), além de evidências da presença de radicais-carboxila, sinais típicos sugerem a ocorrência de grupamentos-sulfato nas posições C-2 e C-3 ou sulfato ligado a C-6 no SargA. Estes resultados são consoantes com os descritos anteriormente (Duarte *et al.*, 2001) sobre constituintes de polissacarídeos de *S. Stenophyllum*.

O espectro relativo à fração SargB apresenta considerável nível de ruído, comparativamente ao observado no espectro de ^{13}C -NMR da fração SargA, em decorrência, possivelmente, de degradação química incompleta (como na ação de celulases) ou do calor (o qual pode ter gerado gel), mostrando semelhanças com espectros de polímeros O-deacetilados (Gorin *et al.*, 1981). Estes aspectos evidenciam diferenças relevantes entre as estruturas químicas das frações polissacarídicas em estudo.

A análise química da fração SargA na forma nativa, por cromatografia de infravermelho, indicou a ocorrência de grupos-sulfato os quais consistem em uma das estruturas mais marcantes dos polissacarídeos de origem marinha e parecem estar diretamente relacionados às atividades angiostática e antitumoral, observadas no presente trabalho.

De fato, grupos-sulfato nas mesmas posições observadas na fração SargA são também característicos na estrutura química da heparina (Gorin *et al.*, 1981) (**Anexo 3**), sugerindo uma correlação com a suposta atividade heparinóide do SargA.

A continuidade das análises poderá revelar novas unidades estruturais ou constituintes não-previstos nos polissacarídeos SargA e SargB, tornando o esquema da interface entre estrutura química e atividade farmacológica possivelmente muito mais complexo.

6. Conclusões

Os modelos de estudo empregados viabilizaram a quantificação de novos vasos sanguíneos e de crescimento de tumores sólidos, bem como a avaliação da migração e viabilidade das células tumorais.

O método de extração produziu dois polissacarídeos homogêneos (SargA e SargB) de *S. stenophyllum* que se distinguem estruturalmente (espectros de cromatografia e ressonância), mas a presença de grupos químicos-sulfato sugere que os monossacarídeos básicos dos polissacarídeos correspondem a α -L-fucose (fucana).

Os polissacarídeos SargA e SargB inibiram os processos de vasculogênese na vesícula vitelínica de embriões de galinha incubados *in vivo* e *in vitro*, de angiogênese *in vivo* na membrana corioalantóica de embriões de galinha, sem evidência de embriotoxicidade – *CAM assay* – e na pele de camundongos adultos no ensaio do gelfoam,

Embora nos ensaios, tanto de vasculogênese como de angiogênese, o SargB tenha produzido efeitos significativos em todas as concentrações, o polissacarídeo SargA apresentou perfis de dose-resposta mais uniformes.

O polissacarídeo SargA potencializou o efeito inibitório da hidrocortisona sobre a vasculogênese, enquanto o SargB foi efetivo em potencializar esse efeito inibitório na angiogênese. Isto sugere um sinergismo entre os mecanismos de ação nas vias do glicocorticóide e dos polissacarídeos estudados.

O polissacarídeo SargB reverteu o efeito do bFGF no processo de vasculogênese, enquanto SargA foi mais efetivo em reverter o bem conhecido efeito pró-angiogênico do bFGF durante a angiogênese, sugerindo que este fator de crescimento desempenha um papel relevante, mas qualitativamente distinto, no efeito inibitório produzido pelos polissacarídeos.

O efeito antivasculogênico dos polissacarídeos, mas não o efeito antiangiogênico, ocorreu concomitantemente à redução no comprimento total e modificações na morfogênese embrionária (redução do comprimento cefálico na idade de 4 dias), o que sugere um bloqueio seletivo de mecanismos mediados por fatores de crescimento endógenos e morfógenos, por parte de SargA e SargB.

O tratamento com polissacarídeo SargA resultou em um efeito antitumoral pronunciado, com a redução do volume de tumores de melanoma B16F10 em camundongos, sem produzir morte ou perda de peso, efeito que parece ter sido mediado, via propriedades antiangiogênicas.

A inibição *in vitro* da migração de células do melanoma B16F10, bem como da sua viabilidade por parte de SargA e SargB apontam para um mecanismo adicional de ação antitumoral, citotóxico e seletivo, dos polissacarídeos nas células tumorais.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que a inibição de processos de formação de vasos sangüíneos pode concorrer para a inibição do crescimento de tumores, contribuindo assim para um banco de dados sobre princípios ativos com potencial aplicação clínica no bloqueio da neovascularização ou mesmo na regressão da vascularização patológica.

7. Referências Bibliográficas

- ABDEL-FATTAH, A.; HUSSEIN, M.M-D.; SALEM, H.M. Studies of the purification and some properties of sargassan, a sulphated heteropolysaccharide from *Sargassum linifolium*. **Carbohydr Res**, 33: 9 – 17. 1974.
- AGOCHA, A., LEE, H-W., EGHBALI-WEBB, M. Hypoxia regulates basal and induced DNA synthesis and collagen type I production in human cardiac fibroblasts: effects of transforming growth factor- β_1 , thyroid hormone, angiotensin II and basic fibroblast growth factor. **J Mol Cell Cardiology**, 29: 2233 – 2244. 1997.
- ALBANO, R.M.; PAVÃO, M.S.G.; MOURÃO, P.A.S.; MULLOY, B. Structural studies of a sulfated – L – galactan from *Styela plicata* (Tunicate): analysis of degraded polysaccharide. **Carbohydr Res** , 208: 163 – 174. 1990.
- ALVAREZ-SILVA, M. & TRENTIN, A.G. Undersulfation of glycosaminoglycans reduces the proliferation of a leukemia cell line *in vitro*. **Braz J Med Biol Res**, 29: 1239 – 1242. 1996.
- APLIN, A.E.; HOWE, A.; ALAHARI, S.K.; JULIANO, R.L. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: The role of integrins, cadherins and immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. **Pharmacological Rev**, 50: 2, 197 – 264. 1998.
- AREY, L.B. **Developmental Anatomy**. Saunders, London. 695pp. 1974.
- AYBAR, M.J. & MAYOR, R. Early Induction of neural crest cells: lessons learned from frog, fish and chick. **Curr Opin Genet Dev**, 12: 452 – 458. 2002.
- BAATOUT, S. Endothelial differentiation using matrigel. **Anticancer Res**, 17: 451 – 455. 1997.
- BARD, J. **Morphogenesis, the Cellular and Molecular Processes of Developmental Anatomy**. Cambridge University Press, New York, 313pp. 1994.
- BEÇAK, W. & PAULETE, J. **Técnicas de Citologia e Histologia**. Vol. 1. Livros Técnicos e Científicos, Rio de Janeiro. 305pp. 1976.
- BELO, A.V.; FERREIRA, M.A.; BOSCO, A.A.; MACHADO, R.D.; ANDRADE, S.P. Differential effects of thalidomide on angiogenesis and tumor growth in mice. **Inflammation**, 25(2): 91 - 96. 2001.
- BERGERS, G.; HANAHAN, D.; COUSSENS, L.M. Angiogenesis and apoptosis are cellular parameters of neoplastic progression in transgenic mouse models of tumorigenesis. *International*. **Int J Devl Biol**, 42: 995 - 1002. 1998.

- BERGERS, G. & BENJAMIN, L.E. Tumorigenesis and the angiogenesis switch. **Nat Rev Cancer**, 3: 401 – 410. 2003.
- BERLINCK, R.G.S.; OGAWA, C.A.; ALMEIDA, A.M.P.; SANCHEZ, M.A.A.; MALPEZZI, E.L.A.; COSTA, L.V.; HAJDU, E.; FREITAS, J.C. Chemical and pharmacological characterization of halitoxin from *Amphymedon viridis* (Porifera) from the southeastern Brazilian coast. **Comp Biochem Physiol**, 115C (2): 115 – 163. 1996.
- BERRY, D.; KWAN, C-P.; SHRIVER, Z.; VENKATARAMAN, G.; SASISEKHARAN, R. Distinct heparan sulfate glycosaminoglycans are responsible for mediating fibroblast growth factor-2 biological activity through different fibroblast growth factor receptors. **FASEB**, (Published online April 6, 2001 - Article 10.1096/fj.00-0661fje. 2001.
- BIKFALVI, A.; KLEIN, S.; PINTUCCI, G.; RIFKIN, D.B. Biological roles of fibroblast growth factor-2. **Endocr. Rev.** 18: 26 – 45.1997.
- BLACKHALL, F.H.; MERRY, C.L; DAVIES, E.J; JAYSON, G.C. Heparan sulfate proteoglycans and cancer. **Br J Cancer**, 85:1094–1098. 1991.
- BLAGOSKLONNY, M.V. Antiangiogenic therapy and tumor progression. **Cancer Cell**, 5: 13 – 17. 2004.
- BLUME-JENSEN, P. & HUNTER, T. Oncogenic kinase signaling. **Nature**, 411 (6835): 355 – 365. 2001.
- BLUMENKRANTZ, N. & ASBOE-HANSEN, G. New method for quantitative determination of uronic acids. **Anal Biochem.** 54, 484-489. 1973.
- BOWDEN,H.C.; TESH, J.M.; ROSS, F.W. Effects of female sex hormone in whole embryo culture. **Toxicol in vitro**, 7 (6): 799 - 802. 1993.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, 72: 248 - 254. 1976
- BROOKS, P.C.; CLARK, R.A.F.; CHERESH, D.A. Requirement of vascular integrin $\alpha_v\beta_3$ for angiogenesis. **Science**, 264: 569 – 571. 1994.
- BUPP BECKER, S.R. & SHIBLEY, I.A.Jr. Teratogenicity of ethanol in different chicken strains. **Alcohol Alcohol**, 33 (5):457 - 464. 1998.
- BURG, M.A.; HALFTER, W.; COLE, G.J. Analysis of proteoglycan expression in developing chicken brain: characterization of a heparan sulfate proteoglycan that interacts with the neural cell adhesion molecule. **J Neurosci Res**, 41: 49 – 64. 1995.

- CALIXTO, J.B.; SANTOS, A.R.S.; PAULINO, N.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. The plants of the genus *Phyllanthus* as a potential source of new drugs. **Ciência e Cultura**, 49 (5-6): 422 – 432. 1997.
- CARLUCCI, M.J.; PUJOL, C.A.; CIANCIA, C.; NOSEDA, M.D.; MATULEWICZ, M.C.; DAMONTE, E.B.; CERESO, A.S. Antiherpetic and anticoagulant properties of carrageenans from the red seaweed *Gigartina skottsbergii* and their cyclized derivatives: correlation between structure and biological activity. **Int J Biol Macromol**, 20: 97 – 105. 1997.
- CARMELIET, P. Angiogenesis in health and disease. **Nat Med**, 9 (6): 653 – 660. 2003.
- CARMELIET, P.; NUYENS, D.; THEILMEIER, G.; BRUSSELMANS, K.; CORNELISSEN, I.; EHLER, E.; KAKKAR, V.V.; STALMANS, I.; MATTOT, V.; PERRIARD, J.C.; DEWERCHIN, M.; FLAMENG, W.; NAGY, A.; LUPU, F.; MOONS, L.; COLLEN, D.; D'AMORE, P.A.; SHIMA, D.T. Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF-164 and VEGF-188. **Nat Med**, 5: 495 – 502. 1999.
- CARMELIET, P. & JAIN, R.K. Angiogenesis in cancer and other diseases. **Nature**, 407: 249 – 257. 2000.
- CARMICHAEL, J.; DEGRAFF, W.G.; GAZDAR, A.F.; MINN, J.D.; MITCHELL, J.B. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. **Cancer Res**, 47: 936 – 942. 1987
- CATALA, M.; TEILLET, M.A.; LE DOUARIN, N.M. Organization and development of the tail bud analyzed with the quail – chick chimaera system. Mechanisms of **Development**, 51: 51 – 65. 1995.
- CHAPMAN, S.C.; COLLIGNON, J.; SCHOENWOLF, G.C.; LUMSDEN, A. Improved method for chick whole-embryo culture using a filter paper carrier. **Dev Dynam**, 220: 284 – 289. 2001.
- CHIPPERFIELD, H.; KULDIP, S.B.; SIMON, M.C.; NURCOMBE, V. Heparan sulfates isolated from adult neural progenitor cells can direct phenotypic maturation. **Int J Dev Biol**, 46: 661 – 670. 2002.
- CHRIST, B. & ORDAHL, C.P. Early stages of chick somite development. **Anat Embryol**, 191: 381 - 396. 1995.
- COFFEY, R.J. Jr.; LEOF, E.B.; SHIPLEY, G.D.; MOSES, H.L. Suramin inhibition of growth factor receptor binding and mitogenicity in AKR-2B cells. **J Cell Physiol**, 132: 143 – 148. 1987.

- COLLINS, P.M. & FERRIER, R.J. Natural Products Related to and Containing Monosaccharides. In: **Monosaccharides. Their Chemistry and Their Roles in Natural Products**. Cap. 8. John Wiley & Sons, New York. p. 463 – 524. 1996.
- CORNELIUS, L.A.; NEHRING, L.C.; ROBY, J.D.; PARKS, W.C.; WELGUS, H.G. Human dermal microvascular endothelial cells produce matrix metalloproteinases in response to angiogenic factors and migration. **J Investitive Dermatol**, 105 (2): 170 – 176. 1995.
- CRAIGIE, J.S. **Biology of the Red Algae**. COLE KM & SHEATH RG (Eds.), Cambridge Press, Cambridge. pp.221-257. 1995.
- CRISTOFANILLI, M.; CHARNSANGAVEJ, C.; ORTOBAGYI, G.N. Angiogenesis modulation in cancer research: novel clinical approaches. **Nat Rev Drug Disc**, 1: 415 – 426. 2002.
- CRUM, R.; SZABO, S.; FOLKMAN, J. A new class of steroids inhibits angiogenesis in the presence of heparin or a heparin fragment. **Science**, 230: 1375 – 1378. 1985.
- D'AMORE, P.A. & THOMPSON, R.N. Mechanism of angiogenesis. **Annu Rev Physiol**, 49: 453 – 464. 1987.
- DANESI, R.; DEL BIANCHI, S.; SOLDANI, P.; CAMPAGNI, A.; LA ROCCA, R.V.; MYERS, C.E.; PAPARELLI, A.; DEL TACCA, M. Suramin inhibits bFGF- induced endothelial cell proliferation and angiogenesis in the chick chorioallantoic membrane, **Br J Cancer**, 68 (5): 932 - 938. 1993.
- DAVIS, D.L. & BRADLOW, H.L. Can environmental estrogens cause breast cancer? **Sci Am**, Oct: 145 - 149. 1995.
- DA ROCHA e SILVA, M.; BELO, A.V.; MACHADO, R.D.; ANDRADE, S.P. Clotrimazole is an inhibitor of inflammatory angiogenesis and the metabolic activity in sponge granuloma. **Inflammation**, 22(6): 643 - 651. 1998.
- DE PABLO, F.; ROTH, J.; HERNANDEZ, E.; PRUSS, R.M. Insulin is present in chicken eggs and early chick embryos. **Endocrinology**, 111 (6): 1909 - 1916. 1982.
- DESGRANGES, P.; BARRITAU, D.; CARUELLE, J.P.; TARDIEU, M. Transmural endothelialization of vascular prostheses is regulated *in vitro* by fibroblast growth factor 2 and heparan-like molecule. **Int J Artif Organs**, 20: 589 – 598. 1997.
- DE VRIES, D.J. & BEANT, P.M. Fishing for drugs from the sea: status and strategies. **Trends in Pharm Sci**, 16: 275 - 278. 1995.

- DHOOT, G.K.; GUSTAFSSON, M.K.; AL, X.; SUN, W.; STANDIFORD, D.M.; EMERSON Jr, C.P. Regulation of Wnt signaling and embryo patterning by an extracellular sulfatase. **Science**, 293: 1663 – 1666. 2001.
- DIAS, P.F. & MÜLLER, Y.M.R. Características do desenvolvimento embrionário de *Gallus domesticus*, em diferentes temperaturas e períodos de incubação. **Braz J Veter Res Animal Sci**, 35 (5): 233 - 235. 1998.
- DIAS, P.F. & MÜLLER Y.M.R. Ação da insulina na morfogênese de embriões de *Gallus domesticus*. **Rev Bras Biol**, 59(2): 343 - 350. 1999.
- DIAS, P.F.; SIQUEIRA, J.M.; VENDRUSCOLO, L.F.; NEIVA, T.J.; MARASCHIN, M.; GAGLIARDI, A.R.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M. Antiangiogenic and antitumoral properties of polysaccharide isolated from the seaweed *Sargassum stenophyllum*. **Cancer Chemother Pharm**, No Prelo. 2005.
- DORDUNOO, S.; JACKSON, J.K.; ARSENAULT, L.A.; OKTABA, A.M.C.; HUNTER, W.L.; BURT, H.M. Taxol encapsulation in poly(ϵ -caprolactone) microspheres. **Cancer Chemoth Pharm**, 36: 279 – 282. 1995.
- DOWD, C.J.; COONEY, C.L.; NUGENT, M.A. Heparan sulfate mediates bFGF transport through basement membrane by diffusion with rapid reversible binding. **J Biol Chem**, 274: 5236 – 5244. 1999.
- DRABKIN, D.L. & AUSTIN, J.H. Spectrophotometric constants for common hemoglobin derivatives in human, dog, and rabbit blood. **J Biol Chem**, 98: 719 – 722. 1932.
- DRAKE, C.J.; CHERESH, D.A.; LITTLE, C.D. An antagonist of integrin $\alpha_v\beta_3$ prevents maturation of blood vessels during embryonic neovascularization. **J Cell Sci**, 108: 2655 – 2661. 1995.
- DUARTE, M.E.R.; CARDOSO, M.A.; NOSEDA, M.; CEREZO, A.S. Structural studies on fucoidans from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum*. **Carbohydr Res**, 333: 281 – 293. 2001.
- EGEBLAD, M. & WERB, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nat Rev Cancer**, 2 (3): 161-174. 2002.
- EKBLON, P. Extracellular matrix in animal development role of extracellular matrix in animal development - An introduction, **Experientia**, 5: 851 - 852. 1995.
- EYAL-GILADI, H. The early embryonic development of the chick, as an epigenetic process. **Critical Rev Poultry Biol**, 3: 143 - 166. 1991.
- FACHINGER, G.; DEUTSCH, U.; RISAU, W. Functional interaction of vascular endothelial-protein-tyrosine phosphatase with the angiopoietin receptor Tie-2. **Oncogene**, 18(43): 5948-5953. 1999.

- FAFEUR, V.; JIANG, Z.P.; BOHLEN, P. Signal transduction by bFGF , but not TGFB1, involves arachidonic acid metabolism in endothelial cells. **J Cell Physiol**, 149: 277 - 283. 1991.
- FAIRBROTHER, W.J.; CHAMPE, M.A.; CHRISTINGER, H.W.; KEYT, B.A.; STAROVASNIK, M.A. Solution structure of the heparin-binding domain vascular endothelial growth factor. **Structure** 6: 637–648. 1998.
- FERRARA, N.; GERBER, H-P.; LECOUTER, J. The Biology of VEGF and its receptors. **Nat Med**, 9 (6): 669 – 676. 2003.
- FERRIER, C.M.; MUIJEN, G.N.P.; RUITER, D.J. Proteases in cutaneous melanoma. **Ann. Med.**, 30: 341 – 442. 1998.
- FIDLER, I.J. Selection of successive tumor lines for metastasis. **Nat New Biol**. 242: 148 – 149. 1973.
- FIDLER, I.J. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. **Nat Rev Cancer**, 3: 1 – 6. 2003.
- FIRSCHING, A.; NICKEL, P.; MORA, P.; ALLOLIO, B. Antiproliferative and angiostatic activity of suramin analogs. **Cancer Res.**, 55, 4957 – 4963. 1995.
- FLEMING, A.; GERRELLI, D.; GREENE, N.D.E.; COPP, A.J. Mechanisms of normal and abnormal neurulation: evidence from embryo culture studies. **Int J Dev Biol**, 41: 199 - 212. 1997.
- FOLBERG, R.; HENDRIX, M.J.; MANIOTIS, A.J. Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. **Am J Pathol**. 156(2): 361-381. 2000.
- FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. **N Engl J med**, 285: 1182 – 1186. 1971.
- FOLKMAN, J. Clinical applications of research on angiogenesis. **N Engl J Med**, 333: 1757 – 1763. 1995a.
- FOLKMAN, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. **Nat. Med**, 1: 27 – 31. 1995b.
- FOLKMAN, J & KLAGSBRUN, M. Angiogenic growth factors. **Science**, 235: 442 – 447. 1987.
- FOLKMAN, J.; KLAGSBRUN, M.; SASSE, J.; WADZINSKI, M.; INGBER, D.; VLODAVSKY, I. Heparin-binding angiogenic protein-basic Fibroblast growth factor is stored within basement membrane. **Am J Pathol**, 130: 393 – 400. 1988.
- FOLKMAN, J. & SHING, Y. Control of angiogenesis by heparin and other sulfated polysaccharides. **Adv Exp Med Biol**, 313: 355 – 364. 1992.

- FONTANA, J.D.; GEBARA, M.; BLUMEL, M.; SCHNEIDER, H.; MACKENZIE, R.; JOHNSON, K.G. The α -4-O-methyl-D-glucuronidase component of xylanolytic complexes. **Meth Enzymol.**, 160:560-571. 1988.
- FRÉMONT, L. Biological effects of resveratrol. **Life Sci**, 66 (8): 663 - 673. 2000.
- FRIESEL, R.E. & MACIAG, T. Molecular mechanisms of angiogenesis: fibroblast growth factor signal. **FASEB**, 9: 919 - 925. 1995.
- FUJIMIYA, Y.; SUZUKI, Y.; OSHIMAN, K.; KOBORI, H.; MORIGUCHI, K. NAKASHIMA, H.; MATUMOTO, Y.; TAKAHARA, S.; EBINA, T.; KATAKURA, R. Selective tumoricidal effect of soluble proteoglycan extracted from basidiomycete, *Agaricus blazei* Murrill, mediated via natural killer cell activation and apoptosis. **Cancer Immunol Immun**, 46: 147 – 159. 1998.
- GAGLIARDI, A.R.; HADD, H.E.; COLLINS, D.C. Inhibition of angiogenesis by suramin. **Cancer Res**, 52: 5073 - 5075. 1992.
- GAGLIARDI, A.R. & COLLINS, D.C. Inhibition of angiogenesis by antiestrogens. **Cancer Res**, 53: 533 – 535. 1993.
- GAGLIARDI, A.R.; KASSACK, M.; KREYMEYER, A.; MULLER, G.; NICKEL, P.; COLLINS, D. Antiangiogenic and antiproliferative activity of suramin analogs. **Cancer Chemoth Pharm**. 41, 117–120. 1998.
- GAGLIARDI, A.R.; HENNIG, B.; COLLINS, D.C. Antiestrogens inhibit endothelial cell growth stimulation by angiogenic growth factors. **Anticancer Res**, 16: 1101 – 1106. 1996.
- GALLAGHER, J.T. Heparan sulphates as membrane receptors for the fibroblast growth factor. **Eur J Clin Chem Clin Biochem**, 32, 239–247. 1994.
- GALE, N.W. & YANCOPOULUS, G.D. Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins and ephrins in vascular development. **Genes Dev**, 13: 1055 – 1066. 1999.
- GEHM, B.D.; McANDREWS, J.M.; CHIEN, P-Y. JAMESON, J.L. Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. **Proc Natl Acad Sci USA**, 94 (25): 14138 – 14143. 1997.
- GEIGER, B.; BERSHADSKY, A.; PANKOV, R.; YAMADA, K.M. Transmembrane extracellular matrix-cytoskeleton crosstalk. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 2: 793 – 805. 2001.
- GILBERT, S.F. **Developmental Biology**. 4 ed. Sinauer. Massachusetts. 768pp. 2000.

- GILBERT, S.F. & RAUNIO, A.M. **Embryology, Constructing the organism**. Sinauer. 537 pp. 1997.
- GOLDMANN, T.; SUTER, L.; RIBBERT, D.; OTTO, F. The expression of proteolytic enzymes at the dermal invading front of primary cutaneous melanoma predicts metastasis. **Pathol Res Pract**, 195: 171 – 175. 1999.
- GOODRUM, G.R. & JACOBSON, A.G. Cephalic flexure formation in the chick embryo. **J Embryol Exp Zool**, 216: 339 – 408. 1981.
- GORDON-THOMPSON, C. SALM, N.; FABIAN, B.C. The inhibitory effect of heparin on early development in chick embryos. **Proc Electr Microsc Soc Southern Africa**, 18: 57. 1988.
- GORIN, P.A.J. Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Polysaccharides. In: TIPSON ST & DEREK H. (Orgs.) **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**. Vol. 38. Academic Press, New York. P.13 – 104. 1981.
- GUIMOND, S.; MACCARANA, M.; OLWIN, B.B.; LINDAHL, U.; RAPRAEGER, A.C. Activating and inhibitory heparin sequences for FGF-2 (basic FGF). Distinct requirements for FGF-1, FGF-2, and FGF-4. **J Biol Chem**, 268 (32): 23906 – 23914. 1993.
- GULLINO, P.M. Angiogenesis and oncogenesis. **J Natl Cancer Inst**, 61: 639 – 643. 1978.
- GRIDLEY, T. Notch signaling during vascular development. **Proc Natl Acad Sci USA** 98, 10733–10738. 2001.
- GRUMET, M.; FLACEUS, A.; MARGOLIS, R.R.U. Functional characterization of chondroitin sulphate proteoglycans of brain: interaction with neuron and neural cell adhesion molecules. **J Cell Biol**, 120 (3): 815 - 824. 1993.
- GUMBINER, B.M. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. **Cell**, 84: 345 - 357. 1996.
- GUSH, R.; THOMPSON, J.; WEISS, J. Measurement of blood flow with duck egg yolk sac membrane. **J Med Eng Tech**, 14: 205 – 209. 1990.
- HAMADA, J.; SAWAMURA, Y.; van MEIRQ, E.G. CD44 expression and growth factors. **Frontiers in Bioscience**, 3: 657 – 664. 1998.
- HAMBURGER, V. & HAMILTON, H. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **J Morphol**, 88: 49 - 92. 1951.
- HANAHAN, D. & FOLKMAN, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. **Cell**, 86: 353 - 364. 1996.

- HARRIS, A. Hypoxia - a key regulatory factor in tumour growth. **Nat Rev Cancer**, 2: 39 – 47. 2002.
- HAZEN, L.G.M.; BLEEKER, F.E.; LAURITZEN, B.; BAHNS, S.; SONG, J.; JONKER, A.; van DRIEL, B.E.M.; LYON, H.; HANSEN, U.; KOHLER, A.; van NOORDEN, C.J.F. Comparative localization of cathepsin B protein and activity in colorectal cancer. **J Histochem Cytochem.** 40 (10): 1421 – 1430. 2000.
- HENDRIX, M.J.C.; SEFTOR, E.A.; HESS, A.R.; SEFTOR, R.E.B. Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. **Nat Rev Cancer**, 3: 411 – 421. 2003.
- HERKOVITS, J. Are shape and morphogenesis independent phenomena? **Experientia**, 33: 510 - 513. 1977.
- HESS, A.R.; SEFTOR, E.A.; SEFTOR, R.E.B.; HENDRIX, M.J.C. Phosphoinositide 3-kinase acts downstream of EphA2 to regulate the membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) promoting vasculogenic mimicry *in vitro*. **Mol Biol Cell** 13, 210A . 2002.
- HLATKY, L & FOLKMAN, J. Clinical application antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us. **J Natl Cancer Inst**, 94: 883 – 893. 2002.
- HOOD, J.D. & CHERESH, D.A. Role of integrins in cell invasion and migration. **Nat Rev Cancer** , 2: 91 – 100. 2002.
- HORWITZ, A.F. Integrins and health. **Sci Am**, May: 46 - 53. 1997.
- HOUILLON, C. **Embriologia**. Edgard Blücher, São Paulo. 160 pp. 1972.
- HUA, J.; SAKAMOTO, K.; NAGAOKA, I. Inhibitory actions of glucosamine, a therapeutic agent for osteoarthritis, on the functions of neutrophils. **J Leukocyte Biol**, 71: 632 - 640. 2002.
- HUETTNER, A. **Fundamentals Comparative Embryology of the Vertebrates**. Mac Millan, New York. 309 pp. 1949.
- IGURA, K.; OHTA, T.; KURODA, Y.; KAJI, K. Resveratrol and quercetin inhibit angiogenesis *in vitro*. **Cancer Lett**, 171: 11 – 16. 2001.
- INGBER, D.; FUGITA, T.; KISHIMOTO, S.; SUDO, K.; KANAMARU, T.; BREM, H.; FOLKMAN, J. Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumor growth. **Nature**, 348: 555 – 557. 1990.

- IRUELA-ARISPE, M.L.; LANE, T.F.; REDMOND, D.; REILLY, M.; BOLENDER, R.P.; KAVANAGH, T.J.; SAGE, E.H. Expression of SPARC during development of the chicken chorioallantoic membrane: evidence for regulated proteolysis *in vivo*. **Mol Biol Cell**, 6: 327 – 343. 1995.
- JACKSON, C.J.; GILES, I.; KNOP, A.; NETHERY, A.; SCHRIEBER, L. Sulfated polysaccharides are required for collagen-induced vascular tube formation. **Exp Cell Res**, 215: 294 – 302. 1994.
- JAIN, R.K. Barriers to drug delivery in solid tumors. **Sci Am**, July: 42 - 49. 1994.
- JAIN, R.K.; MUNN, L.L.; FUKUMURA, D. Dissecting tumour pathophysiology using intravital microscopy. **Nat Rev Cancer**, 2: 266 – 276. 2002.
- JAKOB, W.; JENTZSCH, K.D.; MAUERSBERGER, B. & HEDER, G. The chick embryo chorioallantoic membrane as a bioassay for angiogenesis factors: reactions induced by carrier materials. **Exp Pathol**, 15 (5): 241 – 249. 1978.
- JANG, M.; CAI, L.; UDEANI, G.O.; SLOWING, K.V.; THOMAS, C.F.; BEECHER, C.W.W.; FONG, H.H.S.; FARNSWORTH, N.R.; KINGDOM, D.; MEHTA, R.G.; MOON, R.C.; PEZZUTO, J.M. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. **Science**, 275: 218 - 220. 1997.
- JONES, N. & DUMONT, D.J. Recruitment of Dok-R to the EGF receptor through its PTB domain is required to attenuation of Erk MAP kinase activation. **Curr Biol**, 9: 1057 – 1060. 1999.
- JONES, N.; ILJIN, K.; DUMONT, D.J.; ALITALO, K. Tie receptors: new modulators of angiogenic and lymphangiogenic responses. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 2: 257 – 267. 2001.
- JORDAN, K. Designer estrogens. **Sci Am**, Oct, 36 - 43. 1998.
- KAKIUCHI, Y.; TSUJI, S.; TSUJI, M.; MURATA, H.; KAWAI, N.; YASUMARU, M.; KIMURA, A.; KOMORI, M.; IRIE, T.; MIYOSHI, E.; SASAKI, Y.; HAYASHI, N.; KAWANO, S.; HORI, M. Cyclooxygenase-2 activity altered the cell-surface carbohydrate antigens on colon cancer cells and enhanced liver metastasis. **Cancer Res**, 62: 1567 – 1572. 2002.
- KALLURI, R. basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. **Nat Rev Cancer**, 3: 423 – 433. 2003.
- KÁLMÁN, F.; VIRÁGH, S.; MÓDIS, L. Cell surface glycoconjugates and the extracellular matrix of the developing mouse embryo epicardium. **Anat Embryol**, 191: 451 - 464. 1995
- KALOMIRIS, E.L. & BOURGUIGNON, L.Y.W. Lymphoma protein kinase C is associated with the transmembrane glycoprotein GP85 and may function in GP85-ankirin binding. **J Biol Chem**, 264: 8113 – 8119. 1989.

- KANDEL, J.; BOSSY-WETZEL, L.; RABVANYI, F.; KLAGSBRUM, M. FOLKMAN, J.; HANAHAN, D. Neovascularization is associated with a switch to the export of bFGF in the multistep development of fibrosarcoma. **Cell**, 66:1905–1104. 1991.
- KATZ, B.Z. & YAMADA, K.M. Integrins in morphogenesis and signaling. **Biochimie**, 79: 467 - 476. 1997.
- KATZUNG, B.G. **Farmacologia Básica e Clínica**. Guanabara Koogan, 6 ed. Rio de Janeiro, 854pp. 1998.
- KOCH, A.E. Angiogenesis. Implications for reumathoid arthritis, **Arthritis Rheum**, 41 (6): 951 – 962. 1998.
- KOCH, A.E.; CHO, M.; BURROWS, J.C.; POLVERINI, P.J.; LEIBOVICH, S.J. Inhibition of production of monocyte/macrophage-derived angiogenic activity by oxygen free-radical scavengers. **Cell Biol International Reports**, 16 (5): 415 – 425. 1992.
- KÖNIG, G.M. & WRIGHT, A.D. Marine natural products research. Current directions and future potential. **Planta Med**, 62: 193 - 211. 1995.
- KOOLWIJK, P.; ERCK, M.G.M. van.; DE VREE, W.J.A.; VERMEER, M.A.; WEICH, H.A.; HANEMAAIJER, R.; HINGSBERGH, V.W.M. van. Cooperative effect of $TNF\alpha$, bFGF and VEGF on the formation of tubular structures of woman microvascular endothelial cells in a fibrin matrix: role of urokinase activity. **J Cell Biol**, 132: 1177- 1188. 1996.
- KOYANAGI, S.; TANIGAWA, N.; NAKAGAWA, H.; SOEDA, S.; SHIMENO, H. Oversulfation of fucoidan enhances its anti-angiogenic and antitumor activities. **Biochem Pharmacol**, 65: 173 – 179. 2003.
- KUBOTA, Y.; KLEINMAN, H.K.; MARTIN, G.R.; LAWLEY, T.J. Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary like structures. **J Cell Biol**, 107: 1589 – 1598. 1988.
- KUWAMA, M.; OKAZAKI, Y.; YASUAKA, H.; KAWAKAMI, Y.; IKEDA, Y. Defective vasculogenesis in systemic sclerosis. **Mechanisms of Disease**, 364: 603-610. 2004.
- LA ROCCA, R.; STEIN, C. DANESI, R.; JAMIS-DOW, C.; WEISS GMYERS, C. Suramin in adrenal cancer: modulation of steroid hormone production, cytotoxicity *in vitro* and clinical antitumor effect. **J Clin Endocrinol Metab**, 71: 497 – 506. 1990.
- LEALI, D.; BELLERI, M.; URBINATI, C.; COLTRINI, D.; ORESTE, P.; ZOPPETTI, G.; RIBATTI, D.; RUSNATI, M.; PRESTA, M. Fibroblast growth factor-2 antagonist activity and angiostatic capacity of sulfated Escherichia coli K5 polysaccharide derivatives. **J Biol Chem**, 276 (41): 37900 – 37908. 2001.

- LEE, Y.S.; YANG, H.O.; SHIN, K.H.; CHOI, H.S.; JUNG, S.H.; HOON, S.; KIM, Y.M.; OH, D.K.; LINHARDT, R.J.; KIM, Y.S. Suppression of tumor growth by a new glycosaminoglycan isolated from the African giant snail *Achatina fulica*. **Eur J Pharmacol**, 465: 191– 198. 2003.
- LEHNINGER, A.L. Carboidratos: Estrutura e Função Biológica. In: **Princípios de Bioquímica**. Cap 11. Sarvier, São Paulo. p. 206 – 221. 1988.
- LEIBOVICH, S.J.; POLVERINI, P.J.; FONG, T.W.; HARLOW, L.A.; KOCH, A.E. Production of angiogenic activity by human monocytes requires an L-arginine/nitric oxide-synthase-dependent effector mechanism. **Proc Natl Acad Sci USA**, 91: 4190 – 4194. 1994.
- LIM, S.N.; CHEUNG, P.C.K.; OOI, V.E.C.; ANG, P.O. Evaluation of antioxidative activity of extracts from a brown seaweed, *Sargassum siliquastrum*. **J Agric Food Chem**, 50: 3862 – 3866. 2002.
- LIU, C.H.; CHANG, S.H.; NARKO, K.; TRIFAN, O.C.; WU, M.T.; SMITH, E.; HAUDENSCHILD, C.; LANE, T.F.; HLA, T. Over-expression of cyclooxygenase (Cox)-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice. **J Biol Chem**, 276(21):18563-9 – 18569. 2001.
- LOCKSHIN, R.A. & ZAKERI, Z. Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 2 (7): 545-550. 2001.
- LOBBAN, C.S. & WYNNE, M.J. The Biology of Seaweeds. Vol. 17, In: **Botanicals Monographs**. Blackwell Scientific Publ, London. 786pp. 1981.
- LOKESHWAR, V.D.; FREGIEN, N.; BOURGUIGNON, L.Y.W. Ankirin binding domain of CD44 (GP85) is required for the expression of hyaluronic acid-mediated adhesion function. **J Cell Biol**. 126: 391 – 401. 1994.
- MA, L.; RUDERT, W.A.; HARNAHA, J.; WRIGHT, M.; MACHEN, J.; LAKOMY, R.; QIAN, S.; LU, L.; ROBBINS, P.D.; TRUCCO, M.; GIANNOUKAKIS, N. Immunosuppressive effects of glucosamine. **J Biol Chem**, 277(42): 39343 - 39349. 2002.
- MALTEPE, E.; SCHMIDT, J.V.; BAUNOCH, D.; BRADFIELD, C.A.; SIMON, M.C. Abnormal angiogenesis and responses to glucose and oxygen deprivation in mice lacking the protein ARNT. **Nature**, 386: 403 – 407. 1997.
- MANIOTIS, A.J.; FOLBERG, R.; HESS, A.; SEFTOR, E.A.; GARDNER, L.M.; PE'ER, J.; TRENT, J.M.; MELTZER, P.S.; HENDRIX, M.J. Vascular channel formation by human melanoma cells *in vivo* and *in vitro*: vasculogenic mimicry. **Am J Pathol**. 155(3):739-52. 1999.
- MÄNNER, J. Formation of cervical flexure: an experimental study on chick embryos. **Acta Anat**, 152: 1 - 10. 1995.

- MÄNNER, J.; SEIDL, W.; STEDING, G. Correlation between the embryonic head flexures on cardiac development. An experimental study in chick embryo. **Anat Embryol**, 188: 269 – 285. 1993.
- MANOLOPOULUS, V.G.; LIEKENS, S.; KOOLWIJK, P.; VOETS, T.; PETERS, E.; DROOGAMANS, G.; LELKES, P.I.; DE CLERCQ, E.; NILIUS, B. Inhibition of angiogenesis by blockers of volume-regulated anion channels. **Gen Pharmacol**, 34: 107 – 116. 2000.
- MARASCHIN, M.; CAROBREZ, S.G.; PERSIKE, D.; PEIXOTO, M.L.; FERREIRA, A.G.; FERRACIN, R.; VERPOORTER, R.; FONTANA, J.D. Cell wall polysaccharides from *Mandevilla velutina* (Apocynaceae) cultured cells: extraction and chemical structure. **Carbohydr Polym** 41: 55-60. 2000.
- MATOU, S.; HELLY, D.; CHABUT, D.; BROS, A.; FISCHER, A-M. Effect of fucoidan on fibroblast growth factor-2-induced angiogenesis *in vitro*. **Thromb Res**, 106: 213 – 221. 2002.
- MAURAY, S.; STERNBERG, C.; THEVENIAUX, J.; MILLET, J.; SINQUIN, C.; TAPON-BRETAUDIÈRE, J.; FISCHER, A.M. Venous antithrombotic and anticoagulant activities of a fucoidan fraction. **Thromb Haemost**, 74:1280–1285. 1995.
- MAYER, A.M.S.; PAUL, V.J.; FENICAL, W.; NORRIS, J.N.; CARVALHO, M.S.; JACOBS, R.S. Phospholipase A₂ inhibitors from marine algae. **Hydrobiologia**, 260/261: 521 - 529. 1993.
- MCCORMICK, J.F.; NASSAUER, J.; BIELUNAS, J.; LEIGHTON, J. Anatomy of the chick chorioallantoic membrane relevant to its use as a substrate in bioassay systems. **Scan Electron Microsc.** 4: 2023 – 2030. 1984.
- MELINO, G. The Sirens' song. **Nature**, 412(6842): 23 - 24. 2001.
- MENDES, D.E.; AGUIAR, C.B.; GARCEZ, R.C.; ALVAREZ-SILVA, M.; TRENTIN, A.G. Undersulfation of proteoglycans and proteins alter C6 glioma cells proliferation, adhesion and extracellular matrix organization. *Int J Dev Neurosci*, 20(7): 563-571. 2002.
- MEYER, S. & JACOBSON, A.G. Experimental studies of the origin and expression of metameric pattern in chick embryo. **J Exp Zool**, 219: 217 – 232. 1982.
- MEYERS, M.O.; GAGLIARDI, A.R.; FLATTMANN, G.J.; SU, J.L.; WANG, M.D.; WOLTERING, E.A. Suramin analogs inhibit human angiogenesis *in vitro*. **J Surg Res**, 91: 130 – 134. 2000.
- MIAN, A.J, & PERCIVAL, E. Carbohydrates of the brown seaweeds *Himantalia lorea* and *Bifurcaria bifurcata*. Structural studies of the “fucans”. **Carbohydr Res** , 26: 147 – 16. 1973.

- MIAO, H.; ORNITZ, D.M.; AINGORN, E.; BEN-SASSON, S.A.; VLODAVSKY, I. Modulation of fibroblast growth factor-2 receptor binding, dimerization, signaling, and angiogenic activity by a synthetic heparin-mimicking polyanionic compound. **J Clin Invest**, 99: 1565– 1575. 1997.
- MIQUEROL, L.; LANGILLE, B.L.; NAGY, A. Embryonic development is disrupted by modest increases in vascular endothelial growth factor gene expression. **Development**, 127: 3941 – 3946. 2000.
- MOORE, K.L. & PERSEAUD, T.V.N. **The Developing Human. Clinical Oriented Embryology**. 7 ed. Elsevier, New York. 609pp. 2004.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J.Immunol. Methods**. 65: 55 – 63. 1983.
- MOURÃO, P.A.S.; PEREIRA, M.S.; PAVÃO, M.S.G.; MULLOY, B.; TOLLEFSEN, D.M.; MOWINCKEL, M-C.; ABILDGAARD, U. Structure and anticoagulant activity of a fucosylated chondroitin sulfate from echinoderm. **J Biol Chem**, 271 (39): 23973 – 23984. 1996.
- MOURY, J.D. & SCHOENWOLF, G.C. Cooperative model of epithelial shaping and bending during avian neurulation: autonomous movements of the neural plate, autonomous movements of the epidermis and interactions in the neural plate/epidermis transition zone. **Dev Dynam**, 204: 323 - 337. 1995.
- MUNDHENKE, C.; MEYER, K.; DREW, S.; FRIEDL, A. Heparan Sulfate Proteoglycans as Regulators of Fibroblast Growth Factor-2 Receptor Binding in Breast Carcinomas. **Am J Pathol**, 160: 185-194. 2002.
- MYERS, C.; COOPER, M.; STEIN, C.; LA ROCCA, R.; MC CLELLAN, M.W.; WEISS, G.; CHOYKE, P.; DAWSON, N.; STEINBERG, S.; UHRICH, M.M.; CASSIDY, J.; KOHLER, D.R.; TREPEL, J.; LINEHAN, M.W. Suramin: a novel growth factor antagonist with activity in hormone–refractory metastatic prostate cancer. **J Clin Oncol**, 10:881–889. 1992.
- NADER, H.B.; DIETRICH, C.P.; BUONASSONI, V.; COLBURN, P. Heparin sequences in the heparan sulfate chains of an endothelial cell proteoglycan. **Proc Natl Acad Sci USA**, 84: 3565 - 3569. 1987.
- NAKAJIMA, A.; ISHIDA, T.; KOGA, M. TAKEUCHI, M. Effect of water from *Agaricus blazei* Murrill on antibody - producing cells in mice. **Int Immunopharm**, 303: 1205-1211. 2002.
- NAOT, D.; SIONOV, R.D.; ISH-SHALOM, D. CD44: structure, function and association with the malignant process. **Adv. Cancer Res**. 71: 241 – 319. 1997.

- NEUFANG, G.; FURSTENBERGER, G.; HEIDT, M.; MARKS, F.; MULLER-DECKER, K. Abnormal differentiation of epidermis in transgenic mice constitutively expressing cyclooxygenase-2 in skin. **Proc Natl Acad Sci USA**, 98(13): 7629 – 7634. 2001.
- NGUYEN, N.M.; LEER, J.E.; PIANTA, K.J. Pentosan inhibits angiogenesis *in vitro* and suppresses prostate tumor growth *in vivo*. **Anticancer Res**, 13(6A): 2143 - 2147. 1993.
- NGUYEN, M.; SHING, Y.; FOLKMAN, J. Quantitation of angiogenesis and antiangiogenesis. In the chick embryo chorioallantoic membrane. **Microvasc Res**, 47: 31 – 40. 1994.
- NISHINO, T.; YOKOYAMA, G.; DOBASHI, K.; FUJIHARA, M.; NAGUMO, T. Isolation, purification, and characterization of fucose-containing sulfated polysaccharides from the brown seaweed *Ecklonia kurome* and their blood-anticoagulant activities. **Carbohydr Res**, 186: 119 - 129. 1989.
- NISHINO, T. & NAGUMO, T. Anticoagulant and antithrombin activities of oversulfated fucans. **Carbohydr Res**, 229: 355 - 362. 1992.
- NISHINO, T.; NISHIOKA, C.; URA, H.; NAGUMO, T. Isolation and partial characterization of a novel amino sugar-containing fucan sulfate from commercial *Fucus vesiculosus* fucoidan. **Carbohydr Res**, 225: 213 – 224. 1994.
- NODA, H.; AMANO, H.; ARASHIMA, K.; HASHIMOTO, S.; NISIZAWA, K. Studies on the antitumor activity of marine algae. **Nipp Suiss Gakk**, 55 (7): 1259 - 1264. 1989.
- NOWELL, P.C. Mechanisms of tumor progression. **Cancer Res**, 46: 2203 – 2207. 1986.
- NUGENT, M.A. & IOZZO, R.V. Fibroblast growth factor-2. **Int J Biochem Cell Biol**, 32: 115 – 120. 2000.
- OLDEN, K.; PRATT, R.M.; YAMADA, K.M. Role of carbohydrates in protein secretion and turnover: effects of tunicamycin on the major cell surface glycoprotein of chick embryo fibroblasts. **Cell**, 13: 461 - 473. 1978.
- OPPENHEIM, R.W.; LEVIN, H.L.; HARTH, M.S. An investigation of various egg-opening techniques for use in avian behavioral embryology. **Developmental Psychobiol**, 6 (1): 53 – 68. 1973.
- OPPENHEIM, R.W.; MADERDRUT, J.L.; WELLS, D.J. Cell death of motoneurons in the chick embryo spinal cord. VI. Reduction of naturally occurring cell death in the thoracolumbar column by nerve growth factor. **J Comp Neurol**, 210: 174 – 189. 1982.

- O'REILLY, M.S.; HOLMGREN, L.; SHING, Y.; CHEN, C.; ROSENTHAL, R.A.; MOSES, M.; LANE, W.S.; CAO, Y.; SAGE, E.H.; FOLKMAN, J. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. **Cell**, 79: 315 – 328. 1994.
- ORR, S.F. Infra-red spectroscopic studies of some polysaccharides. **Biochem Biophys Acta**, 14: 173-181. 1954.
- OSHIMA, M.; DINCHUK, J.E.; KARGMAN, S.L.; OSHIMA, H.; HANCOCK, B.; KWONG, E.; TRZASKOS, J.M.; EVANS, J.F.; TAKETO, M.M. Suppression of intestinal polyposis in APCD716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase-2 (Cox-2). **Cell**, 86 (5): 803 – 809. 1996.
- PAPER, D.H.; EHRENFELD, U.; HASS, R.; FRANZ, G. Antiangiogenic activity of a cell wall extract derived from *Rhodococcus Rhodochrous*. Abstracts of The **International Symposium: Relevance of Tumor Models for Anticancer Drug Development**, (Oct). Freiburg. Electronic site: <http://www.jomol.regensburg.com/study1.htm>. 1997.
- PATTEN, B.M. **Early Embryology of the Chick**. 4 ed. Blakiston, Philadelphia. 244pp. 1951.
- PEEK, M.J.; NORMAN, C.; MARKHAN, R.; FRASES, I.S. The chick chorioallantoic membrane assay: an improved technique for the study of angiogenic activity. **Exp Pathol**, 34 (1): 35 – 40. 1988.
- PENG, J.; ZHANG, L.; DRYSDALE, L.; FONG, G.H. The transcription factor EPAS-1/hypoxia-inducible factor 2 α plays an important role in vascular remodeling. **Proc Natl Acad Sci**, 97: 8386 – 8391. 2000.
- PESENTI, E.; SOL, F.; MONGELLI, N.; GRANDI, M.; SPREAFICO, F. Suramin prevents neovascularization and tumor growth through blocking of basic fibroblast growth factor activity. **Br J Cancer** 66, 367- 374. 1992.
- PRINCIVALLE, M. & AGOSTINI, A. de. Developmental roles of heparan sulfate proteoglycans a comparative review in *Drosophyla*, mouse and human. **Int J Dev Biol**, 46: 267 – 278. 2002.
- PUGH, C.W. & RATCLIFFE, P.J. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. **Nat Med**, 9 (6): 677 – 684. 2003.
- RAFII, S.; LYDEN, D.; BENEZRA, R.; HATTORI, K.; HEISSIG, B. Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy? **Nat Rev Cancer**, 626 - 635. 2002.
- RAFII, S. & LYDEN, D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. **Nat Med**, 9 (6): 702 – 712. 2003.

- RAHMANIAN, M.; PERTOFT, H.; KANDA, S.; CHRISTOFFERSON, R.; CLAESSEON-WELSH, L.; HELDIN, P. Hyaluronan oligosaccharides induce tube formation of a brain endothelial cell line *in vitro*. **Exp Cell Res**, 237: 223– 230. 1997.
- REDDY, L.; ODHAV, B.; BHOOLA, K.D. Natural products for cancer prevention: a global perspective. *Pharmacology and Therapeutics*, 99: 1– 13. 2003.
- RIBATTI, D.; RONCALI, L.; NICO, B.; BERTOSSI, M. Effects of exogenous heparin on the vasculogenesis of the chorioallantoic membrane. **Acta Anat**, 130 (3): 257 – 263. 1987.
- RIBATTI, D.; VACCA, A.; NICO, B.; RONCALI, L.; DAMMACCO, F. Postnatal vasculogenesis. **Mech Develop** 100: 157 – 163. 2001.
- RIBEIRO, A-C.; VIEIRA, R.P.; MOURÃO, P.A.S.; MULLOY, B. A sulfated α - L – fucan from sea cucumber. **Carbohydr Res** , 255: 225 – 240. 1994.
- RISAU, W.; SARIOLA, H.; ZERVES, H.G.; SASSE, J.; EKBLUM, P.; KEMLER, R.; DOETSCHMAN, T. Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. **Development**, 102 (3): 471-478. 1988.
- RISAU, W. 1997. Mechanisms of angiogenesis. **Nature**, 386: 671–674.
- RUITER, M.C.; DE POELMANN, E.; MENTINK, M.M.T.; VANIPEREN, L.; GITTEMBERGER-de-GROOT, A.C. The Early Formation of the Vascular System in Quail Embryos. In: **Development of the Vascular System in the Embryo**. RUITER MC (ed.) A concept of the origin of systemic-pulmonary collateral arteries. Cap. 5. Koninklijk.e, Leiden. p. 99 – 186. 1992.
- SASISEKHARAN, R.; SHRIVER, Z.; VENKATARAMAN, G.; NARAYANASAMI, U. Roles of heparan sulfate glycosaminoglycans in cancer. **Nat Rev Cancer**, 2: 521 – 528. 2002.
- SCHOENWOLF, G.C. Formation and patterning of the avian neuraxis: one dozen hypotheses. **Ciba Found Symp**, 181: 25 - 50. 1994.
- SELVENDRAN, R.R.; STEVENS, B.J.H.; O'NEILL, M.A. Developments in the Isolation and Analysis of Cell Walls from Edible Plants. In: **Biochemistry of the Plant Cell Wall**. BRETT CT, HILLMAN JR. (Ed.). Cambridge University Press, London. p.39-78. 1985.
- SELVENDRAN, R.R. & O'NEILL, M.A. Isolation and analysis of cell walls from plant material. **Meth Biochem Analysis**, 3232: 125-153. 1987.
- SEMENZA, G.L. HIF-1 and tumor progression: patophysiology and therapeutics. **Trends Mol Med**, 8: 562 – 567. 2002.
- SEVER, N.; FILIPIC, M.; BRZIN, J.; LAH, T.T. Effect of cysteine proteinase inhibitors on murine B16 melanoma cell invasion *in vitro*. **Biol Chem**, 383: 839 – 842. 2002.

- SHIBLEY Jr, I.A. & PENNINGTON, S.N. Sodium ion-dependent (N-methylamino)-alpha-isobutyric acid uptake by embryonic chick cells exposed to ethanol in ovo: response to the stimulation / downregulation of protein kinases. **Alcohol Alcoholism**, 33 (5): 451 – 456. 1998.
- SHIMIZU, S.; KITADA, H.; YOKOTA, H.; YAMAKAWA, J.; MURAYAMA, T.; SUGIYAMA, K.; IZUMI, H.; YAMAGUCHI, N. Activation of the alternative complement pathway by *Agaricus blazei* Murill. *International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 9: 536 – 545. 2002.
- SHORT, S.M.; TALBOTT, G.A.; JULIANO, R.L. Integrin-mediated signaling events in human endothelial cells. **Mol Biol Cell**, 9: 1969 – 1980. 1998.
- SHU, C.H.; WEN, B.J.; LIN, K.J. Monitoring the polysaccharide quality of *Agaricus blazei* in submerged culture by examining molecular weight distribution and TNF- α release capability of macrophage cell line RAW 264.7. **Biotechnol Lett**, 25: 2061 - 2064. 2003.
- SHUBIK, P. & WARREN, B.A. Additional literature on 'vasculogenic mimicry' not cited. **Am J Pathol**, 156, 736 - 741. 2000.
- SIMON, H.; HORNBRUCH, A.; LUMSDEN, A. Independent assignment of antero-posterior and dorso-ventral positional values in the developing chick hindbrain. **Curr Biol**, 5 (2): 205 - 214. 1995.
- SIMONS, M. & WARE, A. Therapeutic angiogenesis in cardiovascular disease. **Nat Rev Drug Disc**, 2: 1-9. 2003.
- SINAÏ, P. Sugars slide into heparin activity. **Nature**, 398: 377 - 378. 1999.
- SLOANE, B.F.; ROZHIN, J.; JOHNSON, K.; TAYLOR, J.D.; CRISSMAN, J.D.; HONN, K.V. Cathepsin B: association with plasma membrane in metastatic tumors. **Proc Natl Acad Sci USA**, 83: 2483 – 2487. 1986.
- SNEDDON, H.; HADDEN, R.; HEPPEL, P.G. Chemosensory learning in the chicken embryo. **Physiol Behavior**, 64 (2): 133 – 139. 1998.
- SOEDA, S.; SAKAGUCHI, S.; SHIMENO, H.; NAGAMATSU, A. Fibrinolytic and coagulant activities of highly sulfated fucoidan. **Biochem Pharmacol**, 43 (8): 1853 – 1858. 1992.
- SOEDA, S.; OHMAGARI, Y.; SHIMENO, H.; NAGAMATSU, A. Preparation of oversulfated fucoidan fragments and evaluation of their antithrombotic activities. **Thromb Res**, 72: 247 – 256. 1993.
- SOEDA, S.; SHIBATA, Y.; SHIMENO, H. Inhibitory effect of oversulfated fucoidan on tube formation by human vascular endothelial cells. **Biol Pharm Bull**, 20 (11): 1131 – 1135. 1997.

- SOEDA, S.; KOZAKO, T.; IWATA, K.; SHIMENO, H. Oversulfated fucoidan inhibits the basic fibroblast growth factor-induced tube formation by human umbilical vein endothelial cells: its possible mechanism of action. **Biochim Biophys Acta**, 1497: 127 – 134. 2000.
- SOLIMENE, A.C.C.; BOSCARDIN, S.B.; FERRAZ, M.G.C.; CHAMMAS, R. Angiogenesis in solid tumors. **SBOC**, 1: 9 - 20. 1999.
- SUBBARAMAIAH, K.; TELANG, N.; RAMONETTI, J.T.; ARAKI, R.; DEVITO, B.; WEKSLER, B.B.; DANNENBERG, A.J. Transcription of cyclooxygenase-2 is enhanced in transformed mammary epithelial cells. **Cancer Res**. 56, (19): 4424 - 4429. 1996.
- SUBBARAMAIAH, K.; NORTON, L.; GERALD, W.; DANNENBERG, A.J. Cyclooxygenase-2 is over expressed in HER-2/neu-positive breast cancer: evidence for involvement of AP-1 and PEA3. **J Biol Chem**, 277 (21): 18649 - 18657. 2002.
- SUBBARAMAIAH, K. & DANNENBERG, A.J. Cyclooxygenase 2: a molecular target for cancer prevention and treatment. **Trends in Pharm Sci**, 24 (2): 96 – 102. 2003.
- STEIN, C.A.; LA ROCCA, R.V.; THOMAS, R.; MCATEE, N.; MYERS, C.E. Suramin: an anticancer drug with a unique mechanism of action. **J Clin Oncol**, 7:499 – 508. 1989.
- STRICK, D.M.; WAYCASTER, R.L.; MONTANI, J.; GAT, W.J.; ADAIR, T.H.; Morphometric measurements of chorioallantoic membrane vascularity: Effects of hypoxia. **Am J Physiol**, 29: 111385 - 111389. 1991.
- SWEENEY, L.J. Hematopoietic System. In: **Basic Concepts in Embryology**. McGraw-Hill, New York. p. 397 – 411. 1998.
- TAKAKU, T.; KIMURA, Y.; OKUDA, H.; Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* Murill and its mechanism of action. **Biochem Mol Action Nutr**, 1401 – 1413. 2001.
- TAKAMATSU, T. & FUJITA, S. Growth of notochord and formation of cranial and mesencephalic flexures in chicken embryo. **Develop Growth and Differ**, 29(5): 497 - 502. 1987.
- TAN, W.; LIN, L.; LI, M.; ZHANG, Y.X.; TONG, Y.; XIAO, D.; DING, J. Quercetin, a dietary-derived flavonoid, possesses antiangiogenic potential. **Eur J Pharmacol**, 459 (2-3): 255 – 262. 2003.
- TANNOCKA, L.R.; LITTLE, P.J.; WIGHT, T.N.; CHAITA, A. Arterial smooth muscle cell proteoglycans synthesized in the presence of glucosamine demonstrate reduced binding to LDL. **J Lipid Res**, 43: 149 - 157. 2002.

- THURSTON, G. & YANCOPOULUS, G.D. Gridlock in the blood. **Nature**, 414: 163 – 164. 2001.
- TIAN, H.; McKNIGHT, S.L.; RUSSEL, D.W. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. **Genes Dev**, 11: 72 – 82. 1997.
- TIANO, H.F.; LOFTIN, C.D.; AKUNDA, J.; LEE, C.A.; SPALDING, J.; SESSOMS, A.; DUNSON, D.B.; ROGAN, E.G.; MORHAM, S.G.; SMART, R.C.; LANGENBACH, R. Deficiency of either cyclooxygenase (COX)-1 or COX-2 alters epidermal differentiation and reduces mouse skin tumorigenesis. **Cancer Res**, 62: 3395 – 3401. 2002.
- TOBELEM, G. Endothelial cell growth: Biology and Pharmacology in relation to angiogenesis. **Blood Coag Fibrinol**, 1: 703 – 705. 1990.
- TOLG, C.; HOFMANN, M.; HERRLICH, P.; PONDA, H. Splicing choice from ten variant exons establishes CD44 variability. **Nucleic Acids Res**. 21: 1225 – 1229. 1993.
- TRENTO, F.; CATTANEO, F.; PESCADOR, R.; PORTA, R.; FERRO, L. Antithrombin activity of an algal polysaccharide. **Thromb Res**, 102: 457 – 465. 2001.
- TSUJII, M.; KAWANO, S.; TSUJI, S.; SAWAOKA, H.; MASATSUGU, H.; DUBOIS, R.N. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. **Cell**, 93: 705 – 716. 1998.
- TSUKITA, S.; KUMIKI, O.; SATO, N.; SAGARA, J.; KAWAY, A. ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons. **J Cell Biol**, 126: 391 – 401. 1994.
- UYTTENDAELE, H.; HO, J.; ROSSANT, J.; KITAJEWSKI, J. Vascular patterning defects associated with expression of activated Notch4 in embryonic endothelium. **Proc Natl Acad Sci USA**, 98: 5643 – 5648. 2001.
- VAN DEN BORN, J.; VAN KRAATS, A.A.; BAKKER, M.A.; ASSMANN, K.J.; DIJKMAN, H.B.; VAN DER LAAK, J.A.; BERDEN, J.H. Reduction of heparan sulphate-associated anionic sites in the glomerular basement membrane of rats with streptozotocin-induced diabetic nephropathy. **Diabetologia**, 38(10): 1169 - 1175. 1995.
- VAN DER SCHAFT, D. W. J. The differential effects of angiogenesis inhibitors on vascular network formation by endothelial cells versus aggressive melanoma tumor cells. **Proc Am Assoc Cancer Res**, 44, 696 - 705. 2003.
- VOEST, E.E.; KENYON, B.M; O'REILLY, M.S.; TRUITT, G.; D'AMATO, R.J.; FOLKMAN, J. Inhibition of angiogenesis *in vivo* by interleukin 12. **J Cancer Nat Inst**, 87 (8): 581 – 586. 1995.

- VOKES, S.A.; YATSKIEVYCH, T.A.; HEIMARK, R.L.; MCMAHON, J.; MCMAHON, A.P.; ANTIN, P.B.; KRIEG, P.A. Hedgehog signaling is essential for endothelial tube formation during vasculogenesis. **Development**, 131(17): 4371 – 4380. 2004.
- VU, M.T.; SMITH, C.F.; BURGER, P.C.; KLINTWORTH, G.K. An evaluation of methods to quantitate the chick chorioallantoic membrane assay in angiogenesis. **Lab. Invest.** 53 (4): 499 – 508. 1985.
- WAGENER, C. & ERGÜN, S. Angiogenic Properties of the Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecule 1. **Exp Cell Res**, 261: 19 – 24. 2000.
- WEISSLEDER, R. & NTZIACHRISTOS, V. Shedding light onto live molecular targets. **Nat Med**, 9 (1): 123 – 128. 2003.
- WILLIAMS, G.T. & SMITH, C.A. Molecular regulation of apoptosis: genetic control on cell death. **Cell** 74: 777 - 779. 1993.
- WILTING, J.; KURZ, H.; BRAND-SABERI, B.; STEDDING, G.; YANF, Y.X.; HASSELHORN, H-M.; EPPERLEIN, H-H.; CHRIST, B. Kinetics and differentiation of somite cells forming the vertebral column: studies on human and chick embryos. **Anat Embryol**, 190: 573 - 581. 1994.
- WITZENBICHLER, B.; MAISONPIERRE, P.C.; JONES, P.; YANCOPOULOS, G.D.; ISNER, J.M. 1998. Chemotactic properties of angiopoietin-1 and -2, ligands for the endothelial-specific receptor tyrosine kinase Tie2. **J Biol Chem**, 273 (29):18514 - 18521.
- WOLPERT, L. **Principles of Development. Current Biology**, Oxford University Press, New York. 484pp. 1998.
- WOLTERING, E.A.; BARRIE, R.; O'DORISIO, T.M.; ARCE, D.; URE, T.; CRAMER, A.; HOLMES, D.; ROBERTSON, J.; FASSLER, J. Somatostatin analogues inhibit angiogenesis in the chick chorioallantoic membrane. **J Surg Res**, 50 (3): 245 – 251. 1991.
- YAMAMOTO, Y.; MIZUGUCHI, R.; YAMADA, Y. Selection of high and stable pigment producing strain in cultured *Euphorbia milli* cells. **Theoret Appl Genet**, 61: 113 - 116. 1982.
- YANCOPOULUS, G.D.; DAVIS, S.; GALE, N.W.; RUDGE, J.S.; WIEGAND, S.J.; HOLASH, J. Vascular - specific growth factors and blood vessel formation. **Nature**, 407: 242 – 247. 2000.
- YAYON, A. & KLAGSBRUN, M. Autocrine transformation by chimeric signal peptide – basic fibroblast growth factor: reversal by suramin. **Proc Natl Acad Sci USA** 87, 5346 – 5350. 1990.

- YUAN, S.; DARNELL, D.K.; SCHOENWOLF, G.C. Mesodermal patterning during avian gastrulation: Experimental induction of notochord from non - notochordal precursor cells. **Dev Genet**, 17: 38 - 54. 1995.
- ZAMMARETTIA, P. & ZISCHA, A.H. Adult 'endothelial progenitor cells' Renewing vasculature. **Int J Biochem Cell B**, 37: 493 – 503. 2005.
- ZENG, C.; TOOLE, B.P.; KINNEY, S.D.; KUO, J.W.; STAMENKOVIC, I. Inhibition of tumor growth *in vivo* by hyaluronan oligomers. **Int J Cancer** 77(3): 396 - 401. 1998.
- ZHANG, N.; & DEUEL, T.F. Pleiotrophin and midkine, a family of mitogenic and angiogenic heparin-binding growth and differentiation factors. **Curr Opin Hematol**, 6:44–50. 1999.
- ZICHE, M.; MORBIDELLI, L.; MASINI, E.; AMERINI, S.; GRANJGER, H.J.; MAGGI, C.A.; GEPPETTI, P.; LEDDA, F. Nitric oxide mediates angiogenesis *in vivo* and endothelial cell growth and migration *in vitro* promoted by substance P. **J Clin Invest**, 94: 2036 – 2044. 1994.

ANEXOS

Anexo 1. Quantificação de proteínas

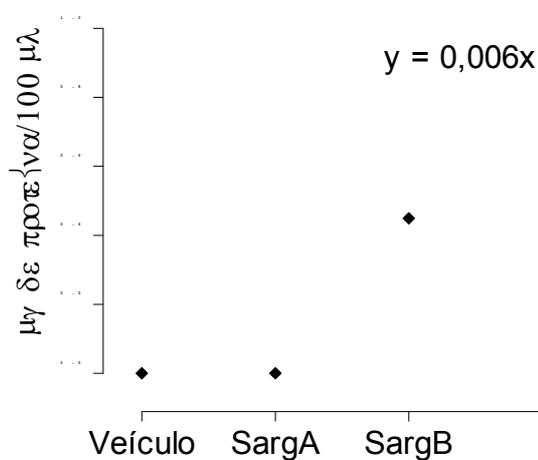
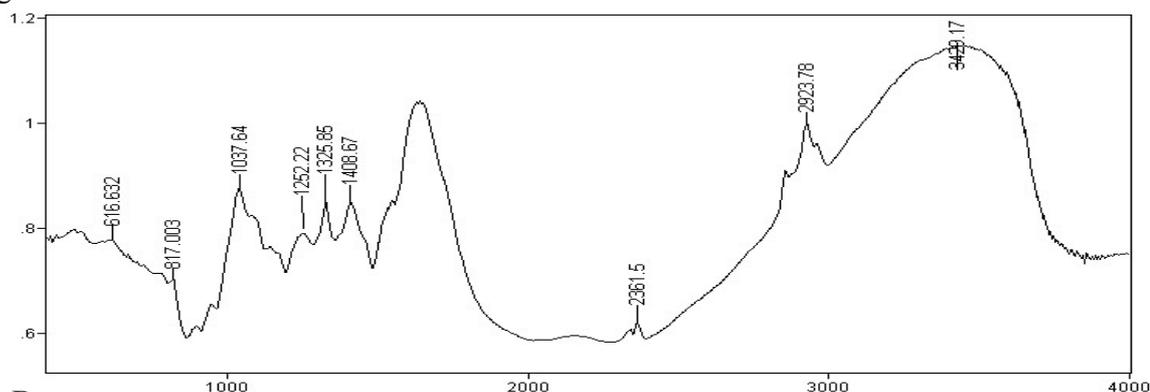


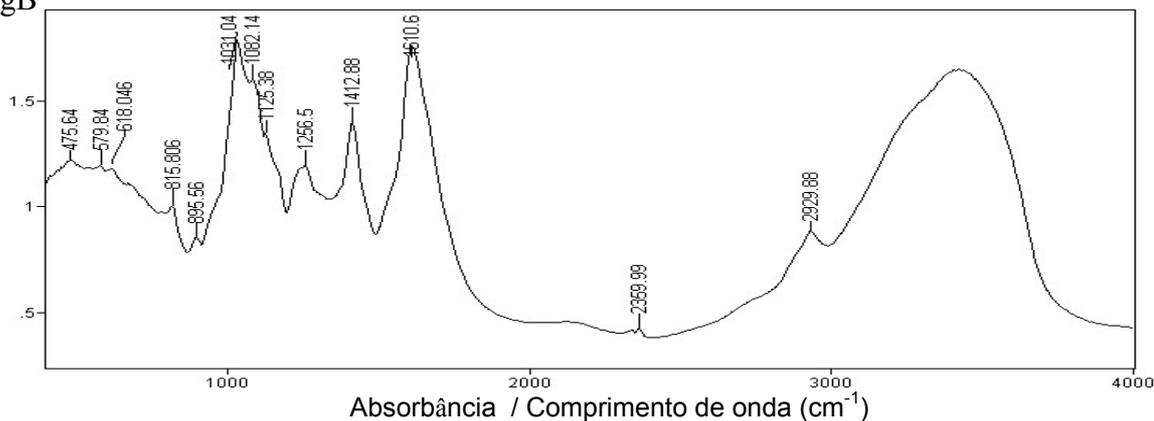
Figura A1 - Quantificação do teor de proteínas dos polissacarídeos SargA e SargB (4M KOH) extraídos de parede celular de *Sargassum stenophyllum*, expressa em $\mu\text{g}/0,1\text{ml}$ efetuada pelo método de Bradford. O valor médio correspondente a 3 leituras (absorbância = 595 nm) dividido pelo valor obtido a partir de uma curva de calibração, tendo sido os valores plotados para obter a equação da reta ($y=a+bx$).

Anexo 2. Espectroscopia de infravermelho

SargA



SargB



Absorbância / Comprimento de onda (cm⁻¹)

Figura A.2 - Absorbância expressa em comprimento de onda (cm⁻¹), obtida através de espectroscopia de infra-vermelho, dos polissacarídeos SargA e SargB (4M KOH) extraídos de parede celular de *Sargassum stenophyllum*. (Referências às funções químicas: álcool: C-O = 1030 cm⁻¹ e O-H = 3400 cm⁻¹; aldeído: 2929cm⁻¹; NH: 1630 cm⁻¹ e carboxilatos: 1408 cm⁻¹).

Anexo 3. Ressonância magnética nuclear de Carbono -13

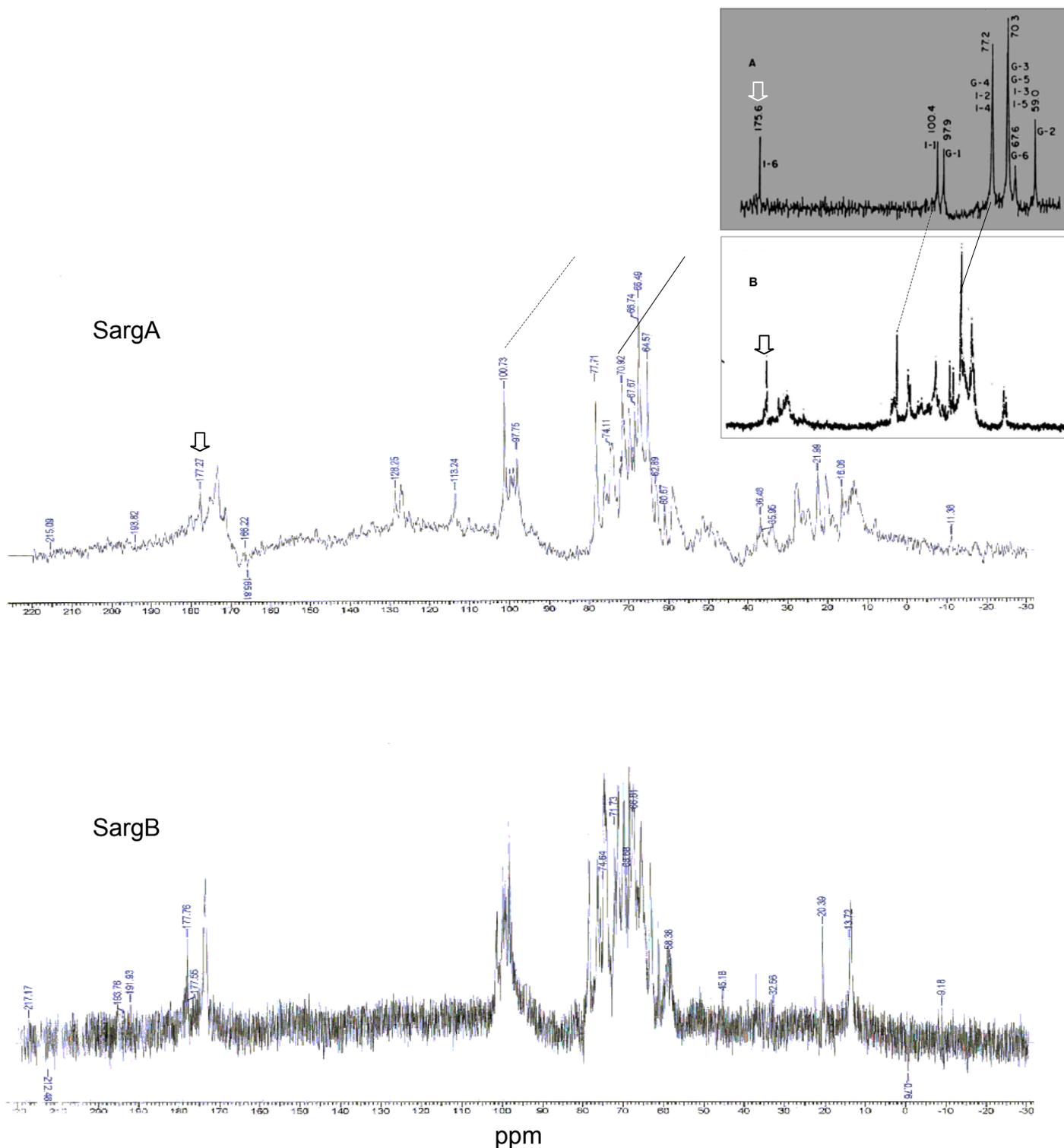


Figura A.3 - Espectros de NMR – ^{13}C de amostras (500 μl) dos polissacarídeos SargA e SargB extraídos de parede celular de *Sargassum stenophyllum*, derivatizadas em D_2O sob agitação (12 h). Os experimentos foram conduzidos em equipamento Bruker DRX400 (400 MHz), utilizando-se tetrametil-silano como referência interna. Inset: Similaridades entre os espectros da (A) heparina (Gorin *et al.*, 1981) e (B) de uma fração de fucoidana (Duarte *et al.*, 2001).

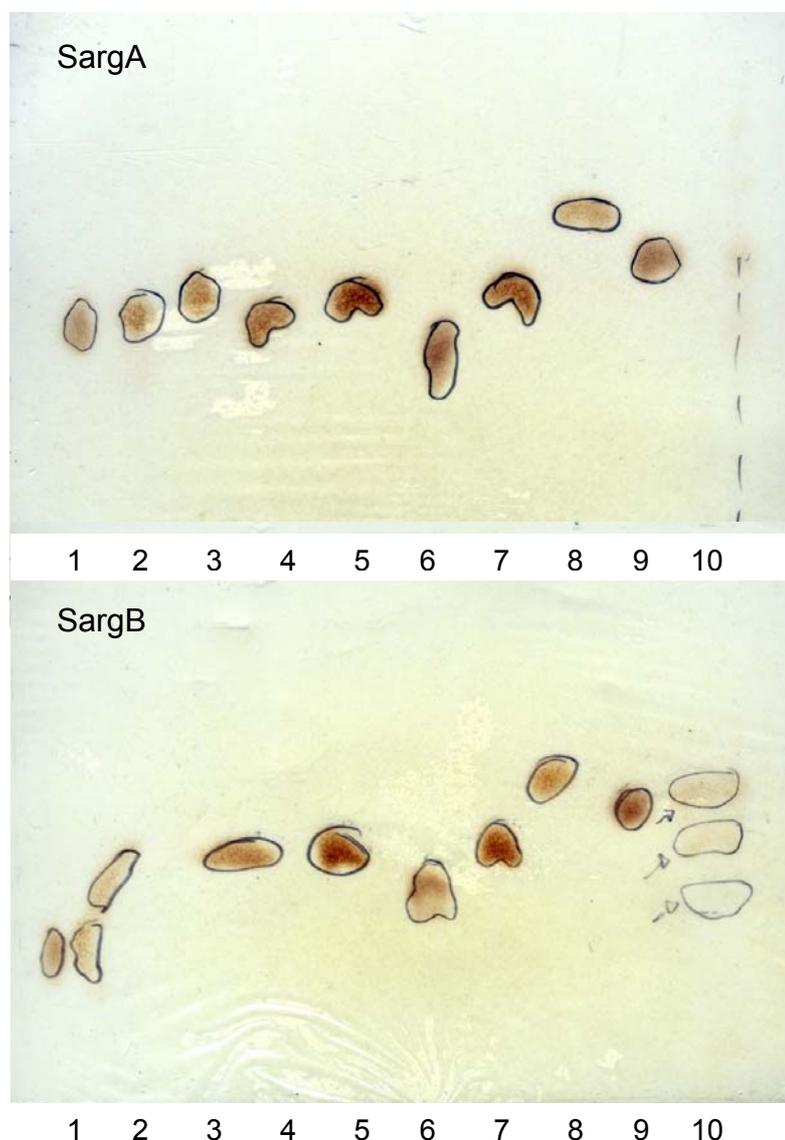
Anexo 4. Cromatografia de camada delgada

Figura A.4 – Análises cromatográficas em camada delgada, de hidrolisados dos polissacarídeos SargA e SargB realizadas em placas de alumínio cobertas com sílica G 60, tendo como fase móvel 2-PrOH/Et-Oac/Nitroetano/AcOH/H₂O (45:25:10:1:19). A detecção dos monossacarídeos (nas trilhas eletroforéticas, enumeradas como: 3 - α -L-fucose; 5 - α -D-glucose; 6 - ácido glucurônico; 7 - β -D-manose; 8 - β -D-galactose e 9 - β -D-xilose) foi efetuada nebulizando-se uma solução de orcinol (0,55 %) em ácido sulfúrico, com o subsequente aquecimento da placa.

Anexo 5. Publicações*Artigo científico:*

DIAS, PF.; SIQUEIRA JM, VENDRUSCOLO LF, NEIVA TJ, MARASCHIN M, GAGLIARDI AR, RIBEIRO-DO-VALLE RM, 2005. Antiangiogenic and antitumoral properties of polysaccharide isolated from the seaweed *Sargassum stenophyllum*. **Cancer Chemother Pharm**, (No Prelo).

Artigos em periódicos de divulgação científica:

MARASCHIN M, GONÇALVES C, PASSOS R, DIAS PF, RIBEIRO-DO-VALLE, RM, FONTANA JD, PESSATTI ML. Isolation, Chemical characterization and biological activities of cell wall polysaccharides of *Laurencia microcladia* (Rhodomelaceae, Ceramiales). **N Téc Facimar**, 4: 37 - 41. 2000.

DIAS PF, RIBEIRO-DO-VALLE RM, PASSOS R, MARASCHIN M. Novos moduladores da formação de vasos sanguíneos. **Biotecnologia**, 25: 28 - 34. 2002.

DIAS PF, PASSOS MARASCHIN, R, MARASCHIN M, RIBEIRO-DO-VALLE RM. Na formação de vasos sanguíneos, fronteiras entre saúde e doença. **Ciência Hoje**, 32: 22 - 27. 2003.