

RITCHELLI RICCI

**Estudo das alterações de proteoglicanos e
glicosaminoglicanos em linhagens celulares de câncer
colorretal humano**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola
Paulista de Medicina, para obtenção
do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

RITCHELLI RICCI

**Estudo das alterações de proteoglicanos e
glicosaminoglicanos em linhagens celulares de câncer
colorretal humano**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola
Paulista de Medicina, para obtenção
do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2009

Ricci, Ritchelli

Estudo das alterações de proteoglicanos e glicosaminoglicanos em linhagens celulares de câncer colorretal humano.

São Paulo, 2009. 130p

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina.

1. glicosaminoglicanos. 2. proteoglicanos. 3. câncer colorretal. 4. estroma. 5. potencial metastático.

Tese realizada pela Disciplina de Clínica Médica do Departamento de Medicina, apresentada à Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Profa. Dra. Leny Toma

RITCHELLI RICCI

**Estudo das alterações de proteoglicanos e
glicosaminoglicanos em linhagens celulares de câncer
colorretal humano**

BANCA EXAMINADORA

Titulares

Prof. Dr. Antonio Carlos Lopes

Prof. Dr. Ivarne Luís dos Santos Tersariol

Profa. Dra. Maria Cristina Chavantes

Profa. Dra. Marimélia Porcionatto

Suplentes

Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade

Profa. Dra. Guacyara da Motta

*Dedico este trabalho às pessoas que foram imprescindíveis
para que eu trilhasse esse caminho:*

*Aos meus pais tão amados, Leila e Jorge, que souberam educar seus filhos no sentido
mais pleno da palavra, fazendo de mim o que hoje sou. Espero um dia transmitir a
educação que tive aos meus filhos. Muito obrigada mãe e pai.*

*À você Marcelo, meu amor, este foi um caminho que trilhamos juntos, caminho este
com obstáculos que ora pareciam intransponíveis. Obrigada por me acompanhar em
cada passo nestes oito anos de nossas vidas.*

*Aos meus sogros, Tina e Guillermo, que sempre estiveram ao meu lado, e que considero
como meus segundos pais. Muito obrigada por tudo o que vocês tem feito ao longo
destes anos.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Leny Toma, pelo convívio sempre tranquilo e pela sabedoria para enfrentar os momentos mais turbulentos deste trabalho. Você é um ser humano muito especial! Não tenho palavras para expressar minha gratidão por todo o apoio que tem me dado todos estes anos. Muito Obrigada.

À Profa. Dra. Helena Bonciani Nader e ao Prof. Dr. Carl Peter von Dietrich (“in memoriam”) pela oportunidade de desenvolver meu doutorado no laboratório da Disciplina de Biologia Molecular UNIFESP. Agradeço também por ter passado alguns anos da minha vida com estes brilhantes cientistas, com quem tive a oportunidade de aprender conduta profissional e dedicação à pesquisa.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Lopes pela oportunidade de desenvolver meu trabalho pela Disciplina de Clínica Médica, do Departamento de Medicina da UNIFESP.

Ao meu querido sobrinho, o pequeno Torre Ricci que está chegando a este mundo. Muito obrigada pela alegria que tem nos dado mesmo antes de nascer.

Ao meu querido irmão Jorge Ricci Junior, que tenha maturidade e sabedoria para ser pai. Obrigada pela admiração que tem por mim.

Ao meu querido irmão Rafael Ricci, grande pequeno empresário, que nunca perca este espírito de otimismo. Muito obrigada pela ajuda em vários momentos.

Às minhas queridas cunhadas Mariana e Renata, é muito bom ter vocês em nossa família, muito obrigada cunhadas!

Ao meu querido cunhado, agora Dr. Bruno, cuja humildade e tranquilidade são admiráveis.

A minha avó Judite, mulher guerreira, até hoje muito ativa, você é um exemplo a ser seguido, obrigada por estar sempre presente.

A minha avó Maria José, que acompanhou parte da elaboração desta tese, me confortando com suas palavras e agora está em um plano superior, com certeza torcendo por mim. Obrigada vó. (“in memoriam”)

Às minhas tias Jura, Tina e Fátima pelo carinho e apoio.

Aos meus queridos primos de São Paulo, Julle Janay e Paulo Vinícius, obrigada pela acolhida em suas casas, pelas conversas e pelo apoio, vocês são muito importantes para mim.

Aos meus avôs Francisco Ricci e Paulo Conceição por representarem o início de nossas famílias (“in memoriam”).

À Profa. Dra. Maria Cristina Chavantes, diretora da Central Médica de Laser do INCOR, por me acompanhar em meus primeiros passos na pesquisa, sempre otimista e com inesgotável sede de conhecimento. Obrigada pela “luz” que tem me dado em tantos momentos.

A todos os docentes da Disciplina de Biologia Molecular UNIFESP, em especial à Profa. Dra. Maria Aparecida da Silva Pinhal, à Profa. Dra. Yara M. Michelacci e ao Prof. Dr. Hugo Monteiro. Obrigada pela simpatia e profissionalismo.

À Profa. Dra. Marimélia Porcionatto, a quem muito admiro; obrigada pela convivência diária e ao Prof. Dr. Ivarne Tersariol, sempre disposto a conversar sobre pesquisa; obrigada pela atenção em todos os congressos.

Aos docentes do Departamento de Bioquímica UNIFESP, à Profa. Dra. Guacyara, obrigada pela simpatia e pela atenção a mim dispensada durante estes anos, e ao Prof. Dr. José Olavo, cuja vocação ao ensino contagia a todos.

Ao Dr. Jaques Weisberg, obrigada pela dedicação a nosso projeto inicial, envolvendo pacientes com câncer colorretal.

À Elsa que me ajudou em meus primeiros géis de PDA e estendeu sua mão num gesto de generosidade em um momento muito complicado de minha estada em São Paulo. Muito obrigada a você e ao seu marido Prof. Dr. João Roberto, serei eternamente grata.

À Aline, quem me ajudou a dar os meus primeiros passos experimentais do meu doutorado, obrigada.

À Isabel por me ajudar no aprimoramento da “arte da cultura celular” e por sua dedicação ao trabalho.

Ao Venâncio, sempre muito competente e organizado, prestativo em todos os momentos, obrigada pela ajuda, pelas conversas e pelos cafezinhos.

Às secretárias, Patrícia, Juliana, Ana Maria, Sônia, Márcia e Bete, pelo convívio alegre e disposição a ajudar.

À Dona Jú e à Dona Vera, pelos sorrisos e pelas conversas descontraídas, não me esquecendo também de agradecer os reconfortantes cafezinhos.

À todos os colegas da disciplina de Biologia Molecular UNIFESP, aqui não citarei nomes para não ser injusta. Muito obrigada a todos vocês.

As amigas do 5º andar, Emília, Michelle, Caroline, Yvette, enfim a todas. Em especial à Carol Ariza, Patrícia Braghiroli e a Thais Filippo. Muito obrigada pela convivência maravilhosa que tivemos, guardarei saudades.

Às minhas amigas queridas Ana Paula e Carol Meloni, vocês foram muito importantes para mim em muitos momentos, espero que nossa amizade perdure, resistindo ao tempo e a distância.

Às amigas, Kátia pelo convívio extra-laboratório, pelas conversas, caronas e até “cirurgias”, obrigada pela companhia; Thais Peretti, pela companhia nos finais de semana que passamos juntas ao RNA e Carol de Olinda, obrigada pelo carinho.

À Camila do Zé, minha companheira de república, com quem moraria mais tempo se fosse preciso. Obrigada pela excelente convivência que tivemos, comadre. Obrigada também a Flavicha!

Aos Profs. Dr. Edvaldo Trindade e Dr. Jair Aguiar pela vocação pela pesquisa e ensino, obrigada pelo auxílio em muitos momentos.

Aos seres que me dão e me deram tanta alegria: Tonzinho, Bigo, Gorda, Tuco, Maia, Meg, Madona, Fifi, Cleo, Pink, Paty, Jade, Mike. E os que já partiram Duquinha, Tobinho, Nhauzinho, Gaia, Catita, Lobinho e tantos outros...

À CAPES pela bolsa de estudos e pelos recursos oferecidos para elaboração deste trabalho de tese. À FAPESP pelos recursos financeiros adicionais necessários para a realização deste trabalho.

É impossível realizarmos um grande feito em nossas vidas sem que contemos com a ajuda de várias pessoas. Gostaria de agradecer a todos que de algum modo me ajudaram a realizar este trabalho.

MUITO OBRIGADA!

“Quando verificamos que tudo aquilo que percebemos e experimentamos resulta de uma série indefinida de causas e condições correlacionadas, a nossa perspectiva muda completamente. Passamos a ver o universo em que habitamos como um organismo vivo, no qual cada célula trabalha em cooperação harmônica com cada uma das outras células, para manter o todo. Se somente uma delas é danificada, como na investida de uma doença, a harmonia é quebrada e o todo fica em situação de risco. Essa lógica sugere que nosso bem-estar pessoal está intimamente ligado ao bem-estar dos outros e também ao ambiente em que vivemos. Nossas ações, feitos, palavras e idéias, ainda que pareçam insignificantes, afetam a nós mesmos e igualmente as outras pessoas”.

Dalai Lama

ÍNDICE

DEDICATÓRIA	v
AGRADECIMENTOS	vi
EPIGRAFE	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
LISTA DE FIGURAS	xvii
LISTA DE TABELAS	xix
RESUMO	xx
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Considerações Gerais	1
1.2. Glicosaminoglicanos	2
1.2.1. Ocorrência e Funções	7
1.2.2. Função dos Glicosaminoglicanos CS, DS e HS	10
1.2.2.1. Condroitim sulfato	10
1.2.2.2. Dermatom sulfato	11
1.2.2.3. Heparom sulfato	11
1.2.3. Biossíntese e Região de Ligação dos Glicosaminoglicanos	13
1.2.4. Biossíntese do Heparom Sulfato	14
1.2.5. Estrutura do Heparom Sulfato	17
1.3. Proteoglicanos	19
1.3.1. Proteoglicanos de condroitim e dermatom sulfato	23
1.3.1.1. Decorim e biglicam	23
1.3.1.2. Versicam	26
1.3.2. Proteoglicanos de HS	29
1.3.2.1. Família dos Sindecans	32
1.4. Fatores de Crescimento e Proteoglicanos	36
1.5. Carcinogênese e Estroma	39
2. OBJETIVOS	42
3. MATERIAL	43
3.1. Linhagens celulares	43
3.2. Meios de cultura, tampões e soluções	44
3.3. Enzimas	45
3.4. Radioisótopos	45

3.5. Anticorpos e marcadores fluorescentes	45
3.5.1. Anticorpo primário	45
3.5.2. Anticorpo secundário	45
3.5.3. Marcadores Fluorescentes	46
3.6. Corantes	46
3.6.1. Coomassie Brilliant Blue G	46
3.6.2. Azul de Toluidina	46
3.7. Glicosaminoglicanos padrões	46
3.8. Outros materiais	47
3.9. Aparelhos	48
4. MÉTODOS	50
4.1. Cultura das linhagens IEC, Caco-2, HCT-116 e fibroblastos	50
4.2. Meio Condicionado	50
4.3. Transwell®	51
4.4. TGF-β1 exógeno	52
4.5. Marcação Metabólica de Glicosaminoglicanos Extraídos de Linhagens	52
4.5.1. Incorporação de [³⁵ S]-Sulfato para Análise Estrutural de Glicosaminoglicanos	52
4.5.2. Extração de GAGS marcados metabolicamente com [³⁵ S]-sulfato	53
4.5.3. Eletroforese em gel de agarose	53
4.5.4. Cromatografia em papel	54
4.5.5. Quantificação dos GAGs marcado metabolicamente	55
4.6. Imunocitoquímica	55
4.6.1. Marcação externa - Versicam	56
4.6.2. Revelação do anticorpo	56
4.6.3. Coloração do núcleo	56
4.6.4. Controles	56
4.6.5. Observação do material	57
4.7. Curva de crescimento (ensaio com MTT)	57
4.8. Protocolos de Biologia Molecular	57
4.8.1. Preparação de Soluções, Material Plástico e Vidraria	57
4.8.2. Extração de RNA Total	58

4.8.3. Quantificação do RNA	59
4.8.4. Desenho dos <i>Primers</i>	59
4.8.5. RT-PCR (<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>)	61
4.8.6. PCR em Tempo Real	62
4.9. Análises Estatísticas	66
5. RESULTADOS	67
5.1. Modulação da síntese de glicosaminoglicanos (GAGs) pela interação parácrina entre células de estroma e de adenocarcinoma colorretal humano <i>in vitro</i>	67
5.1.1. Fibroblastos	67
5.1.2. Linhagem Caco-2	69
5.2. Proliferação Celular na Interação Estroma-Câncer	73
5.2.1. Efeito da Linhagem Caco-2 na Proliferação de Fibroblastos com Meio Condicionado e Cocultivados no Sistema <i>Transwell</i>	73
5.2.2. Proliferação da Linhagem Caco-2 com Meio Condicionado de Fibroblastos e em Cocultura no Sistema <i>Transwell</i>	74
5.3. Influência da Interação Parácrina na Síntese de Proteoglicanos	76
5.3.1. Análise do Proteoglicano Versicam na Matriz Extracelular das Linhagens co-cultivadas em Sistema <i>Transwell</i>	76
5.4. Análise da Expressão Gênica de Proteoglicanos de Superfície e da Matriz Extracelular durante Interação Parácrina entre Fibroblastos e Células Caco-2	78
5.4.1. Expressão do Esqueleto Protéico dos Sindecans, Biglicam, Decorim e Versicam nos fibroblastos	78
5.4.2. Expressão do Esqueleto Protéico dos Sindecans, Biglicam, Decorim e Versicam na Linhagem Caco-2	79
5.5. TGF- β 1 Exógeno na Síntese de Glicosaminoglicanos dos Fibroblastos e da Linhagem Caco-2	80
5.6. Caracterização dos GAGs Sulfatados em duas linhagens de Câncer Colorretal Humano <i>in vitro</i>	83
5.7. Comparação da Síntese dos Glicosaminoglicanos Sulfatados das Três Linhagens	85

5.8. Degradação das cadeias de heparam sulfato das linhagens IEC-6, Caco-2 e HCT-116	85
5.9. Degradação das Cadeias de Condroitim Sulfato das linhagens IEC-6, Caco-2 e HCT-116	88
5.10. Análise da Expressão de Proteoglicanos de Superfície e de Matriz Extracelular	93
5.11. Análise da Expressão Gênica de Sulfotransferases Envolvidas na Biossíntese do Heparan e do Condroitim Sulfato	97
6. DISCUSSÃO	100
7. CONCLUSÃO	108
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109
9. ANEXOS	123
Anexo 1 - Parecer do Comitê de Ética Institucional	125
Anexo 2 - Curriculum Vitae Resumido	126
ABSTRACT	130

LISTA DE ABREVIATURAS

- ✓ **AH:** ácido hialurônico
- ✓ **C4S:** Condroitim 4-sulfato
- ✓ **C6S:** Condroitim 6-sulfato
- ✓ **CS-A:** condroitim 4-sulfato
- ✓ **CS-C:** condroitim 6-sulfato
- ✓ **CS-E:** condroitim 4,6-sulfato
- ✓ **cDNA:** DNA complementar
- ✓ **CETAVLON:** Brometo de cetil trimetilamônio
- ✓ **CS:** condroitim sulfato
- ✓ **CS46OST:** N-acetil-galactosaminil-4-sulfato, 6-O-sulfotransferase
- ✓ **Da:** Dalton
- ✓ **DAPI:** 4',6-diamidino-2-fenilindol dihidrocloro
- ✓ **DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium
- ✓ **DNA:** Ácido desoxirribonucléico
- ✓ **dNTPs:** Mistura dos 4 desoxirribonucleotídeos trifosfatados
- ✓ **DS:** dermatam sulfato
- ✓ **EBSS:** solução salina balanceada de Earle
- ✓ **EDTA:** etilenodiamino tetracetato
- ✓ **EGF:** *epidermal growth factor*
- ✓ **FGF:** *fibroblast growth factor*
- ✓ **GAG:** glicosaminoglicano
- ✓ **Gal:** galactose
- ✓ **GalN:** Galactosamina
- ✓ **GalNAc,6S:** Galactosamina N-acetilada, 6-sulfatada
- ✓ **GalNAc:** Galactosamina N-acetilada ou N-acetilgalactosamina
- ✓ **GlcA:** Ácido glucurônico
- ✓ **GlcN:** Glucosamina
- ✓ **GlcNAc:** Glucosamina N-acetilada ou N-acetilglucosamina
- ✓ **GlcNS,6S:** Glucosamina N- e 6-dissulfatada
- ✓ **GlcNS:** Glucosamina N-sulfatada
- ✓ **GPI:** glicosilfosfatidilinositol
- ✓ **Hep:** heparina

- ✓ **HS:** heparam sulfato
- ✓ **HS6OST:** 6-O-sulfotransferase de heparam sulfato
- ✓ **HSPG:** proteoglicano de heparam sulfato
- ✓ **Htase I e II:** heparitinase I e II
- ✓ **IdoA:** ácido idurônico
- ✓ **kDa:** quilodaltons (1.000 Da)
- ✓ **MEC:** matriz extracelular
- ✓ **nm:** nanômetros
- ✓ **PAPS:** 3'-fosfoadenosil-5'-fosfosulfato
- ✓ **PBS:** *phosphate buffered saline*
- ✓ **PCR:** reação da DNA polimerase em cadeia
- ✓ **PDA:** tampão 1,3-diaminopropano acetato
- ✓ **PDGF:** *platelet derived growth factor receptor*
- ✓ **PGCS:** proteoglicano de condroitim sulfato
- ✓ **PIP2:** Fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato
- ✓ **PKC:** proteína kinase C
- ✓ **PM:** Peso molecular
- ✓ **QS:** Queratam sulfato
- ✓ **SFB:** Soro Fetal Bovino
- ✓ **TAE:** tampão Tris-acetato 40mM; EDTA 1mM
- ✓ **TGF-β:** *transforming growth factor-β*
- ✓ **Tris:** Tris (hidroximetil)-aminometano
- ✓ **U.V.:** Ultra-violeta
- ✓ **Xil:** xilose
- ✓ **μ:** micro
- ✓ **Δ:** Presença de insaturação
- ✓ **ΔU,2S-GlcNS,6S:** dissacarídeo insaturado trissulfatado de heparina e heparam sulfato - O-ácido 2-sulfo-L-ido (enopiranosilurônico)-(1→4)-2-desoxi-2-sulfamino-D-glucopiranoose 6-O-sulfato
- ✓ **ΔU-GalNAc,4S:** dissacarídeo insaturado N-acetilado 4-sulfatado de condroitim sulfato e dermatam sulfato - O-ácido-D-gluco (enopiranosilurônico)-(1→3)-2-desoxi-2-acetamido-D-galactopiranoose-4-O-sulfato
- ✓ **ΔU-GalNAc,6S:** dissacarídeo insaturado N-acetilado 6-sulfatado - O-ácido-D-gluco(enopiranosilurônico)-(1→3)-2-desoxi-2-acetamido-D-galactopiranoose-6-O-sulfato

- ✓ **ΔU-GalNAc**: dissacarídeo insaturado N-acetilado - O-ácido-D-glucopiranosilurônico-(1→3)-2-desoxi-2-acetamido-D-galactopiranosose
- ✓ **ΔU-GlcNAc,6S**: dissacarídeo insaturado N-acetilado 6-sulfatado - O-ácido-D-glucopiranosilurônico-(1→4)-2-desoxi-2-acetamido-D-glucopiranosose-6-O-sulfato
- ✓ **ΔU-GlcNAc**: dissacarídeo insaturado N-acetilado - O-ácido-D-glucopiranosilurônico-(1→4)-2-desoxi-2-acetamido-D-glucopiranosose
- ✓ **ΔU-GlcNAc**: dissacarídeo insaturado N-acetilado do ácido hialurônico- O-ácido-D-glucopiranosilurônico-(1→3)-2-desoxi-2-acetamido-D-glucopiranosose
- ✓ **ΔU-GlcNS,6S**: dissacarídeo insaturado dissulfatado - O-ácido-D-glucopiranosilurônico-(1→4)-2-desoxi-2-sulfamino-D-glucopiranosose 6-O-sulfato
- ✓ **ΔU-GlcNS**: dissacarídeo insaturado N-sulfatado - O-ácido-D-glucopiranosilurônico-(1→4)-2-desoxi-2-sulfamino-D-glucopiranosose
- ✓ **ΔU-Tetra**: tetrassacarídeo insaturado

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Unidades estruturais dos glicosaminoglicanos.....	4
Figura 2. Distribuição dos glicosaminoglicanos na escala filogenética.....	8
Figura 3. Tipos de ligações dos glicosaminoglicanos sulfatados ao esqueleto protéico.....	14
Figura 4. Esquema da biossíntese do heparam sulfato.....	16
Figura 5. Principais unidades dissacarídicas do heparam sulfato obtidas por degradação enzimática com heparitinases I e II.....	17
Figura 6. Estrutura do heparam sulfatos de diferentes origens.....	18
Figura 7. Estrutura dos proteoglicanos de matriz intersticial de baixo peso molecular da família das proteínas ricas em leucina.....	25
Figura 8. Modelo de diferentes isoformas do proteoglicano versicam geradas por <i>splice</i> alternativo.....	28
Figura 9. Ocorrência de heparam sulfato.....	30
Figura 10. Representação esquemática das estruturas dos sindecans.....	34
Figura 11. Caracterização dos domínios transmembrana e citoplasmáticos dos sindecans.....	35
Figura 12. TGF- β age durante a progressão do carcinoma.....	41
Figura 13. Curva de amplificação do PCR em Tempo Real.....	63
Figura 14. Curva de dissociação dos produtos de PCR derivados da amplificação.....	64
Figura 15. Glicosaminoglicanos sintetizados pelos fibroblastos controle em meio condicionado.....	68
Figura 16. Efeito do meio condicionado da linhagem Caco-2 sobre a síntese de GAGs de fibroblastos em cultura.....	68
Figura 17. Glicosaminoglicanos sintetizados pelos fibroblastos controle e no sistema Transwell.....	69
Figura 18. Efeitos da cocultura de Caco-2 e fibroblastos em sistema Traswell na síntese de GAGs dos fibroblastos.....	69
Figura 19. Glicosaminoglicanos sintetizados pela linhagem Caco-2 controle e com meio condicionado.....	70

Figura 20. Efeito do meio condicionado de fibroblastos sobre a síntese de GAGs na linhagem Caco-2 em cultura.....	70
Figura 21. Glicosaminoglicanos sintetizados pela linhagem Caco-2 controle e no sistema Transwell.....	71
Figura 22. Efeitos da cocultura de Caco-2 e fibroblastos em sistema Transwell na síntese de GAGs da linhagem Caco-2 em cultura.....	71
Figura 23. Secreção de condroitim sulfato e heparim sulfato no meio de cultura dos fibroblastos e de Caco-2.....	72
Figura 24. Proliferação dos fibroblastos medida pelo ensaio MTT.....	74
Figura 25. Proliferação das células da linhagem Caco-2 medida pelo ensaio MTT.....	75
Figura 26. Análise do proteoglicano versican na interação parácrina Caco-2-fibroblastos por imunofluorescência.....	77
Figura 27. Expressão dos sindecans, biglicam, decorin e versican nos fibroblastos durante interação parácrina com a linhagem Caco-2.....	79
Figura 28. Expressão dos sindecans, biglicam, decorin e versican na linhagem Caco-2 durante interação parácrina com fibroblastos.....	80
Figura 29. Glicosaminoglicanos sintetizados pelos fibroblastos e pela linhagem Caco-2 com TGF- β 1 exógeno.....	81
Figura 30. Efeito do TGF- β 1 na síntese de GAGs dos fibroblastos e da linhagem Caco-2.....	82
Figura 31. Síntese de glicosaminoglicanos sulfatados na linhagem IEC-6.....	83
Figura 32. Síntese de glicosaminoglicanos sulfatados na linhagem Caco-2.....	84
Figura 33. Síntese de glicosaminoglicanos sulfatados na linhagem HCT116.....	84
Figura 34. Síntese de CS e HS nas linhagens IEC, Caco-2 e HCT116.....	85
Figura 35. Produtos da degradação de HS nas linhagens IEC, Caco-2 e HCT116.....	86
Figura 36. Porcentagem relativa das unidades dissacarídicas do HS nas linhagens IEC, Caco-2 e HCT116.....	87
Figura 37. Produtos da degradação do CS da superfície das células das linhagens IEC, Caco-2 e HCT116.....	90
Figura 38. Porcentagem relativa das unidades dissacarídicas do CS no meio das linhagens IEC, Caco-2 e HCT116.....	91

Figura 39. Porcentagem relativa das unidades dissacarídicas do CS na matriz das linhagens IEC, Caco-2 e HCT116.....	92
Figura 40. Expressão dos genes endógenos nas linhagens IEC, Caco-2 e HCT116.....	94
Figura 41. Expressão dos sindecans e do versicam nas linhagens IEC, Caco-2 e HCT116.....	95
Figura 42. Distribuição dos filamentos de actina nas linhagens IEC, Caco-2 e HCT116.....	96
Figura 43. Expressão do mRNA de sulfotransferases nas três linhagens.....	98
Figura 44. Porcentagem relativa das unidades dissacarídicas 6-O-sulfatadas do HS e CS nas linhagens IEC, Caco-2 e HCT116.....	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características estruturais dos glicosaminoglicanos.....	6
Tabela 2. Classificação dos principais proteoglicanos.....	22
Tabela 3. Principais características dos <i>primers</i> utilizados.....	60
Tabela 4. Ciclos e temperaturas utilizados na amplificação dos genes.....	62
Tabela 5. Sumarização da alteração na síntese de GAGs de fibroblastos e da linhagem Caco-2.....	72

RESUMO

Proteoglicanos são macromoléculas complexas compostas de polissacarídeos lineares, os glicosaminoglicanos (GAGs), ligados covalentemente a um *core* protéico. Os GAGs contêm grupamentos sulfato em várias posições, formando domínios específicos, que permitem a interação com moléculas da matriz extracelular, incluindo os fatores de crescimento. Neste estudo, utilizamos o sistema de co-cultura em *Transwell* para analisar a interação entre fibroblastos e células de adenocarcinoma colorretal humano, Caco-2, e investigar os efeitos dessa interação na proliferação celular e na síntese de GAGs. Componentes solúveis trocados pelas células nesse sistema, induziram um aumento marcante na proliferação da Caco-2, efeito não observado nos fibroblastos. Um aumento na biossíntese de GAGs por incorporação de $^{35}\text{S-NaSO}_4$, foi observado em ambas linhagens, contudo o aumento mais significativo de condroitim sulfato (CS) foi detectado nas células estromais. A microscopia confocal mostrou um aumento expressivo de versicam produzido pelos fibroblastos. TGF- β 1 exógeno também foi testado e exibiu um significativo aumento de CS dose-dependente. Estes resultados sugerem que este fator de crescimento possa ser, em parte, responsável pelo aumento de CS observado nas células estromais, durante a interação parácrina.

A linhagem Caco-2, previamente analisada neste trabalho, também foi usada em comparação com outra linhagem de maior potencial metastático, HCT116. Uma linhagem de epitélio intestinal de rato, IEC-6, foi utilizada como controle. A marcação dessas células com $^{35}\text{S-NaSO}_4$ e a investigação de GAGs com enzimas específicas, mostraram aumento de 6-O-sulfatação de HS e CS. Os dados estruturais foram confirmados por PCR em Tempo Real, onde observamos a elevação específica da expressão do mRNA da 6-O-sulfotransferase de heparam nas células Caco-2 e HCT116, quando comparadas à IEC-6. O aspecto mais estudado até o momento, entre a estrutura fina do HS e a sinalização para fatores de crescimento, é o possível envolvimento da 6-O-sulfatação na ativação da sinalização do FGF.

Altos níveis de expressão de 6-O-sulfotransferase de condroitim-4-sulfato, foram encontrados nas células HCT116, cuja estrutura do CS contém GalNAc-4,6-sulfato, presente nos tetrassacarídeos e dissacarídeos dissulfatados. A participação dessas estruturas super-sulfatadas no CS tem sido correlacionada com a motilidade de células tumorais. Os dados estruturais obtidos neste trabalho e as correlações com as funções biológicas mencionadas, necessitam ser melhor investigados.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações Gerais

Glicosaminoglicanos (GAGs) são carboidratos complexos presentes principalmente na superfície celular e na interface célula-matriz extracelular (MEC). Avanços na tecnologia para análise dos GAGs e do genoma tem levado a um dramático aumento no conhecimento do importante papel biológico destes complexos polissacarídeos.

Devido a sua distribuição ubíqua na interface célula-MEC, os GAGs interagem com numerosas proteínas e modulam a atividade destas, influenciando assim processos biológicos como o desenvolvimento embrionário e a proliferação celular.

Atualmente existem diversos trabalhos que relatam a participação dos glicosaminoglicanos e proteoglicanos na carcinogênese de diversos tecidos. Nosso laboratório demonstrou ao longo dos anos alterações na estrutura e grau de sulfatação de GAGs, bem como alterações em proteoglicanos em tumores variados (Nader *et al.*, 1980; Dietrich *et al.*, 1982, 1993; Jeronimo *et al.*, 1994; Dietrich *et al.*, 1992; Elias *et al.*, 1999; Martins *et al.*, 2000; Theodoro *et al.*, 2008; Passerotti *et al.*, 2006; Staquicini *et al.*, 2003; Peretti *et al.*, 2008).

O câncer é a segunda causa principal de óbito, sendo responsável por mais de 60 milhões de mortes anualmente. Para os anos entre 1960 e 2000, os dados mostram um aumento de 15% para 25% de mortalidade nos países desenvolvidos. Já nos países em desenvolvimento, observaram-se taxas menores e crescentes, com uma expectativa de aumentar de 5,4 milhões em 2000 para 9,3 milhões em 2020, de acordo com projeções populacionais (Haas *et al.*, 2007).

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro câncer mais comum no mundo. É calculado que 394.000 mortes ocorrem anualmente devido ao CCR, e este câncer é a segunda causa de morte por câncer nos EUA e terceira nos países da União Européia. O número de casos novos de câncer de cólon e reto estimados para o Brasil no ano de 2008 foi de 12.490 casos em homens e de 14.500 em mulheres.

Estes valores correspondem a um risco estimado de 13 casos novos a cada 100 mil homens e 15 para cada 100 mil mulheres (INCA - www.inca.gov.br).

Apesar de existirem muitos fatores relacionados ao aparecimento e desenvolvimento do câncer colorretal, ainda não se pode explicar todas as manifestações clínicas e patológicas deste câncer. Além disso, ainda hoje a abordagem terapêutica mais realizada é a ressecção.

Focando a análise da síntese e expressão de GAGs e proteoglicanos (PGs) em células de câncer colorretal humano, este trabalho teve como objetivo pesquisar aspectos da interação estroma-câncer e o perfil de GAGs entre linhagens com diferentes potenciais metastáticos deste câncer. Este trabalho demonstra alterações na síntese e sulfatação de GAGs e PGs possivelmente envolvidos na progressão tumoral.

Para o esclarecimento das relações entre as modificações de síntese e sulfatação dos GAGs com o processo de carcinogênese, fazem-se necessários estudos adicionais. Acreditamos que num futuro próximo, estes estudos possam contribuir para que PGs e GAGs possam servir como possíveis marcadores tumorais e alvos para intervenções terapêuticas.

1.2. Glicosaminoglicanos

Os glicosaminoglicanos são heteropolissacarídeos lineares constituídos por unidades dissacarídicas repetitivas. Essas unidades dissacarídicas são formadas, alternadamente, por uma hexosamina (D-glucosamina ou D-galactosamina) unida por ligação *O*-glicosídica a um ácido urônico (D-glucurônico ou L-idurônico), ou ainda a um açúcar neutro (D-galactose). Estes açúcares podem ainda apresentar grupos sulfato que, juntamente com as carboxilas dos ácidos urônicos, conferem uma alta densidade aniônica a esses polímeros (Brimacombe & Stacey, 1964; Dietrich, 1984; Jackson, Busch & Cardin, 1991; Kjellén & Lindahl, 1991).

Devido a sua carga negativa, os glicosaminoglicanos são altamente hidrofílicos, incorporando grande quantidade de água em sua estrutura (Hatae, Atsuta & Makita, 1977). Esta característica propicia um aspecto viscoso às soluções destes açúcares, razão pela qual foram primeiramente denominados

mucopolissacarídeos, quando isolados no início do século XX (Meyer, 1938). Posteriormente o termo glicosaminoglicano foi proposto por Jeanloz em 1960, substituindo a nomenclatura antiga.

Os principais glicosaminoglicanos encontrados nos tecidos animais são: condroitim 4-sulfato, condroitim 6-sulfato, dermatam sulfato, heparina, heparam sulfato, queratam sulfato e ácido hialurônico. A distinção entre eles pode ser feita baseando-se nos seguintes parâmetros:

- Tipo de hexosamina (D-galactosamina ou D-glucosamina);
- Tipo de açúcar não nitrogenado (ácido urônico ou açúcar neutro)
- Tipo de ácido urônico (ácido L-idurônico ou ácido D-glucurônico);
- Presença, grau e posição de grupos sulfato;
- Tipo de ligação intradissacarídica e interdissacarídica.

Todos os glicosaminoglicanos possuem uma hexosamina que pode ser glucosamina ou galactosamina, mas nunca ambas no mesmo polímero. O condroitim sulfato e dermatam sulfato possuem resíduos de galactosamina, enquanto todos os outros glicosaminoglicanos contêm resíduos de glucosamina. As hexosaminas são sempre *N*-acetiladas, exceto na heparina e heparam sulfato onde podem ser tanto *N*-acetiladas quanto *N*-sulfatadas (Figura 1).

O condroitim 4-sulfato e condroitim 6-sulfato consistem de unidades dissacarídicas contendo *N*-acetilgalactosamina e ácido D-glucurônico, distinguindo-se nas posições dos ésteres de sulfato da hexosamina (C-4 ou C-6). Os monossacarídeos estão unidos por ligação intradissacarídica do tipo β -1,3 e interdissacarídicas do tipo β -1,4 (Brimacombe & Webber, 1964).

Dermatam sulfato (DS), anteriormente denominado condroitim sulfato B, difere dos condroitim sulfatos por apresentar, além do ácido β -D-glucurônico, o ácido α -L-idurônico (IdoA) ligado a um resíduo de *N*-acetil-galactosamina, com ligações intradissacarídicas do tipo β -1,3 para o ácido glucurônico, e α -1,3 para o ácido idurônico. As ligações interdissacarídicas são do tipo β -1,4.

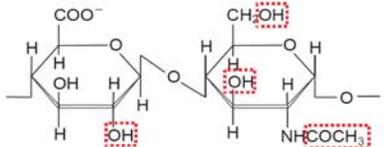
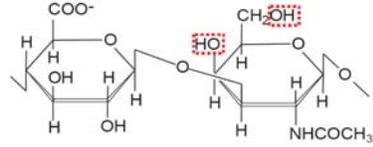
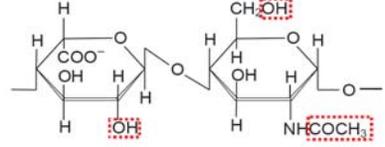
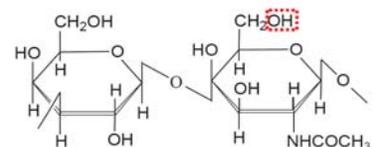
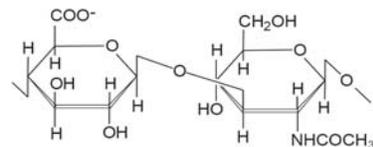
GAG	Composição Dissacarídica	GAG	Composição Dissacarídica
Heparam sulfato/ Heparina	 <p>GlcA $\beta(1\rightarrow4)$ GlcNAc $\alpha(1\rightarrow4)$</p>	Condroitim sulfato	 <p>GlcA $\beta(1\rightarrow3)$ GalNAc $\beta(1\rightarrow4)$</p>
	 <p>IdoA $\alpha(1\rightarrow4)$ GlcNAc $\alpha(1\rightarrow4)$</p>		Dermatam sulfato
Queratam sulfato	 <p>Gal $\beta(1\rightarrow4)$ GlcNAc $\beta(1\rightarrow3)$</p>	Acido hialurônico	 <p>GlcA $\beta(1\rightarrow3)$ GlcNAc $\beta(1\rightarrow4)$</p>

Figura 1 - Unidades Estruturais dos Glicosaminoglicanos. As diferentes posições de sulfatação em cada glicosaminoglicano estão marcadas em vermelho.

A heparina (HEP) apresenta resíduos de ácido L-idurônico (70-80%) e D-glucurônico (20-30%), com sulfatação no C2 do ácido L-idurônico (70-90%) e raramente sulfatada no ácido D-glucurônico. A glucosamina é usualmente sulfatada nas posições N- e C6 (Dietrich, 1968; Dietrich, 1969; Jorpes, Bostrom & Miutt, 1950). As ligações intradissacarídicas são do tipo α -1,4 para o ácido idurônico e β -1,4 para o ácido glucurônico. As ligações interdissacarídicas são do tipo α -1,4.

Heparam sulfato (HS) contém vários tipos de unidades dissacarídicas formadas por ácido β -D-glucurônico e α -L-idurônico ligados a D-glucosamina, podendo ser N-acetilada (GlcNAc), N-sulfatada (GlcNS), N-acetilada 6-sulfatada (GlcNAc,6S) ou N,6-dissulfatada (GlcNS,6S). Ocorre também uma pequena proporção de resíduos de ácido α -L-idurônico sulfatada no C2 (Dietrich *et al.*, 1971; Dietrich, Nader & Straus, 1983; Silva, Dietrich & Nader, 1974; Nader *et al.*,

1987; Tersariol *et al.*, 1994). Sua estrutura difere da heparina por possuir maior conteúdo de ácido glucurônico (GlcUA) e *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) (Dietrich *et al.*, 1971; Dietrich & Nader, 1974; Turnbull & Gallagher, 1990). Como na heparina, suas ligações interdissacarídicas são do tipo α -1,4, e as intradissacarídicas são α -1,4 para o ácido idurônico, e β -1,4 para o ácido glucurônico.

O ácido hialurônico (AH), também conhecido como hialuronan, tem como unidades dissacarídicas o ácido D-glucurônico (GlcA) e a *N*-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), unidos por ligação intradissacarídica do tipo β -1,3 e ligação interdissacarídica β -1,4 (Brimacombe & Webber, 1964). Sua estrutura tridimensional é semelhante a uma longa hélice estirada, estabilizada por pontes de hidrogênio (Laurent & Fraser, 1986; Lidholt, Kjéllen & Lindahl, 1989). O AH é o único glicosaminoglicano que não apresenta sulfatação.

Queratam sulfato (QS) apresenta como resíduo dissacarídico, *N*-acetil-D-glucosamina-6-sulfato (GlcNAc,6S) e D-galactose (Gal), unidos por ligação intradissacarídica β -1,4 e interdissacarídica β -1,3 (Bhavanandan & Meyer, 1967; Brimacombe & Webber, 1964). As principais características estruturais destes polissacarídeos estão sumarizadas na tabela 1.

Os diversos glicosaminoglicanos possuem massas moleculares que variam entre 5 e 100 kDa, exceto o ácido hialurônico, que pode atingir massas moleculares da ordem de 10.000 kDa.

Estes compostos estão presentes em todas as espécies de animais que possuem organização tissular, distribuídos desde espongiários até mamíferos (Cássaro & Dietrich, 1977; Dietrich *et al.*, 1983; Dietrich, Nader & Straus, 1983; Dietrich *et al.*, 1985; Nader *et al.*; 1984; Spillman *et al.*, 1995; Chavante *et al.*, 2000; Medeiros *et al.*, 2000).

Nomenclatura Meyer (1938)	Nomenclatura Jeanloz (1960)	M.M. ^a	Monossacarídeos ^b	Posição do sulfato	Ligação glicosídica
condroitim sulfato A	condroitim 4-sulfato	$2-5 \times 10^4$	N-acetilgalactosamina ácido glucurônico	4 -	$\beta(1-4)$ $\beta(1-3)$
condroitim sulfato B	dermatam sulfato	$2-5 \times 10^4$	N-acetilgalactosamina ácido glucurônico ácido idurônico	4 - -	$\beta(1-4)$ $\beta(1-3)$ $\alpha(1-3)$
condroitim sulfato C	condroitim 6-sulfato	$2-7 \times 10^4$	N-acetilgalactosamina ácido glucurônico	6 -	$\beta(1-4)$ $\beta(1-3)$
ácido hialurônico	ácido hialurônico	$5-50 \times 10^5$	N-acetilglucosamina ácido glucurônico	- -	$\beta(1-4)$ $\beta(1-3)$
querato sulfato	queratam sulfato	$1-3 \times 10^4$	N-acetilglucosamina galactose	6 -/6	$\beta(1-3)$ $\beta(1-4)$
heparitim sulfato	heparam sulfato	$1-6 \times 10^4$	glucosamina N-acetilglucosamina ácido glucurônico ácido idurônico	2/6 -/6 - -/2	$\alpha(1-4)$ $\alpha(1-4)$ $\beta(1-4)$ $\alpha(1-4)$
heparina	heparina	$1-6 \times 10^4$	glucosamina ácido glucurônico ácido idurônico	2/6 - -/2	$\alpha(1-4)$ $\beta(1-4)$ $\alpha(1-4)$

Tabela 1 - Características Estruturais dos Glicosaminoglicanos.

^a A massa molecular média varia neste intervalo de acordo com a origem dos glicosaminoglicanos.

^b Todos os açúcares estão na configuração D, exceto o ácido idurônico que se apresenta na configuração L.

A comparação da distribuição dos glicosaminoglicanos em diferentes tecidos é importante para o conhecimento da função biológica dessas moléculas. Dietrich, Sampaio & Toledo (1976) verificaram que a quantidade e o tipo de GAG variam com o tecido. Além da diferente distribuição dos GAGs nos tecidos, uma enorme variação ocorre no mesmo tecido quando se muda a espécie (Nader *et al.*, 1999).

1.2.1. Ocorrência e Funções

Estudos baseados na distribuição dos glicosaminoglicanos nos diversos tecidos animais mostraram que, com exceção das bactérias, fungos e protozoários, os glicosaminoglicanos aparecem distribuídos na escala filogenética desde cnidários (celenterados) até os mamíferos, estando presentes em todos os tecidos desses organismos (tanto invertebrados como vertebrados). Cássaro e Dietrich estudaram 22 espécies de invertebrados, pertencentes aos filos Porifera, Cnidaria, Annelida, Mollusca, Arthropoda, Insecta e Echinodermata e verificaram que a distribuição de dermatam sulfato nestes filos é irregular não seguindo a escala evolutiva, uma vez que só está presente em algumas classes de Porifera, Mollusca, Crustacea, Insecta e Tunicata (Cassaro & Dietrich, 1977). Resultados semelhantes foram obtidos estudando-se várias outras espécies pertencentes às classes Mollusca e Crustacea (Nader *et al.*, 1984; Nader *et al.*, 1988; Ferreira *et al.*, 1993). Também foram realizados estudos sistemáticos da distribuição e caracterização dos GAG nos diversos tecidos de mamíferos (Dietrich, Sampaio & Toledo, 1976; Nader, *et al.*, 1980), na ontogenia (Sampaio & Dietrich, 1981), filogenia (Gomes & Dietrich, 1982), oncogenia (Dietrich, Sampaio & Montes de Oca, 1979; Sampaio & Dietrich, 1981), células normais e transformadas em cultura (Dietrich & Montes de Oca, 1970, 1978), bem como em cartilagem e enfermidades degenerativas (Michelacci, Laredo & Dietrich, 1981; Mourão, *et al.*, 1973; Mourão, *et al.* 1976) sugerindo que o aparecimento dos GAG é concomitante à organização tissular dos diversos filos (Dietrich, Nader & Straus, 1983; Dietrich *et al.*, 1983; Nader *et al.*, 1983; Nader *et al.*, 1984; Dietrich *et al.*, 1985; Spillman *et al.*, 1995). A Figura 2 mostra a distribuição dos glicosaminoglicanos na escala filogenética, não havendo qualquer relação evolutiva entre os filos.

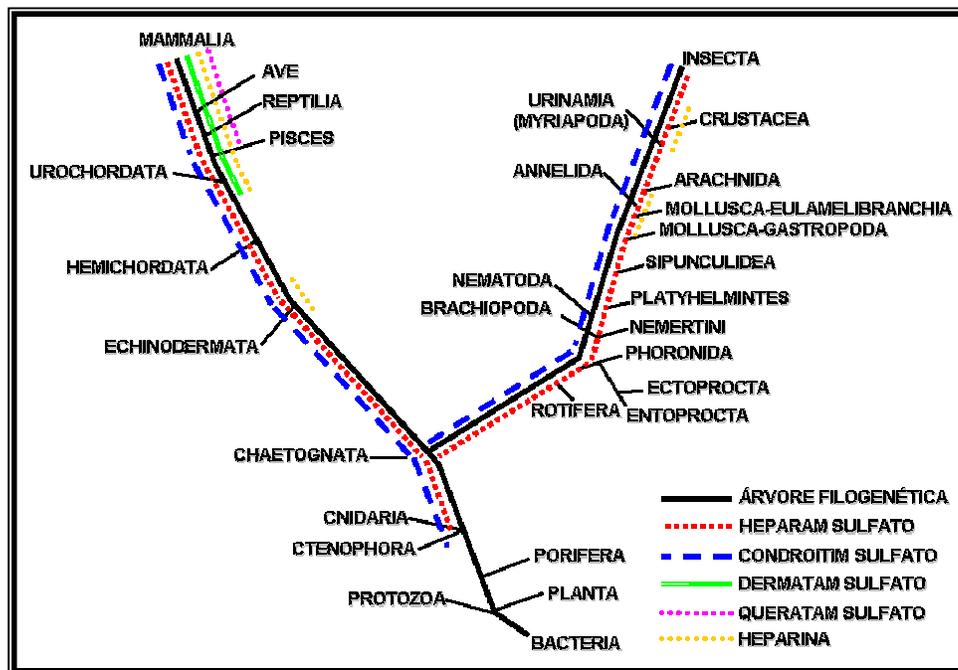


Figura 2- Distribuição dos Glicosaminoglicanos na Escala Filogenética. Os glicosaminoglicanos sulfatados encontram-se largamente distribuídos na escala filogenética, desde espongiários até mamíferos superiores. Heparam sulfato e condroitim sulfato estão presentes tanto em vertebrados quanto em invertebrados. Já o dermatam sulfato está presente em cordados e hemicordados. Por outro lado, o queratam sulfato é encontrado somente em cordados. Heparina, por sua vez, está presente principalmente em vertebrados, com exceção de algumas espécies de ctenóforas, moluscos, anelídios e crustáceos. (Nader *et al.*, 1999; Cássaro & Dietrich, 1977; Toledo & Dietrich, 1977; Gomes & Dietrich, 1982; Straus, Nader & Dietrich, 1982; Dietrich, Nader & Straus, 1983; Dietrich *et al.*, 1983; 1985; 1989; 1998; 1999; Nader *et al.*, 1984; 1988; 1996; Nader & Dietrich, 1989; Ferreira *et al.*, 1993; Pavão *et al.*, 1995; Spillman *et al.*, 1995; Santos, 1997; Mourão *et al.*, 1998; Medeiros *et al.*, 2000; Chavante *et al.*, 2000).

Resultados bastante interessantes foram obtidos por Nader *et al.*, 1983, mostrando uma maior concentração de glicosaminoglicanos em espécies marinhas de invertebrados, quando comparados a invertebrados de água doce ou terrestres. Esses dados mostram a importância dos glicosaminoglicanos na manutenção do balanço hídrico em espécies animais que vivem habitats com alto grau de salinidade.

Os glicosaminoglicanos sulfatados são encontrados com exclusividade no reino animal e apresentam-se amplamente distribuídos na escala filogenética, desde espongiários até mamíferos superiores. Heparam sulfato e condroitim

sulfato estão presentes tanto em vertebrados quanto em invertebrados. Já o dermatam sulfato está presente em cordados e hemicordados e o queratam sulfato é encontrado somente em cordados (Cássaro & Dietrich, 1977; Toledo & Dietrich, 1977; Gomes & Dietrich, 1982; Dietrich *et al.*, 1983; Nader *et al.*, 1984; 1996; Mourão *et al.*, 1998; Medeiros *et al.*, 2000).

Durante o processo evolutivo, a estrutura do heparam sulfato manteve-se constante. Enquanto que os condroitim sulfatos apresentam-se não sulfatados ou sulfatados em C-4, desde espongiários até os moluscos (gastrópodes). A partir da ordem eulamelibranchia, há a ocorrência tanto do grupamento sulfato em C-4 quanto em C-6, estendendo-se até insetos e em todos os vertebrados (Nader *et al.*, 1984; 1996). O heparam sulfato exibe mais alta variabilidade estrutural entre os tecidos e espécies de origem (Dietrich, Nader & Straus, 1983; Nader *et al.*, 1999a). Ao contrário da heparina, que está presente em poucos tecidos e espécies do reino animal, o heparam sulfato é largamente distribuído, tendo sua estrutura principal mantida ao longo da evolução (Nader *et al.*, 1999a).

Os GAG ocorrem em tecidos e fluidos animais (Toledo & Dietrich, 1977) e na superfície celular (Kraemer, 1971) apresentando diferenças estruturais dependendo do tecido ou organismo de origem. Uma fonte muito rica desses compostos é o tecido conjuntivo, tal como pele, cartilagem e ligamentos, onde junto com o colágeno e outras fibras elásticas, formam a matriz intercelular na qual as células do tecido conjuntivo ou fibroblastos se apóiam. Proporções consideráveis são também encontradas em parede de artérias, cordão umbilical, humor vítreo e líquido sinovial. Em alguns casos, os glicosaminoglicanos estão presentes dentro das células, principalmente em mastócitos e em células circulantes, como plaquetas e leucócitos.

As funções dos glicosaminoglicanos foram sugeridas com base na sua presença em determinados tecidos, relacionando as funções dos tecidos com as propriedades físico-químicas desses compostos. Assim, como se tratam de moléculas largamente distribuídas em diferentes tecidos, diversas funções lhes são atribuídas, tais como: controle de água e eletrólitos; regulação da atividade nuclear; transporte de cálcio, quelantes de cálcio; lubrificação; cicatrização;

controle de divisão celular; resistência a infecção; adesão, sinalização e reconhecimento celular.

1.2.2. Função dos Glicosaminoglicanos CS, DS e HS

Como neste trabalho investigaremos as alterações na síntese do CS, DS e HS, detalharemos a seguir as principais funções destes glicosaminoglicanos

1.2.2.1. Condroitim sulfato

Os condroitim sulfato são componentes característicos da matriz dos tecidos conjuntivos, representando cerca de 10% do peso seco de cartilagens (Mourão & Dietrich, 1973). O condroitim sulfato apresenta-se, normalmente, como composto híbrido, ou seja, dependendo da origem, há variações no teor e na posição da sulfatação. Por exemplo, o condroitim 6-sulfato de cartilagem de tubarão apresenta 5% do sulfato na posição C-4 da hexosamina, enquanto que no condroitim 4-sulfato de cartilagem de baleia mostra 20% do sulfato na posição C-6 (Michelacci & Dietrich, 1976; Michelacci & Dietrich, 1986). Juntamente com o ácido hialurônico possuem a função de reter água no tecido favorecendo, por exemplo, o amortecimento da cartilagem contra pressões (Shatton & Schubert, 1954; Muir & Hardingham, 1975)

O condroitim 6-sulfato está relacionado com a integridade dos tecidos sujeitos a forças mecânicas, uma vez que são característicos de cartilagens articulares (Michelacci *et al.*, 1979; Michelacci & Horton, 1989), enquanto que o condroitim 4-sulfato parece estar envolvido nos processos de crescimento e ossificação (Mourão *et al.*, 1973; Mourão *et al.*, 1976; Carney & Muir, 1988), pois é mais característico de cartilagens em crescimento e está relacionado com patologias como artrose, condromas, condrossarcomas e calo ósseo (Mourão, Michelacci & Toledo, 1979; Michelacci, Laredo & Dietrich, 1981).

O condroitim 6-sulfato parece também estar relacionado com o mecanismo de divisão celular, impedindo o contato entre as células (Dietrich & Armelin, 1978; Dietrich & Montes De Oca, 1978; Dietrich *et al.*, 1982; Dietrich, 1984), e foi

observado um aumento de condroitim 6-sulfato em diversos tecidos neoplásicos (Sampaio, Dietrich & Gianotti, 1977; Dietrich *et al.*, 1978; Dietrich *et al.*, 1980).

1.2.2.2. Dermatam sulfato

O dermatam sulfato pode ser isolado da matriz extracelular de tecidos conjuntivos densos como pele, tendão e esclera assim como músculo esquelético, veias, ossos e cartilagens, onde, junto com o colágeno, elastina e outras glicoproteínas, desempenha um importante papel na manutenção da integridade estrutural do tecido (Toledo & Dietrich, 1977; Lindahl & Höök, 1978; Fransson, 1985; Población & Michelacci, 1986). Além disso, apresenta algumas atividades farmacológicas, entre as quais destacam-se a atividade anticoagulante através de sua interação com o cofator II da heparina (HCII), e a atividade antilipásica, a qual aparentemente está relacionada com o grau de sulfatação (Linhardt & Hileman, 1995).

Variações no teor e na posição da sulfatação foram também observadas para os dermatam sulfatos de diferentes origens. Assim, a galactosamina que ocorre preferencialmente sulfatada em C-4 (*N*-acetilgalactosamina-4-sulfato) pode, também, ser sulfatada em C-6 ou em ambas posições; além disso o ácido idurônico pode ser sulfatado na posição C-2 (Fransson & Malmstrom, 1971). Também foram descritas estruturas híbridas para dermatam sulfato purificados de vários tecidos de mamíferos, ficando claro que o número e a distribuição das diferentes unidades dissacarídicas ao longo da molécula varia de um DS ao outro (Población & Michelacci, 1986).

1.2.2.3. Heparan Sulfato

O heparan sulfato (HS) foi isolado, inicialmente, de fígado e pulmão bovino em 1948 por Jorpes e Gardell, sendo considerado, a princípio uma heparina com baixa atividade anticoagulante (Jorpes & Gardell, 1948), porém desde então, uma grande quantidade de atividades biológicas vêm sendo atribuídas a esse composto.

O HS está envolvido em importantes funções como reconhecimento célula-célula e controle do crescimento celular, tanto em vertebrados como em invertebrados (Nader *et al.*, 1999), como também regula importantes rotas de sinalização celular (Lin, 2004). Em 1974, Nader e Dietrich mostraram que uma fração do HS, denominada fração D, apresentou atividade anti-hemostática igual a da heparina, porém, somente 5% de sua atividade anticoagulante. Os resultados sugeriam que estas atividades farmacológicas relacionavam-se com o grau de sulfatação e a presença de grupos N-acetil (Nader & Dietrich, 1974; Ehrlich & Stivala, 1973). Hoje se sabe que a ação anticoagulante do heparam e da heparina ocorre primeiramente pela ligação da antitrombina a uma seqüência pentassacarídica específica do açúcar, que apresenta uma unidade de glucosamina 3-O-sulfatada (Razi & Lindahl, 1995; Gong *et al.*, 2003). Somente uma fração de heparina comercial (30-40%) carrega a seqüência de ligação mencionada acima e tem alta afinidade a antitrombina. A proporção deste sítio em preparações de HS é geralmente menor do que em heparina (Lane *et al.*, 1986; Marcum *et al.*, 1986, Pejler & David, 1987; Pejler *et al.*, 1987; Shworak *et al.*, 1994; Razi & Lindahl, 1995).

Em nosso laboratório, a função do HS via PKC (uma família de serina-treonina quinases) vem sendo estudada em células endoteliais de aorta de coelho. PKCs estão envolvidas na regulação de uma variedade de funções celulares, incluindo proliferação, expressão de genes, ciclo celular, diferenciação, organização do citoesqueleto, migração celular e apoptose (Lopes, Dietrich & Nader, 2006).

O heparam sulfato, de um modo geral, está presente na superfície das membranas plasmáticas, e também, na matriz extracelular (Nader *et al.*, 2004); isso implica que tal molécula esteja estrategicamente posicionada para regular interações entre as células e o seu meio, que são de importância fundamental para o crescimento e desenvolvimento normal e para a manutenção de funções celulares (Nader *et al.*, 2004). O heparam sulfato provoca mudanças nas propriedades físico-químicas das regiões pericelulares, tendo em vista suas características estruturais, tal como o elevado caráter polianiónico. Por

exemplo, inibem a difusão de macromoléculas através de membranas plasmáticas (Kanwar *et al.*, 1980) e desta forma, podem controlar o acesso à superfície celular de moléculas regulatórias importantes, tais como fatores de crescimento, hormônios e neurotransmissores, bem como influenciar o balanço catiônico local, especialmente de íon cálcio (Obrink *et al.*, 1976; Porcionatto *et al.*, 1998).

Células em cultura também sintetizam heparan sulfato (Dietrich e Montes De Oca, 1970 e 1978), o qual está associado à superfície celular (Dietrich e Armelin, 1978; Dietrich *et al.*, 1982; Kraemer, 1971) e à membrana basal (Kanwar e Farquhar, 1979).

1.2.3. Biossíntese e Região de Ligação dos Glicosaminoglicanos

A biossíntese dos PG inicia-se com a montagem do núcleo protéico no retículo endoplasmático rugoso. Os açúcares são adicionados a partir de nucleotídeos-açúcar, através da ação de glicosil transferases presentes no Golgi, e são subsequentemente modificados pela ação de desacetilases, epimerases e sulfo-transferases (Esko & Selleck, 2002). Múltiplas isoformas dessas enzimas são expressas de modo diferente em um ajuste temporal e espacial (Habuchi *et al.*, 2000). O resultado é a síntese apropriada de seqüências sacarídicas únicas e específicas, capazes de uma variedade de funções biológicas (Linhardt e Toida, 2004).

A ligação entre a cadeia de glicosaminoglicanos e a porção protéica é mediada por uma unidade tetrassacarídica, β -D-xilose- β -D-galactose- β -D-galactose- ácido β -D-glucurônico, em que a sua extremidade não redutora está unida à cadeia de glicosaminoglicano, enquanto que a extremidade redutora se une por ligação *O*-glicosídica, a um resíduo de L-serina ou L-treonina da proteína (Fransson, 1987; Lindahl, 1966; Rodén & Schwartz, 1975). As cadeias de queratam sulfato são exceções a essa regra, pois se ligam à porção protéica por oligossacarídeos dos tipos *N*- e/ou *O*-ligados (Baker *et al.*, 1975). A figura 3 esquematiza os diversos tipos de região de ligação dos glicosaminoglicanos com a porção protéica (Nilsson *et al.*, 1982; Poole, 1986).

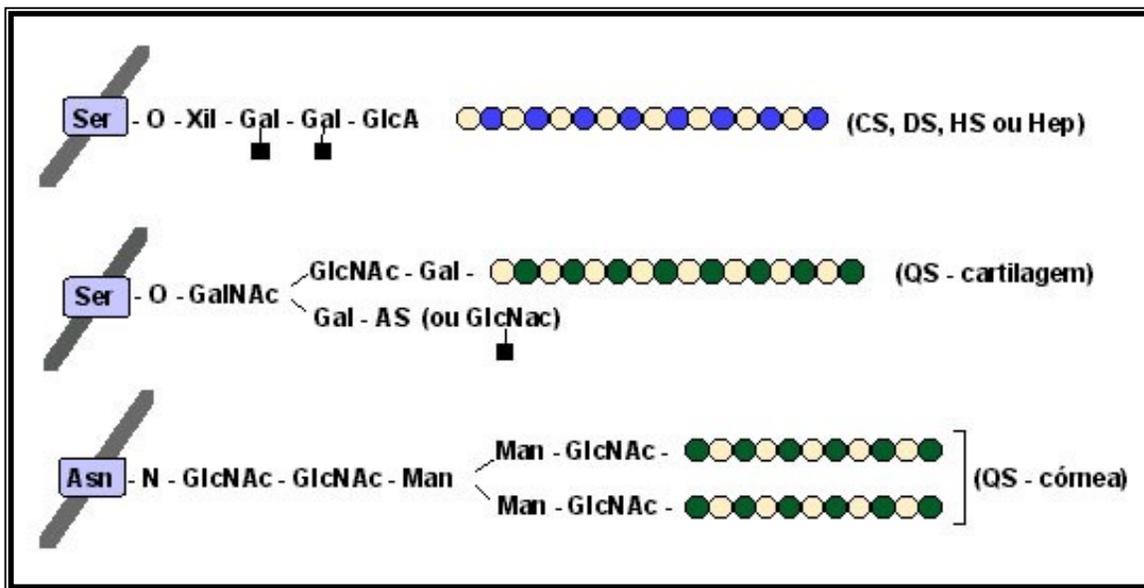


Figura 3 - Tipos de Ligações dos Glicosaminoglicanos Sulfatados ao Esqueleto Protéico (Hardingham & Fosang, 1992). Condroitim sulfato (CS), dermatam sulfato (DS), heparam sulfato (HS) e heparina (HEP) ligam-se a um resíduo de L-serina da porção protéica por uma região de ligação comum, composta pelo tetrassacarídeo β -D-xilose- β -D-galactose- β -D-galactose ácido β -D-glucurônico (Xil-Gal-Gal-GlcA). O queratam sulfato (QS) está ligado à porção protéica do proteoglicano por meio de oligossacarídeos dos tipos O-ligados (cartilagem) ou N-ligados (córnea). GalNAc: N-acetil-D-galactosamina; GlcNAc: N-acetil-D-glucosamina; AS: ácido siálico; MAN: D-manose; SER: L-serina, ASN: L-Asparagina; ○: Hexosamina; ●: Ácido Urônico; ●: D-Galactose; ■: Possível Sítio de Sulfatação.

1.2.4. Biossíntese do Heparam Sulfato

Para explicar a biossíntese dos glicosaminoglicanos, utilizaremos como exemplo a biossíntese do heparam sulfato.

Em termos gerais, a cadeia inicial do heparam sulfato é sintetizada pela ação alternada de diferentes glicosiltransferases, que adicionam resíduos de ácido D-glucurônico (GlcUA) e N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc). Para o polímero de unidades alternadas de GlcUA e GlcNAc assumir a estrutura completa de heparam sulfato são ainda necessárias uma série de reações de modificações poliméricas: N-deacetilação/N-sulfatação, epimerização do resíduo do ácido β -D-glucurônico a ácido α -L-idurônico e O-sulfatação em diferentes posições. Cada produto de uma reação é substrato para a próxima (Bernfield *et al.*, 1999) e as sulfotransferases usam o 3'-fosfoadenosina 5'-fosfosulfato (PAPS) como doador

de sulfato (Lindahl *et al.*, 1994) (figura 4). O comprimento da cadeia de heparam sulfato pode variar, dependendo do tipo celular e do esqueleto protéico (Bernfield *et al.*, 1999).

A região consenso para glicosilação é um resíduo de L-serina (Ser), seguido de resíduo de L-glicina (Gly), em uma seqüência Ser-Gly-X-Gly, próxima de resíduos de aminoácidos ácidos (Bourdon *et al.*, 1987; Zhang & Esko, 1994). A xilose é o primeiro monossacarídeo a ser adicionado ao esqueleto protéico, pela ação da xilosiltransferase, empregando o precursor UDP-xilose, que é adicionado ao grupo hidroxila (-OH) da L-serina. Posteriormente, um resíduo de D-galactose é adicionado à região em formação pela ação da enzima galactosil-transferase I. A seguir, no complexo de Golgi, ocorre a adição de mais uma galactose (Gal) e de um resíduo de ácido glucurônico (GlcUA), respectivamente pelas enzimas galactosil-transferase II e glucuronosil-transferase I, formando assim a região de ligação composta pelo tetrassacarídeo $\text{GlcUA}\beta 1 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{Xil}\beta 1 \rightarrow 3\text{Ser}$, comum à maioria dos glicosaminoglicanos.

A elongação da cadeia de heparam sulfato é iniciada pela adição alternada de ácido D-glucurônico e *N*-acetil-D-glucosamina a partir de seus respectivos precursores UDP-açúcar ao terminal não redutor da cadeia polissacarídica nascente (Forsee & Rodén, 1981; Helting & Lindahl, 1972). São formadas as unidades dissacarídicas repetitivas contendo ácido β -D-glucurônico e β -D-*N*-acetilglucosamina unidas por ligação 1 \rightarrow 4 (Lind, Lindahl & Lidhout, 1993; Lindahl, Kusche-Gullberg & Kjellen, 1998).

Membros da família das enzimas *N*-desacetilase/*N*-sulfotransferase (NDSTs) fazem parte da biossíntese, removendo alguns grupos acetil e adicionando grupamentos sulfato para formar conjuntos de unidades dissacarídicas com resíduos de glucosamina *N*-sulfatada. A NDST realiza a *N*-desacetilação dos resíduos de *N*-acetilglucosamina e subsequente transferência de sulfato do PAPS ao amino grupo da mesma glucosamina e essa modificação cria um sítio para modificações futuras. (Aikawa & Esko, 1999; Eriksson *et al.*, 1994; Hashimoto *et al.*, 1992; Toma, Berninsone & Hirschberg, 1998) (Figura 4).

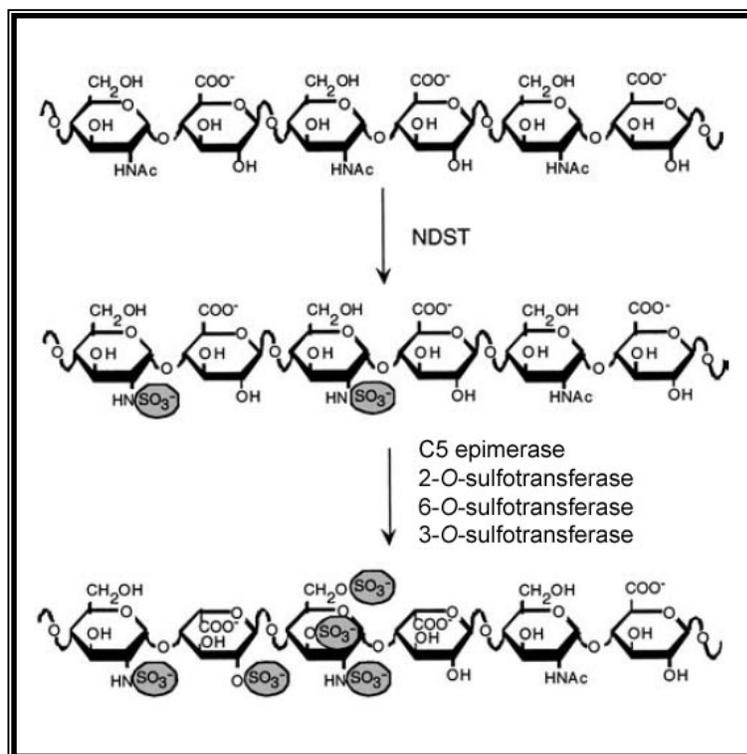


Figura 4 - Esquema da biossíntese do heparam sulfato. Na primeira etapa de modificação, grupos N-acetil (Ac) de alguns resíduos de N-acetilglucosamina são substituídos por grupos N-sulfato. As demais reações de modificação ocorrem somente na presença de grupos N-sulfato. As reações de modificação levam à geração de uma infinita diversidade de cadeias polissacarídicas. NDST= *N*-deacetilase-*N*-sulfotransferase. Adaptado de L. Kjellén, 2003.

A glucuronosil C5 epimerase pode atuar nos ácidos D-glucurônicos para formar ácido L-idurônico. Várias sulfotransferases atuam modificando o domínio-S nascente: 2-*O*-sulfotransferases (2-OSTs), que adicionam um grupamento sulfato na posição 2 do ácido L-idurônico e, raramente, no ácido D-glucurônico; 6-*O*-sulfotransferases (6-OSTs), que adicionam um grupamento sulfato à posição 6 da *N*-acetilglucosamina e glucosamina *N*-sulfatada e 3-*O*-sulfotransferases (3-OSTs), que atuam pouco, freqüentemente adicionando um grupamento sulfato à posição 3 da glucosamina *N*-sulfatada. As regiões enriquecidas com glucosamina *N*-sulfatada e ácido L-idurônico irão se tornar domínios *O*-sulfatados (Bernfield *et al.*, 1999; Turnbull, Powell & Guimond, 2001). Após o processo biossintético, os proteoglicanos formados são transportados para sua localização final, que pode ser: intracelular (como no caso do proteoglicano de heparina), na superfície

celular (como no caso dos proteoglicanos de heparam sulfato) ou na matriz extracelular (Lindahl *et al.*, 1994).

1.2.5. Estrutura do Heparam Sulfato

Inicialmente, com o emprego de enzimas específicas isoladas de *F. heparinum*, foi verificado que o heparam sulfato de pulmão bovino é constituído de cinco tipos de unidades dissacarídicas principais (Dietrich *et al.*, 1983 e 1998), como ilustrado na figura 5. A ordem na qual as unidades dissacarídicas ocorrem na molécula de heparam sulfato, foi primeiramente estabelecida em células endoteliais de coelho em cultura (Nader *et al.*, 1987).

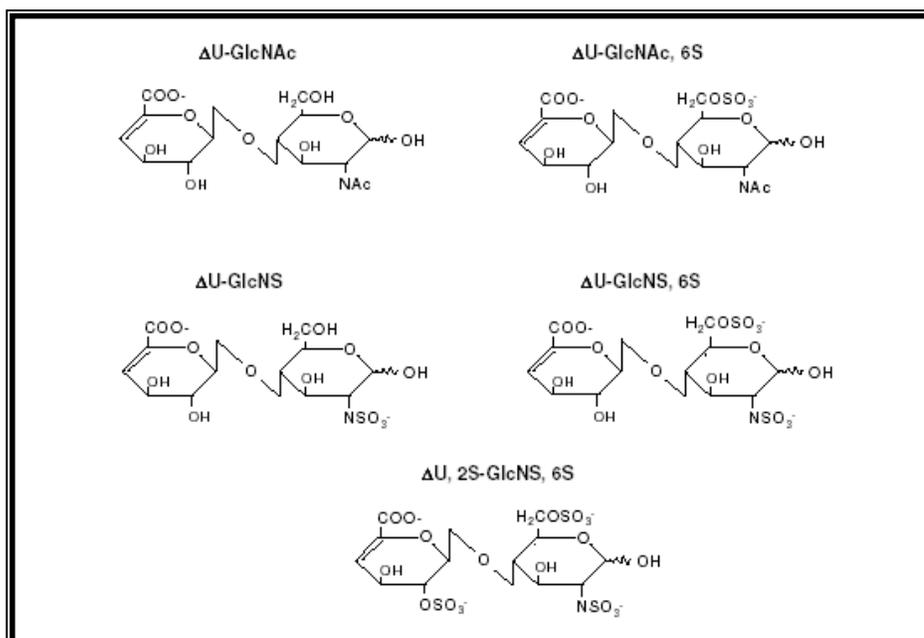


Figura 5 - Principais Unidades Dissacarídicas do Heparam Sulfato Obtidas por Degradação Enzimática com as Heparitinases I e II. Δ U-GlcNAc: Ácido $\Delta^{4,5}$ -enepiranosil urônico-(1 \rightarrow 4)-2-desoxi-2-acetamido-D-glucopiranosose; Δ U-GlcNAc,6S: Ácido $\Delta^{4,5}$ -enepiranosil urônico-(1 \rightarrow 4)-2-desoxi-2-acetamido-D-glucopiranosose-6-O-sulfato; Δ U-GlcNS: Ácido $\Delta^{4,5}$ -enepiranosil urônico-(1 \rightarrow 4)-2-desoxi-2-sulfoamino-D-glucopiranosose; Δ UGlcNS, 6S: Ácido $\Delta^{4,5}$ -enepiranosil urônico-(1 \rightarrow 4)-2-desoxi-2-sulfoamino-D-glucopiranosose-6-O-sulfato; Δ U,2S-GlcNS,6S: Ácido Δ 4,5-2-desoxi-2-O-sulfato-enepiranosil urônico-(1 \rightarrow 4)-2-desoxi-2-sulfoamino-D-glucopiranosose-6-O-sulfato.

Além das análises químicas e enzimáticas (Dietrich *et al.*, 1983; Silva *et al.*, 1976), a determinação estrutural desses polissacarídeos também foi obtida por

ressonância nuclear magnética de ^{13}C e ^1H (Nader *et al.*, 1990; Dietrich *et al.*, 1999; Medeiros *et al.* 2000; Chavante *et al.*, 2000; Perlin *et al.*, 1970). Essas cinco unidades dissacarídicas estão presentes em heparam sulfatos de diferentes origens, desde invertebrados até mamíferos (Dietrich *et al.*, 1983; Nader *et al.*, 1984, Nader *et al.*, 1987; Dietrich *et al.*, 1998). A seqüência dissacarídica completa do heparam sulfato de pâncreas bovino e a seqüência parcial de outros sete heparam sulfatos analisados estão representados na figura 6.

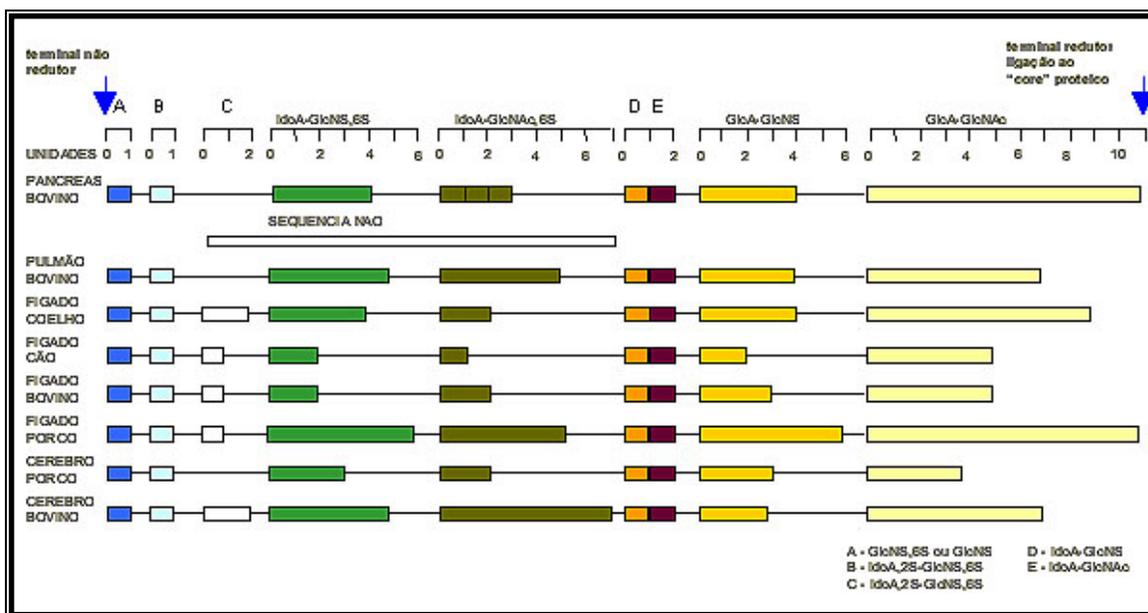


Figura 6 - Estrutura de heparam sulfatos de diferentes origens. GlcA - ácido glucurônico; IdoA - ácido idurônico; Ido,2S - ácido idurônico 2-sulfato; GlcNAc - glucosamina N-acetilada; GlcNAc,6S - glucosamina N-acetilada,6-sulfato; GlcNS - glucosamina N-sulfato; GlcNS,6S - glucosamina 2,6-dissulfato.

Todos os heparam sulfatos contêm características estruturais comuns, compostas por duas regiões. A primeira região contém um domínio *N*-acetilado, no terminal redutor (que está ligado ao esqueleto protéico), seguido de um domínio *N*-sulfatado, ambos contendo ácido β -D-glucurônico. A outra região, é mais sulfatada, formada por dissacarídeos contendo ácido α -L-idurônico. Separando estas duas regiões, há um tetrassacarídeo peculiar composto de dissacarídeos *N*-acetilado e *N*-sulfatado, ambos contendo ácido L-idurônico (Dietrich *et al.*, 1998). Foi também observado que o terminal não redutor de

todos os heparam sulfatos analisados, é constituído por um monossacarídeo (D-glucosamina, *N*-sulfatada e/ou 2,6 dissulfatada). Dietrich *et al.* (1998), com base nos dados estruturais do heparam sulfato, e levando em consideração que a sua distribuição é tecido e espécie específica (Dietrich *et al.*, 1983; Dietrich, 1984), propuseram que essa variabilidade poderia estar relacionada com o tamanho dessas regiões descritas.

A presença do heparam sulfato foi constatada em todos os organismos que apresentam organização tissular (Cássaro e Dietrich, 1977; Nader *et al.*, 1984) e a sua distribuição pode ser classificada como tecido específico, pois sua estrutura varia de tecido para tecido (Toledo e Dietrich, 1977; Dietrich *et al.*, 1983). As unidades dissacarídicas que compõem os heparam sulfatos foram mantidas durante a evolução e a estrutura destes polímeros é tanto tecido quanto espécie específicos (Dietrich *et al.*, 1983; Ferreira *et al.*, 1993; Nader *et al.*, 1983, 1984 e 1988; Toledo e Dietrich, 1977).

Baseando-se nesses e em outros dados, Dietrich (1984) sugeriu que os heparam sulfatos estão envolvidos nos processos de reconhecimento e adesão celular. Segundo o autor, os dados referentes às diferentes proporções das cinco unidades dissacarídicas (Figura 3), de acordo com o tecido, reforçam essa proposta. Assim, o heparam sulfato poderia funcionar como “polímero código”, dando especificidade para a interação celular. De fato, outros estudos relataram a sua participação em processos biológicos tais como, interação com os componentes da matriz extracelular (laminina, fibronectina, colágeno) (David, 1993), participação na formação de adesões focais (Woods e Couchman, 1996), e controle da proliferação celular (Dietrich *et al.*, 1982; Porcionatto *et al.*, 1994; 1998).

1.3. Proteoglicanos

Os proteoglicanos (PG) são compostos de alto peso molecular, formados por um esqueleto protéico ao qual se ligam, covalentemente, cadeias de glicosaminoglicanos e oligossacarídeos *N*- e/ou *O*-ligados (Thonar & Sweet, 1977; Lohmander *et al.*, 1980; Nilsson De Luca & Lohmander, 1982; Dietrich, 1984;

Lindahl *et al.*, 1994). Todos os glicosaminoglicanos, com exceção do ácido hialurônico, são sintetizados na forma de proteoglicanos (Dietrich, 1984; Kjellèn & Lindahl, 1991; Esko, 1991).

Até o final da década de 1980, a classificação dos proteoglicanos era baseada nos tipos de glicosaminoglicanos constituintes (Poole, 1986). Após os estudos de seqüenciamento, clonagem gênica e imunohistoquímica constatou-se que vários proteoglicanos de diferentes origens têm apresentado esqueletos protéicos idênticos. Por isso, desde o início dos anos 90 os proteoglicanos têm sido organizados com base na homologia de seus esqueletos protéicos, considerando também a sua localização nos diversos tecidos (Couchman & Abrahamson, 1993; Esko, 1991; Iozzo, 1998).

A classificação pela localização celular divide os proteoglicanos em três categorias: matriz extracelular (intersticial e membrana basal), em grânulos citoplasmáticos e na superfície celular. A título de curiosidade, os nomes dados aos proteoglicanos muitas vezes são alusões a: 1) sua função ou atividade biológica, como por exemplo, lumican que confere transparência à córnea, versican um PG versátil, com inúmeras funções; 2) sua localização tecidual, como por exemplo, testican descrito inicialmente nos testículos e cerebroglican inicialmente descrito no cérebro; ou ainda 3) a aspectos de sua estrutura, como o biglican que possui duas cadeias de glicosaminoglicanos e o perlecan, que tem aspecto de “colar de pérolas” quando analisado por microscopia eletrônica. É importante ressaltar que embora os nomes sejam dados pelas diversas razões citadas acima, a classificação para membros de uma mesma família é feita, atualmente, com bases na homologia da seqüência gênica dos esqueletos protéicos.

A tabela a seguir mostra a classificação dos principais proteoglicanos:

PROTEOGLICANOS DE MATRIZ EXTRACELULAR						
FAMÍLIA "leucine-rich"	nº de cadeias	tipo	Esqueleto Protéico	Localização	Atividade	Ref.
Biglicam	2	CS, DS	40	Tecido conjuntivo	Adesão celular, regulação hematopoiética	1, 2, 4, 6
Decorim	1	CS, DS	40	Tecido conjuntivo, ossos, dentes	Adesão celular, fibrinogênese	1 a 4, 7, 16
Epificam	2 a 3	CS, DS	35	Cartilagem epifisária	Não definida	2, 4, 8
Fibromodulim	2 a 3	QS	42	Tecido conjuntivo	Adesão celular, fibrinogênese	1, 2, 4, 9
Lumicam	3 a 4	QS	38	Córnea, intestino, fígado, músculo e cartilagem	Transparência da córnea e outras funções ainda não definidas	1 a 4, 10
Mimecam ou Osteoglicina	2 a 3	QS	35	Córnea e tecidos conjuntivos	Não definida	2, 4, 11
Osteoadarina	2 a 3	QS	42	Ossos	Promove a ligação nas células através da integrina $\alpha_v\beta_3$	2, 4, 12
PRELP	2 a 3	QS	44	Tecido conjuntivo	Não definida	2, 4, 13
FAMÍLIA HIALECTANS	nº de cadeias	tipo	Esqueleto Protéico	Localização	Atividade	Ref.
Agrecam	20 a 30	CS, QS	-220	Cartilagem, cérebro e vasos sanguíneos	Suporte mecânico, transporte de soluto	1, 2
Brevicam	1 a 3	CS	-100	Cérebro	Não definida	2, 3
Neurocam	3 a 7	CS	-136	Cérebro, cartilagem	Não definida	2, 3
Versicam	12 a 28	CS/ DS	265 a 370	MEC de vários tecidos	anti e pró-adesão, migração, proliferação celular	2, 5, 35
PROTEOGLICANOS DE MEMBRANA BASAL						
	nº de cadeias	tipo	Esqueleto Protéico	Localização	Atividade	Ref.
Agrim	3	HS	250	Junções neuromusc., memb. basal renal e pulmão	Regulação do crescimento axonal, interação célula-célula	2, 19, 20
Bamacam	3	CS	138	Membrana basal	Estabilidade de membrana	2, 21
Leprecam	nd	CS	-220	Membrana basal	Não definida	22
Perlecam	3	HS/ CS	400-467	Membrana basal, cartilagem	Estrutural	2, 23

PROTEOGLICANOS DE SUPERFÍCIE CELULAR						
	nº de cadeias	tipo	Esqueleto Protéico	Localização	Atividade	Ref.
Família dos Sindecans	2 a 3	HS/CS	22 a 88	Epitélio, fibroblasto, endotélio, sistema nervoso, células musculares lisas	Morfogênese, adesão celular, organização do citoesqueleto e atividade anticoagulante	24, 25, 33, 34
Família dos Glipicans	3 a 4	HS	62	Epitélio, fibroblasto e sistema nervoso central	Endocitose e coagulação	1, 24, 25
PROTEOGLICANOS FACULTATIVOS						
	nº de cadeias	tipo	Esqueleto Protéico	Localização	Atividade	Ref.
$\alpha_5\beta_1$	nd	CS/HS	nd	células de melanoma humano (Mel-85) e CHO	Estabiliza a interação com a fibronectina	26, 37
Betaglicam	0 a 4	CS/HS	270-300	Fibroblasto	Receptor do TGF- β III	27, 28
CD-44	0 a 4	CS/HS	32 a 49	Linfócitos e epitélio	Interação célula-célula	29, 30
Receptor de transferrina	4 a 6	HS	2 a 90	Fibroblasto	Mediar a captação de transferrina	31
Trombomodulina	0 a 1	CS	58 a 60	Endotélio	Controle da coagulação	1
NG2	2 a 3	CS	300	Células neurais, mesenquimais	Ligação ao colágeno VI e adesão celular	1, 32
Colágeno α 2 (IX)	1	CS/DS	68	Cartilagem e Humor vítreo	Ligação na banda D do colágeno tipo II	1
Apicam	nd	CS	120	Cérebro	Envolvimento na doença de Alzheimer	15
OUTROS PGs	nº de cadeias	tipo	Esqueleto Protéico	Localização	Atividade	Ref.
Fosfocam	nd	CS	173	Cérebro	Modulação de interações celulares no cérebro	16, 17
Serglicim	5 a 7	HEP	10	Mastócitos	Regulação da atividade e armazenamento de proteases	32
Testicam	1 a 2	HS/CS	44	Testículos e cérebro	Modulação de adesão e ativação de MMP	3, 18

Tabela 2. Classificação dos principais proteoglicanos. Referências: 1) Esko, 1991 - 2) Iozzo, 1998 - 3) Iozzo & Murdoch, 1996 - 4) Iozzo, 1999 - 5) Landolt *et al.*, 1995 - 6) Fisher, Termine & Young, 1989 - 7) Krusius, Gehlsen & Ruoslahti, 1986 - 8) Shinomura & Kimata,

1992 - 9) Oldberg *et al.*, 1989 - 10) Blochberger *et al.*, 1992 - 11) Funderburgh *et al.*, 1997 - 12) Sommarin *et al.*, 1998 - 13) Bengtsson *et al.*, 1995 - 14) Corpuz *et al.*, 2000 - 15) Shioi *et al.*, 1992 - 16) Friendland *et al.*, 1996 - 17) Maurel *et al.*, 1994 - 18) Röhl *et al.*, 2006 - 19) Tsen *et al.*, 1995 - 20) Cotman, Halfter & Cole., 1999 - 21) Wu & Couchman, 1997 - 22) Wassenhove-Mccarthy & Mccarthy, 1999 - 23) Hassel *et al.*, 1980 - 24) Bernfield *et al.*, 1992 - 25) Bernfield *et al.*, 1999 - 26) Veiga *et al.*, 1997 - 27) Ruoslahti & Yamaguchi, 1991 - 28) Derynck & Zhang, 2003 - 29) Stamenkovic *et al.*, 1989 - 30) Stamenkovic *et al.*, 1991 - 31) Fransson *et al.*, 1984 - 32) Pejler *et al.*, 2009 - 33) Nader, 1991 - 34) Castillo, Coulburn & Buonassisi, 1987 - 35) Wight, 2002.

1.3.1. Proteoglicanos de condroitim e dermatam sulfato

Proteoglicanos de condroitim e dermatam sulfato estão envolvidos em muitos processos biológicos e patológicos. Em câncer, alterações da expressão do *core* protéico são observados. Além disso, foi demonstrado que células de melanoma tratadas com condroitinase AC e B (enzimas que degradam CS/DS) apresentaram diminuição da proliferação e invasão tumoral, sugerindo um papel para os proteoglicanos de CS/DS em metástase (Denholm *et al.*, 2001).

Além do papel em processos patológicos, proteoglicanos de CS/DS participam do processo biológico normal, atuando no desenvolvimento neuronal, morfogênese, ligação a fatores de crescimento e sinalização (Deepa *et al.*, 2002; Nandini *et al.*, 2004). Como exemplos de proteoglicanos de CS/DS temos o decorim, o biglicam, o versicam e o agrecam (que também apresenta cadeias de queratam sulfato).

1.3.1.1. Decorim e biglicam

Decorim e biglicam pertencem à família de pequenos proteoglicanos de condroitim/dermatam sulfato, são caracterizados por um *core* protéico de aproximadamente 40 kDa (Krusius e Ruoslahti, 1986; Fisher *et al.*, 1989) e encontrados principalmente na matriz extracelular de tecidos conjuntivos.

Fazem parte da família “*leucine-rich*”, pois possuem em comum uma grande homologia em suas porções protéicas com 10 repetições de seqüências ricas em resíduos de leucina (Iozzo, 1998; Kresse, Hausser & Schonherr, 1993; Scott & Orford, 1981), conferindo a maioria de suas propriedades biológicas.

O biglicam contém duas cadeias de condroitim sulfato ou dermatam sulfato, seu esqueleto protéico (38kDa) foi seqüenciado (Choi *et al.*, 1989), e apresenta duas seqüências Ser-Gly perto da região N-terminal que corresponde aos sítios de glicosilação para as duas cadeias de glicosaminoglicanos. Também conhecido como proteoglicano I ou PG-I, podem aparecer formas contendo apenas uma cadeia (Krusius & Ruoslahti, 1986; Kresse, Hausser, Schonherr, 1993) (figura 8).

Biglicam está intimamente relacionado ao proteoglicano decorim (Kresse *et al.*, 1993; Iozzo & Murdoch, 1996), é mais abundante em tecidos conectivos e elementos relacionados, como células endoteliais, fibroblastos, e vasos sanguíneos, mas também foi detectado nos tecidos nervosos central e periférico.

Decorim contém uma única cadeia de condroitim sulfato ou dermatam sulfato (Ruoslahti, 1988) e se liga através das cadeias de DS ou do *core* protéico a macromoléculas da matriz extracelular (MEC), assim como colágenos tipo I, II, IV e XIV, fibronectina, e fator de crescimento transformante β (TGF- β) (Ehnis *et al.*, 1997; Brown *et al.*, 1999). Essa associação a macromoléculas confere a este PG uma estrutura "ornamental". Daí a origem de seu nome.

Decorim é um componente ubíquo na MEC de vários tecidos (Iozzo & Murdoch, 1996). Também chamado de proteoglicano II ou PG-S2, foi isolado de vários tecidos como: cartilagem, pele e fibroblasto em cultura, osso, esclera, camada íntima de aorta, córnea e tendão (Fisher, Termine & Young, 1989; Heinegard *et al.*, 1990; Sampaio *et al.*, 1988). O decorim por se ligar ao colágeno tem um importante papel na organização de suas fibras, sendo que esta ligação específica entre o PG e o colágeno determina as propriedades de elasticidade e transparência do tecido (Scott & Orford, 1981; Sampaio *et al.*, 1988; Hardingham & Fosang, 1992).

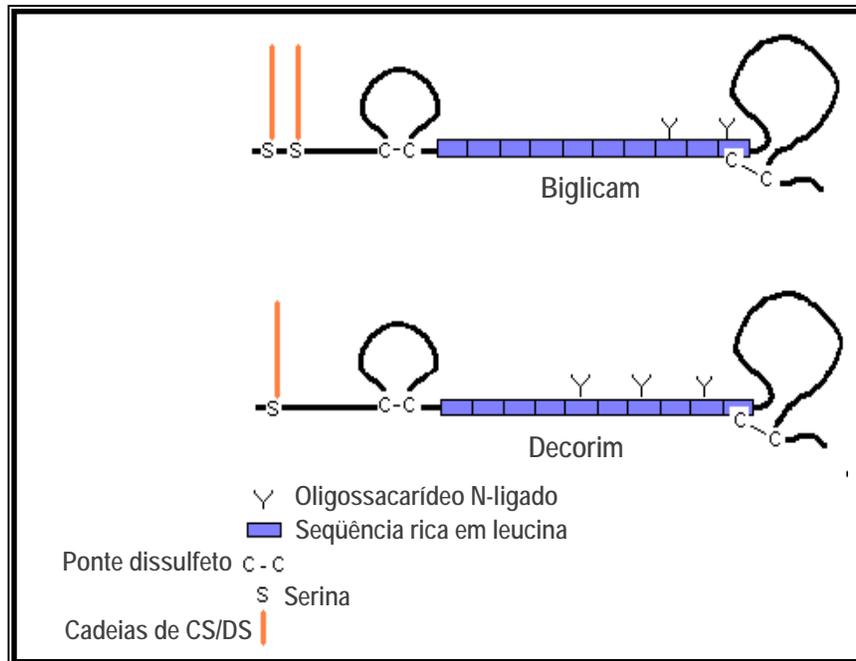


Figura 8 - Estrutura dos proteoglicanos de matriz intersticial de baixo peso molecular da família das proteínas ricas em leucina.

Dentre as atividades do decorim estão a regulação de colágeno na fibrogênese, modulação da atividade de fatores de crescimento e regulação do crescimento celular (Iozzo & Murdoch, 1996).

A expressão ectópica de decorim suprime a proliferação de células de carcinoma de cólon e de células neoplásicas derivadas do trato genitourinário, medula óssea, tecidos esquelético e cutâneo (Santra *et al.*, 1997).

David *et al.*, investigaram o caminho de transdução de sinal através do qual o decorim pode mediar a atividade supressora do crescimento. Estes pesquisadores descobriram que o decorim ativa o receptor de EGF em células de carcinoma escamoso e em várias linhagens transformadas. Esta sinalização foi mediada pelo *core* protéico do decorim e induzida pela ativação de MAP quinase e uma indução de p21 endógeno, levando a supressão do crescimento (David *et al.*, 1998).

Estes resultados propõem um mecanismo bioquímico, para a propriedade do decorim de supressão de crescimento. Também indicam que a superexpressão

do gene do decorim ao redor das células neoplásicas, podem representar um mecanismo de defesa do estroma tumoral, destinado a conter o balanço invasivo das células tumorais.

Os níveis de decorim são suprimidos na maioria das células transformadas (Coppock *et al.*, 1993), mas significativamente aumentados no estroma peritumoral em câncer de cólon (Adany *et al.*, 1990), representando uma resposta biológica natural das células estromais contra a invasão das células neoplásicas (Iozzo, 1997). Muitas das propriedades biológicas desses proteoglicanos de matriz, residem nas características estruturais específicas de suas cadeias de GAGs.

Entretanto, a expressão de decorim não ocorre da mesma forma em duas linhagens humanas diferentes e efeitos opostos de secreção de proteoglicanos podem ser observados (Breuer *et al.*, 1990). A expressão de decorim está diminuída em câncer ovariano (Nash *et al.*, 2002), entretanto, aumento da expressão é observado em outros tipos de câncer (Ladányi *et al.*, 2001; Theoharis *et al.*, 2002).

Alterações estruturais do decorim e do versicam podem influenciar a biologia das células em carcinoma de cólon. A grande substituição com CS e dissacarídeos 6-sulfatados de ambos PGs, no estroma de carcinoma de cólon, parece contribuir para o crescimento, proliferação e migração de células de câncer (Theoharis, 2000).

1.3.1.2. Versicam

Versicam pertence à família de proteoglicanos ligados ao hialurônico que incluem agrecam, neurocam e brevicam (Margolis & Margolis, 2004; Zimmermann, 2000). Estes proteoglicanos são componentes da matriz extracelular e são encontrados em um grande número de tecidos. Cada membro da família tem uma distribuição característica, o agrecam predomina em cartilagem, neurocam e brevicam no sistema nervoso central, e versicam está presente em uma variedade de tecidos conjuntivos.

O versicam foi primeiramente encontrado em fibroblasto de pulmão humano (Carlsted *et al.*, 1983) sendo também localizado em pele, cérebro, cartilagem e vasos sanguíneos. Possui cerca de 12 a 28 cadeias de GAG, que estão ligadas a uma proteína de 265 a 370kDa (Krusius, Gehlsen & Ruoslahti, 1987; Zimmerman & Ruoslahti, 1989).

A clonagem do gene em humano, camundongo, vaca e galinha revelou a existência de quatro *splices* variantes de versicam, os quais diferem no tamanho do *core* protéico e no número das cadeias de GAGs (Figura 9).

O amino terminal globular (G1) do versicam se liga ao ácido hialurônico, e o domínio carboxi terminal globular (G3), assemelha-se à família de proteínas selectinas, consistindo de uma lectina tipo-C adjacente a dois domínios (EGF) fator de crescimento epidermal e uma região de complemento regulatório (Figura 9). A região média do *core* protéico do versicam possui duas grandes regiões de éxons onde existem regiões de ligação ao condroitim sulfato. A apresentação do versicam, combinando a porção amino e carboxi-terminal com os GAGs aderidos a porção mediana do *core* protéico, revelam uma alta interatividade e versatilidade que é a base para o nome dado a esta importante macromolécula (Zimmermann & Ruoslahti, 1989).

As pesquisas realizadas desde o descobrimento do versicam têm revelado não apenas o papel estrutural e biomecânico desta macromolécula em uma variedade de tecidos, mas também o papel na biologia celular influenciando vários eventos celulares que formam a base para o desenvolvimento e doenças.

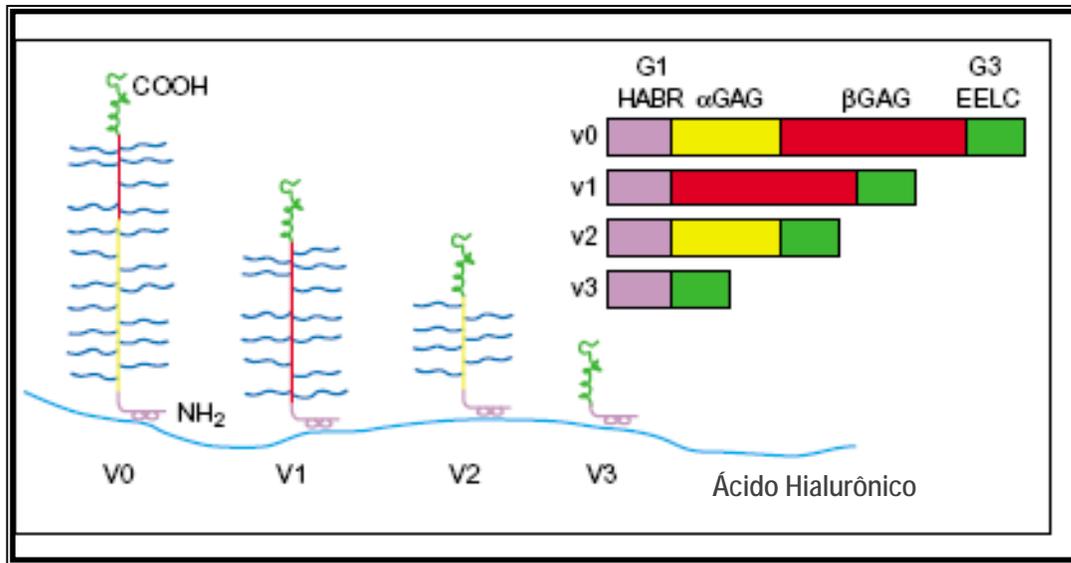


Figura 9 - Modelo de diferentes isoformas do proteoglicano versicam geradas por *splice* alternativo. Todas as isoformas interagem com o ácido hialurônico e são capazes de formar versicam de diferentes tamanhos. Diferentes cores denotam os domínios no gene e na proteína. *Rosa* = região de ligação ao hialurônico - hyaluronan binding region (HABR); *amarelo* = exon α GAG e a proteína; *vermelho* = exon β GAG e proteína; *verde* = dois EGF repetidos (EE), um domínio de ligação a lectina-C (LC) e uma região do complemento regulatório. As cadeias de glicosaminoglicanos são mostradas em *azul* (modificado de Wight, 2002).

A expressão fisiológica do versicam vem sendo demonstrada em vários tecidos adultos, incluindo músculo liso, cartilagem, sistema nervoso central e periférico, epitélio glandular, vasos sanguíneos e pele (Bode-Lesniewska, 1996).

A superexpressão do versicam foi relatada em vários tumores, assim como em carcinomas do trato gastrointestinal (Theocharis, 2003), mama (Ricciardelli, 2002; Brown *et al.* 1999), ovário (Voutilainen, 2003), próstata (Ricciardelli, 1998), e também em melanomas (Touab *et al.*, 2002), sarcomas (Isogai, 1996) e tumores de cérebro (Paulus *et al.*, 1996), sugerindo que o versicam está envolvido no desenvolvimento e progressão do câncer.

Versicam pode também acelerar proliferação celular, e acredita-se que o efeito estimulatório do crescimento, possa ser o resultado da desestabilização dos contatos de adesão focal da célula, o que reduz a adesão celular e promove o crescimento tumoral (Zhang *et al.*, 1998; Ang *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1999). Em

linhagens celulares epiteliais de tumor, a produção excessiva de versicam está associada à alta atividade mitótica *in vitro* (Gulyas & Hjerpe, 2003).

Aumento de expressão do mRNA para versicam vem sendo demonstrado em ambos, células de tumor e do estroma (Brown, 1999). A expressão de versicam ao redor do tumor é induzida, pelo menos em parte, por fatores secretados pelas células tumorais (Sakko *et al.*, 2001; 2003). Versicam é superexpresso no estroma de câncer ovariano e em muitos outros tipos de câncer (Voutilainen *et al.*, 2003).

Em geral, o aumento da expressão de versicam está sendo relacionado com comportamento mais agressivo em vários tumores malignos (Paulus *et al.*, 1996; Ricciardelli *et al.*, 1998, 2002; Voutilainen *et al.*, 2003).

1.3.2. Proteoglicanos de HS

Os proteoglicanos de heparam sulfato (PGHS) estão presentes na superfície celular e matriz extracelular de todos os tecidos dos animais com organização tissular (Yanagishita & Hascall, 1992; Iozzo & Murdoch, 1996; Iozzo, 1998; Bernfiel *et al.*, 1992; 1999). Os PGHS constituem uma classe de compostos com funções, estruturas e localizações extremamente variadas, estando presentes na superfície e na matriz extracelular de quase todos os organismos (figura 10).

As funções biológicas dos proteoglicanos de heparam sulfato são muito variadas e não existe um denominador comum. Muitas funções dos proteoglicanos de heparam sulfato dependem da interação com o esqueleto protéico enquanto que outras dependem das cadeias de açúcar. Por exemplo, proteoglicanos de heparam sulfato de membrana plasmática estão envolvidos em mecanismos de adesão e motilidade celular (Kreuger *et al.*, 2006; Alexopoulou, Multhaupt & Couchman, 2006).

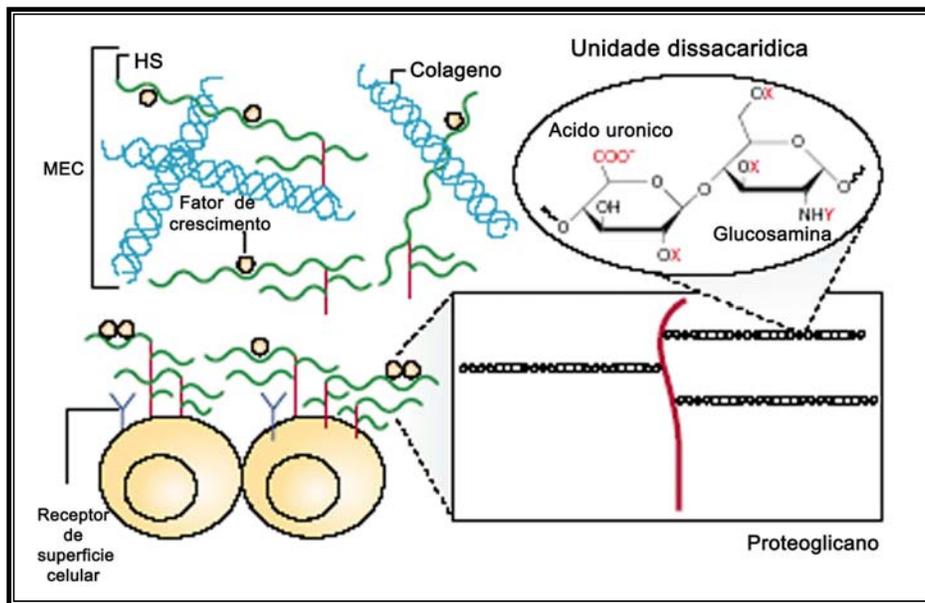


Figura 10 - Ocorrência do heparam sulfato. O heparam sulfato (HS; linhas verdes) é encontrado na superfície celular e também na matriz extracelular (MEC), onde estão ligados à proteína, formando os proteoglicanos (modificado de Sasisekharan *et al.*, 2002)

Entre outras funções fisiológicas os proteoglicanos de heparam sulfato: modulam o metabolismo nutricional (Reizes *et al.*, 2001; Strader *et al.*, 2004; Zcharia *et al.*, 2004; Mahley & Ji, 1999; MacArthur *et al.*, 2007; Fuki *et al.*, 1997); organizam barreiras na membrana basal (Iozzo 2005; Raats, Van der Vorn & Berden, 2000; Kanwar, Linker & Farquhar, 1980; Utriainen *et al.*, 2004; Gautam *et al.*, 1996; Bode *et al.*, 2005); participam da sinalização celular na morfogênese (Kronenberg, 2003; Koziel *et al.*, 2004; Lander, Nie & Wan, 2002; Arikawa-Hirasawa *et al.*, 2001; Stickens *et al.*, 2005; Hovey, Trott & Vonderhaar, 2002; Liu *et al.*, 2004); participam no processo de injúria e reparo (Wang, *et al.*, 2005; Abrink, Grujic & Pejler, 2004; Humphries *et al.*, 1999; Forsberg *et al.*, 1999; Grujic *et al.*, 2005; Zernichow *et al.*, 2006; Sher, *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2004; Echtermeyer *et al.*, 2001; Stepp *et al.*, 2002; Kainulainen *et al.*, 1998; Midwood *et al.*, 2004; Cool & Nurcombe 2006; Cornelison *et al.*, 2004) e participam no processo de comunicação celular (Gautam, *et al.*, 1999; Jenniskens, *et al.*, 2003; Mook-Jung & Gordon, 1995; McDonnell & Grow, 2004; Kramer & Yost, 2002; Jakobsson *et al.*, 2006).

Os exemplos acima mostram o papel dos proteoglicanos de heparan sulfato na fisiologia, porém em certas condições esses proteoglicanos também contribuem para fisiopatologia. Por exemplo, no câncer, ocorre a sinalização dependente de fatores de crescimento mediada por proteoglicanos de heparan sulfato, facilitando o crescimento de tumores primários e angiogênese. Os proteoglicanos de heparan sulfato em tecidos tumorais diferem na sua composição podendo afetar a eficiência de fatores de crescimento estimulando a proliferação de células tumorais (Fuster & Esko, 2005).

Existem evidências que mostram que o heparan sulfato exhibe padrões seletivos de interação com diversos constituintes da matriz extracelular e da membrana celular, tais como colágenos, fibronectina, laminina, sendo que algumas dessas interações são específicas para determinados tipos celulares (Del Rosso *et al.*, 1981; Fransson, 1989; Fujiwara *et al.*, 1984; Gallagher & Lyon, 1989; Gold, Frangione & Pearlstein, 1983; Koda & Bernfield, 1984; Laterra, Ansbacher & Culp, 1980; Sakashita, Engvall & Ruoslahti, 1980; Stamatoglou & Keller, 1982; Woodley *et al.*, 1983; Yamada *et al.*, 1980, Couchman, Chen & Woods, 2001; Kirkpatrick *et al.*, 2006).

Os proteoglicanos glipicam e sindecam correspondem à grande parte do heparan sulfato presente na superfície celular. O glipicam interage com a membrana celular via âncoras de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) (Bernfield *et al.*, 1999). Outro proteoglicano de heparan sulfato encontrado na membrana basal pertence à família do perlecan. Os sindecans encontram-se associados à membrana celular por intermédio de um esqueleto protéico transmembrânico tipo I (Lander & Selleck, 2000; Kjellen & Lindahl, 1991) altamente conservado que é expresso em um padrão dependente do estágio de desenvolvimento e do tipo celular (Dietrich *et al.*, 1983, 1998; Bernfield *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 1994).

1.3.2.1. Família dos Sindecans

O termo sindecam vem da palavra francesa *syndein*, originada da palavra grega *syndetikos*, que significa ligar, conectar. Assim, o sindecam serviria como ponte para ligar os componentes da matriz extracelular a actina do citoesqueleto (Saunders *et al.*, 1989).

Existem quatro tipos de sindecans em mamíferos, cuja síntese é regulada durante o desenvolvimento e são tecido-específicos (Bernfield *et al.*, 1992, 1993; Couchman e Woods, 1993; David *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 1994; Carey, 1997). A composição dos GAGs ligados ao sindecam podem variar extensivamente (número e tamanho das cadeias). Um esquema da estrutura dos sindecans é mostrado na figura 11.

Em geral, sindecam-1 (Saunders *et al.*, 1989) é o sindecam primário das células epiteliais, sindecam-2 (também chamado de fibroglicam; David, 1992; Pierce *et al.*, 1992) é o principal tipo nos fibroblastos, e sindecam-3 (N-sindecam; Carey *et al.*, 1992) predomina nas células neuronais. No entanto, durante o desenvolvimento, ocorrem fluxos de expressão de sindecam.

O sindecam-4 (anfiglican ou riudocan; David *et al.*, 1992; Kojima *et al.*, 1992; Baciú e Goetinck, 1994) foi inicialmente isolado de aorta de coelho (Castillo *et al.*, 1987) e posteriormente detectado em outros tipos celulares. Localiza-se especificamente em pontos de interações célula-matriz altamente organizadas conhecidas como adesões focais (Woods & Couchman, 1994). Esse tipo de adesão é independente do tipo de matriz a qual as células estão aderidas e, portanto difere da situação envolvendo as integrinas, onde integrinas específicas estão concentradas em adesão dependente do tipo de substrato. Sindecam-4 localiza-se na superfície celular e seu domínio citoplasmático interage com PKC- α , ativando-a *in vitro*. *In vivo*, sindecam-4 também interage com PKC- α e essa interação regula a localização do PKC- α no citoesqueleto, resultando na manutenção da sua atividade (Lopes, Dietrich & Nader, 2006).

A família dos sindecans caracteriza-se por apresentar um domínio citoplasmático e um domínio transmembrânico bem conservados, e uma região

extracelular que varia entre os diferentes sindecans. As cadeias de heparam sulfato estão localizadas próximas à região N-terminal. Embora os sindecans sejam proteoglicanos de heparam sulfato, já foram descritos sindecans híbridos contendo cadeias de condroitim sulfato localizados na região do esqueleto protéico próximo à membrana plasmática (Carey, 1997; Bernfield, *et al.*, 1999).

Os esqueletos protéicos dos quatro tipos de sindecam são formados a partir de quatro genes distintos. Os dados obtidos sobre a seqüência do sindecam em *Drosophila*, bem como sua localização cromossomal e exons, sugerem que essa família emergiu de um gene ancestral comum, que por meio de duplicações e evoluções divergentes, deu origem aos quatro tipos de sindecam encontrados. Cada produto gênico é a proteína transmembrânica do tipo I, com um domínio extracelular de tamanho variado, que contém as cadeias de heparam sulfato ligadas covalentemente (Bernfield *et al.*, 1999). O esqueleto protéico não contém resíduos de cisteína e apresentam pequenas, porém importantes, semelhanças estruturais entre si (figura 11).

Na junção do domínio extracelular com a porção transmembrânica a presença de aminoácidos básicos susceptíveis à ação de proteases possibilita que, através de clivagem proteolítica, os sindecans sejam liberados da superfície celular (Kim *et al.*, 1994; Lidholt, Kjellen & Lindahl, 1989; Kjellen & Lindahl, 1991; Bernfield *et al.*, 1992; 1999). A porção transmembrânica e o pequeno domínio citoplasmático da proteína são muito conservados, incluindo a conservação de quatro resíduos de tirosina, um na junção da porção transmembrânica com o domínio citoplasmático e três no domínio citoplasmático (Bernfield *et al.*, 1999).

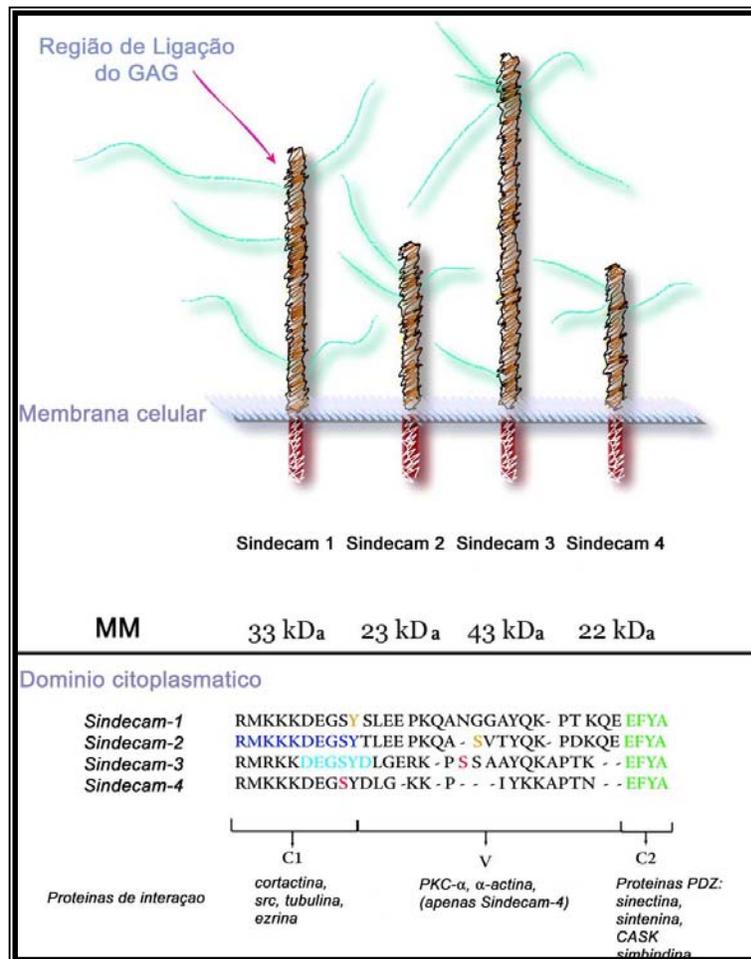


Figura 11. Caracterização dos domínios transmembrana e citoplasmáticos dos sindecans. A região extracelular mostra o core protéico (em marrom) e as regiões de ligação dos glicosaminoglicanos (verde) dos sindecans. A região citoplasmática do core protéico está representada em vermelho. MM = massa molecular (modificado de Tkachenko, 2005).

Foram identificadas uma variedade de moléculas que interagem com os domínios altamente conservados dos sindecans: sintetina, CASK, sinectina que se ligam ao carboxi terminal EFYA presente em todos os sindecans, ao passo que sindeosomes se ligam a membrana proximal e a regiões variáveis (Baciu *et al.*, 2000; Ethell *et al.*, 2000) (Figuras 11 e 12).

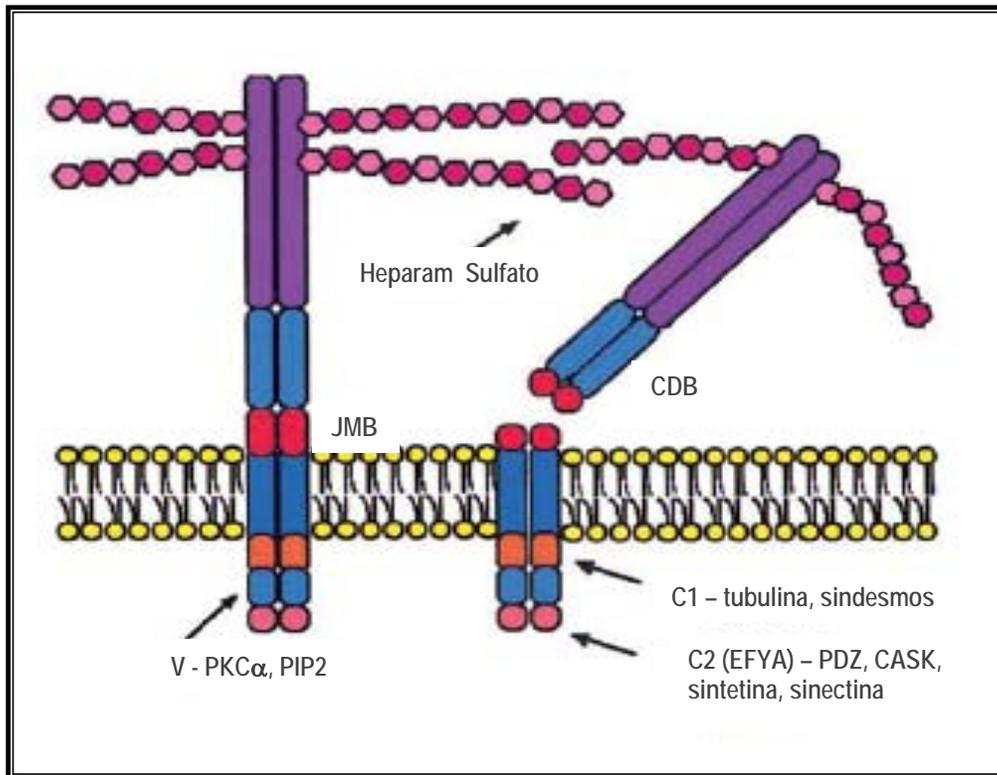


Figura 12. Os sindecans são caracterizados por domínios transmembrana e citoplasmáticos altamente conservados. Os domínios citoplasmáticos podem ser fosforilados e contêm duas regiões constantes (C1, C2) as quais são separadas pela região variável (V). Estas regiões são conhecidas por se ligarem a uma variedade de ligantes extracelulares, incluindo quinases e proteínas estruturais (Bernfield *et al.*, 1992, 1999). Os ectodomínios dos sindecans podem ser clivados em um sítio próximo a membrana plasmática no domínio justamembrana (juxtamembrane domain JMD), formando assim uma molécula efetora solúvel. Um domínio de ligação celular (cell binding domain CBD) do domínio extracelular foi descrito para sindecam-4. As cadeias de heparan sulfato dos sindecans são aderidas a sítios conservados de ligação de GAGs na porção final dos ectodomínios. Os sindecans são mostrados na forma dimérica (Modificado de Götte, 2003).

Os sindecans desempenham um grande papel como receptores de matriz e superfície celular, co-receptores para fatores de sinalização, internalização de receptores e efetores parácrinos solúveis (Bernfield *et al.*, 1992).

Como co-receptores, os sindecans aumentam a concentração local de fatores de crescimento e promovem a dimerização do receptor (Bernfield *et al.*, 1999). A cauda citoplasmática do sindecam-4 se liga a fosfatidilinositol 4,5-

bisfosfato (PIP2) e ativa proteína quinase C α (PKC α). Fator de crescimento de hepatócito (HGF) se liga a sindecam-1 promovendo ativação das vias PI3-quinase e MAP-quinase (Derksen *et al.*, 2002) (Figura 12).

Os domínios citoplasmáticos dos sindecans participam da sinalização e interação com o citoesqueleto de actina, as funções dos domínios citoplasmáticos podem ser atribuídas mais às cadeias de HS do que ao *core* protéico (Kreuger, *et al.*, 2006; Alexopoulou, Multhaupt & Couchman, 2006).

Os sindecans são capazes de interagir com uma série de ligantes pelas cadeias de heparam sulfato. Entre esses ligantes estão os componentes da matriz extracelular (colágeno tipos I, III e V; fibronectina, trombospondina, tenascina), e os fatores de crescimento (FGF, EGF, PDGF e VEGF).

Os membros da família dos sindecans estão envolvidos em importantes funções celulares, incluindo proliferação celular, adesão célula-matriz e adesão célula-célula (Dietrich *et al.*, 1977; Dietrich, 1984; Carey, 1997; Woods & Couchman, 1998; Bernfield *et al.*, 1999; Porcionatto, Nader e Dietrich, 1999; Oh, Woods & Couchman, 1997; Park, Reizes & Bernfield, 2000; Rapraeger, 1995).

1.4. Fatores de Crescimento e Proteoglicanos

O conceito de que fatores de crescimento atuam como reguladores autócrinos e parácrinos do crescimento e diferenciação celular foi introduzido na década de 80 (Sporn & Todaro, 1980). Desde então, significantes avanços vêm sendo realizados para o entendimento da regulação da expressão dos fatores de crescimento e suas interações.

Estudos recentes evidenciam que a maioria dos fatores de crescimento não difundem de seus sítios de liberação simples e passivamente, para interagir com o receptor de superfície celular mais próximo. Ao invés disso, muitas dessas proteínas, contêm características estruturais que auxiliam suas interações com moléculas dentro do ambiente extracelular. Então, a especificidade da sinalização dos fatores de crescimento, se deve não somente a ligação aos receptores de superfície celular, mas também ocorre através da interação com outros componentes do ambiente extracelular (Flaumenhaft & Rifkin, 1992).

Sendo assim, um fator solúvel pode interagir com uma variedade de outras moléculas no ambiente extracelular, além de seu receptor de superfície celular. Para a maioria dos fatores de crescimento as moléculas de ligação extracelulares mais abundantes são componentes da matriz extracelular (Ruoslahti & Yamaguchi, 1991).

Alguns fatores de crescimento se ligam a componentes da matriz, incluindo os proteoglicanos, dentre eles podemos citar o fator de crescimento de fibroblasto (FGF), fator de crescimento transformante- β (TGF- β), fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF) e fator de crescimento de hepatócito (HGF).

A maioria dos fatores de crescimento se liga às cadeias de glicosaminoglicanos (Modrowski *et al.*, 2000). Os proteoglicanos são importantes mediadores da ligação a fatores de crescimento e estão associados à modulação da atividade de uma variedade destes fatores através da interação, tanto via cadeias de glicosaminoglicanos, bem como, com o *core* protéico (Ruoslahti, 1989; Ruoslahti & Yamaguchi, 1991).

Uma das funções chaves da matriz extracelular é o armazenamento e apresentação dos fatores de crescimento para célula. As interações fator de crescimento-matriz podem alterar o potencial do fator de crescimento, retendo-os na forma ativa ou inativa, nas proximidades da célula e modificando suas propriedades de difusão, aumentando sua estabilidade, e protegendo-o da degradação proteolítica.

A capacidade da matriz extracelular de funcionar como um reservatório e liberar lentamente fatores de crescimento pode ser exemplificada com o fator de crescimento de fibroblasto (FGF). A liberação deste fator de crescimento, em especial, explica como uma molécula liberada em um curto período de tempo pode estimular processos como a angiogênese, que leva dias ou semanas (Flaumenhaft *et al.*, 1989). Esta retenção de FGF na matriz permite a estimulação de células alvo por longo tempo, após breve exposição ao fator de crescimento (Flaumenhaft *et al.*, 1989).

A ligação do FGF aos proteoglicanos de heparam sulfato, protege este fator de crescimento da degradação proteolítica, criando um reservatório de fator de crescimento-matriz ligado (Saksela *et al.*, 1988; Gospodarowicz *et al.*, 1990). O fator de crescimento pode ser liberado em sua forma ativa deste reservatório, pela proteólise parcial do *core* protéico do proteoglicano ou através da degradação do heparam (Ishai-Michaeli *et al.*, 1990).

Outro fator de crescimento que pode interagir com PGHS na matriz extracelular é o PDGF (Raines & Ross, 1992). PDGF pode estar associado à célula ou ser secretado (Betsholtz *et al.*, 1986; Raines & Ross, 1992). Proteólise da seqüência de retenção do PDGF *in vitro*, libera este fator de crescimento para no meio condicionado, isso ocorre, provavelmente devido à inibição do processo proteolítico que previne a liberação do PDGF no meio de cultura (LaRochelle *et al.*, 1991).

A ligação do fator de crescimento transformante- β (TGF- β) a proteoglicanos representa um tipo diferente de interação fator de crescimento-proteoglicano. Foi demonstrado que o TGF- β se liga ao *core* protéico de até dois proteoglicanos. Um destes é o receptor de TGF- β tipo III ou betaglicam (Segarini & Seyedin, 1988). Betaglicam é um proteoglicano de membrana celular (López-Casillas *et al.*, 1991) o qual aparentemente não está envolvido na transdução de sinal por TGF- β , mas pode funcionar como um reservatório de TGF- β de superfície celular, entregando este fator de crescimento para os receptores de transdução de sinal (Andres *et al.*, 1989).

O segundo tipo de proteoglicano ligado a TGF- β é o decorim, que pode interagir com o TGF- β via *core* protéico (Yamaguchi *et al.*, 1990). Decorim, como já foi dito anteriormente, é o protótipo do grupo de PG caracterizado por um *core* protéico de aproximadamente 40 kDa, o qual consiste principalmente de repetições ricas em leucina de 20-24 aminoácidos (Patthy, 1987).

Não distante, quatro membros deste grupo de PG, estão também associados ao TGF- β ; além do decorim, temos o biglicam (Fisher *et al.*, 1989), o fibromodulim (Oldberg *et al.*, 1989) e o lumicam (Blochberger *et al.*, 1992).

1.5. Carcinogênese e Estroma

Carcinogênese é um processo multifuncional, acompanhado de alterações genéticas de células pré-cancerosas e pela simultânea construção do microambiente tumoral (Schedin & Elias, 2004).

Células de câncer *in vivo* e linhagens tumorais *in vitro*, produzem múltiplos fatores de crescimento que podem atuar nas células do estroma, ao redor do tumor (mecanismo parácrino) e/ou nas próprias células tumorais (mecanismo autócrino) (Heldin & Westermarck, 1984). Evidências clínicas e experimentais têm avaliado a importância das interações entre as células de câncer e o estroma ao redor, sugerindo que este seja um facilitador da progressão tumoral (Condon, 2005; Mueller & Fusenig, 2004).

Um dos componentes no estroma intratumoral é a sub-população de fibroblastos. Estes fibroblastos ativados, muitas vezes denominados fibroblastos tumor-associados, são capazes de modular o microambiente durante o desenvolvimento e progressão tumoral (Desmoulière *et al.*, 2004).

Uma contribuição específica de fibroblastos tumor-associados é o fornecimento de uma variedade de citocinas, fatores de crescimento e enzimas de remodelamento tecidual, todos os quais facilitam a invasão celular e angiogênese tumoral (Dong *et al.*, 2004; Orimo *et al.*, 2005). Além disso, eles sintetizam muitos dos constituintes da matriz extracelular do estroma e fornecem suporte para facilitar a penetração das células endoteliais, levando a neovascularização (Kalluri & Zeisberg, 2006).

Vários trabalhos sugerem que o acúmulo de ácido hialurônico (AH) no estroma tumoral, estimula o crescimento, sobrevivência, invasão, e metástase de células de câncer (Kosaki *et al.*, 1999; Itano *et al.*, 1999; Li & Heldin, 2001; Liu *et al.*, 2001; Simpson *et al.*, 2002; Ghatak *et al.*, 2002).

Um estudo realizado por Koyama *et al.*, demonstrou o crítico papel do AH na formação do estroma intratumoral e na aceleração da angiogênese tumoral através da reação estromal. Estes pesquisadores também demonstraram o possível envolvimento dos agregados AH-versicam, na promoção do recrutamento de células do estroma (Koyama *et al.* 2007).

A transição epitélio-mesenquimal (TEM) é um evento crítico na diferenciação, que permite a migração das células mesenquimais, invasão para o ambiente tecidual local e ainda o extravasamento para a vasculatura durante a metástase. A TEM ocorre graças à destruição do epitélio e criação de células migratórias na camada mesenquimal, processo que requer a desorganização da adesão célula-célula, da adesão célula-matriz, e degradação da matriz extracelular associada à camada epitelial (figura 13).

A TEM é controlada por vários caminhos da sinalização celular, sendo utilizada em muitas instâncias durante o desenvolvimento normal, mas também durante doenças, incluindo invasão tumoral (Thiery, 2003; Zeisberg & Kalluri, 2004; Hay, 2005; Huber *et al.*, 2005).

Atualmente, sabe-se que um complexo conjunto de mecanismos celulares afeta o carcinoma propriamente dito, bem como a matriz extracelular associada, células do estroma ao redor do tumor (incluindo fibroblastos câncer-associados e células imunes) e finalmente células do sistema vascular. Envolvido neste processo temos o TGF- β , com seu papel pro-tumorigênico.

Sistemas de cultura *in vitro*, forneceram as primeiras evidências que TGF- β 1 pode induzir processos relacionados a transição epitélio-mesenquimal. Atualmente, muitos estudos têm descrito esta generalizada resposta epitelial em mamíferos, em células epiteliais normais imortalizadas e de cultura primária e em células tumorais originárias de pulmão, mama, rim, cólon, pâncreas, tireóide, pele e fígado (Kowanetz *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2005; Danielpour, 1999; Ellenrieder *et al.*, 2001; Zavadil *et al.*, 2001).

A resposta a TGF- β 1 na transição epitélio-mesenquimal é caracterizada pela *downregulation* de marcadores epiteliais, como E-caderinas, queratinas específicas e pela *upregulation* de marcadores mesenquimais, como fibronectina, α -actina de músculo liso e vimentina (Valcourt *et al.*, 2005; Piek *et al.*, 1999).

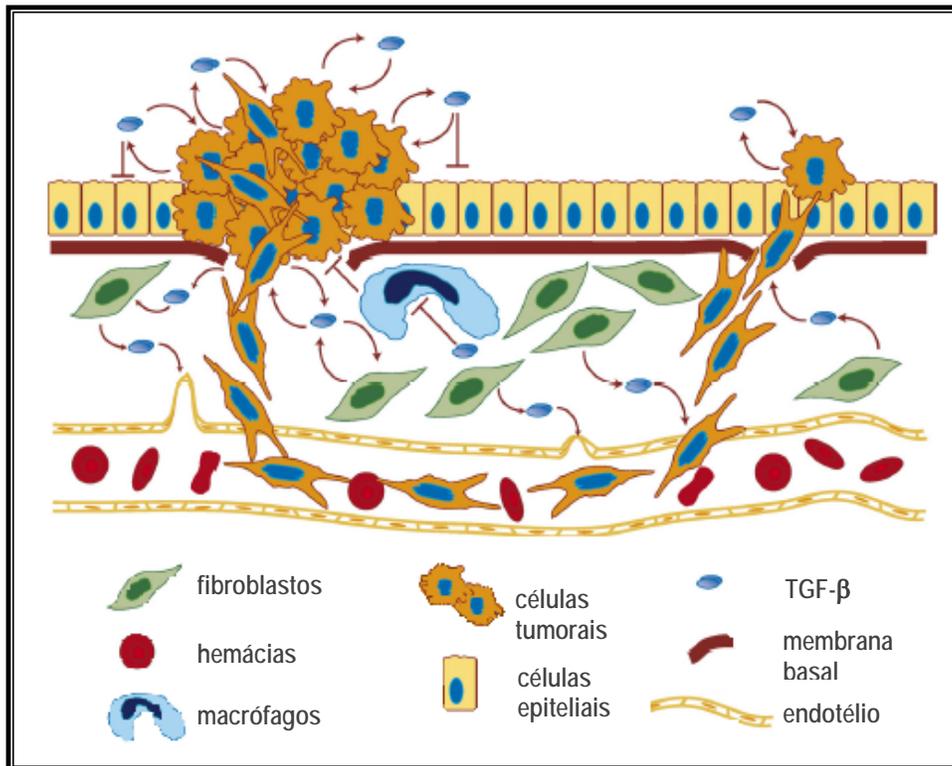


Figura 13 - TGF- β age durante a progressão do carcinoma. O epitélio normal é rompido pelo crescimento do tumor primário, criando uma massa de células que perdem o controle, superproliferando e algumas das quais iniciam a diferenciação tornando-se migratórias e invasivas, degradando então, a membrana basal. As células tumorais invasivas atravessam o estroma tumoral que é rico em fibroblastos tumor-associados e células imunes (ex. macrófagos), e finalmente extravasam para os vasos sanguíneos vizinhos. Células metastáticas de tumor circulam na corrente sanguínea e extravasam em locais distantes, estabelecendo novos locais de metástase sobre uma nova camada epitelial. TGF- β é produzido pelas células do tumor primário e atua sobre as mesmas células de carcinoma (sinalização autócrina) ou sobre os fibroblastos (sinalização parácrina). TGF- β também é produzido pelos fibroblastos atuando sobre as células tumorais e endoteliais (modificado de Pardali & Moustakas, 2007).

Estudos das interações entre o estroma e as células tumorais podem fornecer importantes subsídios para o desenvolvimento de drogas anti-câncer. Além disso, a biotecnologia moderna e a indústria farmacêutica iniciaram a investigação de fármacos baseados em carboidratos (Gornik *et al.*, 2006). Desta forma, os proteoglicanos envolvidos na relação estroma-câncer, podem futuramente se transformar em alvos potenciais para intervenções terapêuticas.

Objetivos

2. OBJETIVOS

I. Objetivos Gerais:

Analisar a síntese de glicosaminoglicanos sulfatados na linhagem de adenocarcinoma colorretal humano (Caco-2) durante a interação com fibroblastos. Avaliar a influência desta interação “estroma-câncer” na expressão de proteoglicanos e na proliferação celular.

Comparar a síntese e estrutura de glicosaminoglicanos e proteoglicanos da linhagem Caco-2, com uma linhagem de maior potencial metastático (HCT116).

II. Objetivos Específicos:

1. Verificar o efeito do meio condicionado das células Caco-2 sobre os fibroblastos humanos e vice-versa e a interação parácrina entre estas linhagens, utilizando o sistema *Transwell* de co-cultura, sobre a síntese de glicosaminoglicanos;
2. Analisar a expressão gênica de proteoglicanos de superfície e de matriz extracelular envolvidos nesta interação parácrina;
3. Avaliar os efeitos do TGF- β 1 exógeno sobre a síntese de GAGs em ambas as linhagens celulares;
4. Comparar a síntese de glicosaminoglicanos e a composição dos dissacarídeos sulfatados, das linhagens Caco-2 e HCT116 com diferentes potenciais metastáticos, utilizando como controle uma linhagem de epitélio intestinal normal (IEC-6);
5. Verificar a expressão gênica de proteoglicanos de superfície celular e matriz extracelular e de sulfotransferases envolvidas na biossíntese do heparam e do condroitim sulfato, nas linhagens de câncer colorretal.

Material e Métodos

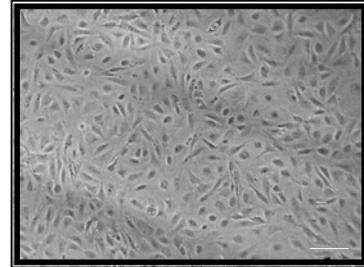
3. MATERIAL

3.1. Linhagens celulares

Para os estudos realizados no presente trabalho, foram utilizadas:

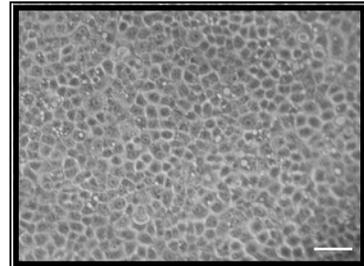
- **Linhagem IEC-6**

ATCC[®] número: CRL-1592[™]
Organismo: *Rattus norvegicus* (rato)
Morfologia: epitelial
Órgão: intestino delgado
Tecido: epitélio
Doença: normal



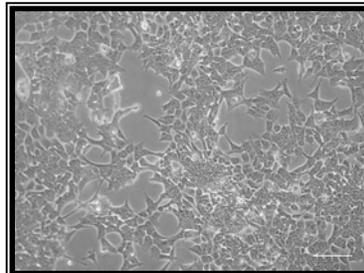
- **Linhagem Caco-2**

ATCC[®] número: HTB-37[™]
Organismo: *Homo sapiens* (humano)
Morfologia: epitelial
Órgão: colon
Doença: adenocarcinoma colorretal



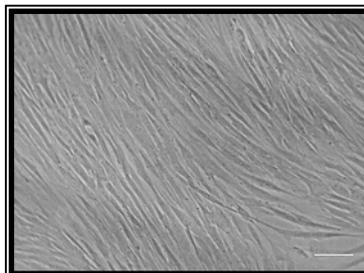
- **Linhagem HCT-116**

ATCC[®] número: CCL-247[™]
Organismo: *Homo sapiens* (humano)
Morfologia: epitelial
Órgão: colon
Doença: carcinoma colorretal



- **Fibroblastos**

Cultura primária
Organismo: *Homo sapiens* (humano)
Morfologia: fibroblastos
Origem: líquido amniótico
Doença: normal



Barra = 100µm

3.2. Meios de cultura, tampões e soluções

Para o cultivo das linhagens IEC, Caco-2 e fibroblastos, foram utilizados:

- Meio de cultura DMEM - Mistura de nutriente, com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio (Gibco Life Technologies, Rockville, MD, EUA). O meio DMEM foi acrescido de 3,7g/l de bicarbonato de sódio e 2,6 g/l de HEPES;
- Penicilina/Estreptomicina - liofilizada em pó, sendo respectivamente 10.000U e 10mg/mL, em solução de cloreto de sódio 0,9% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA);
- 10% soro fetal bovino (SFB) (Cultilab Mat Cult Cel Ltda - Campinas/SP).

Para o cultivo da linhagem HCT-116 foram utilizados:

- Meio de cultura RPMI - Mistura de nutriente, com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EUA). O meio RPMI foi acrescido de 2,4g/l de bicarbonato de sódio e 2,6 g/l de HEPES;
- Penicilina/Estreptomicina - liofilizada em pó, sendo respectivamente 10.000U e 10mg/mL, em solução de cloreto de sódio 0,9% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA);
- 10% de soro fetal bovino (Cultilab Mat Cult Cel Ltda - Campinas/SP)

Outras soluções utilizadas para o cultivo das células

- Solução EBSS (solução salina balanceada de Earle sem cálcio e sem magnésio) preparada em nosso laboratório, contendo NaCl 116mM; KCl 5mM; Na₂HPO₄ 8mM; KH₂PO₄ 1,46mM; NaH₂PO₄.1H₂O 1mM; NaHCO₃ 8mM (todos da Merck, Darmstadt, Alemanha); D-glucose 1% e vermelho de fenol 0,01% (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EUA) em um litro de água destilada, previamente passada em sistema Milli-Q (Millipore, MA, EUA);
- PBS "phosphate buffered saline" 0,1M preparado em nosso laboratório, utilizando NaCl 137mM; Na₂HPO₄ 15,22mM, KH₂PO₄ 1,5mM e KCl 2,7mM em água filtrada em sistema MilliQ, e o pH foi ajustado para 7,4;

- Azul de Trypan (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA).

3.3. Enzimas

- Heparinase, heparitinasas I e II foram purificadas do extrato bruto de *Flavobacterium heparinum* induzida por heparina conforme descrito por Nader e col. (1990);
- Condroitinase AC e ABC obtida de *Proteus vulgaris* (Sigma Chemical Co., St. Luis, MO, EUA);
- Maxatase - protease alcalina P126 (Biocon do Brasil Indústria Ltda - RJ, Brasil);
- Solução Tripsina/EDTA em PBS - 0,2% de tripsina , 0,02 % de EDTA e vermelho de fenol (Cultilab Mat Cult Cel Ltda - Campinas/SP)

3.4. Radioisótopos

- [³⁵S]-sulfato de sódio livre de carregador do Laboratório de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN, São Paulo, SP, Brasil) - Registro da Comissão de Energia Nuclear processo nº 104.695/70 (matrícula 12679) - validade: 31/05/2010. Número de registro HBN AP- 0842.

3.5. Anticorpos e marcadores fluorescentes

3.5.1. Anticorpo primário

- Anticorpo monoclonal IgG anti-versicam humano (large PG - 270428) produzido em camundongo, reconhece o domínio G3 da porção C-terminal da proteína humana (Seikagaku corporation, Japan).

3.5.2. Anticorpo secundário

- Anticorpo anti-IgG de camundongo produzido em cabra, conjugado com Alexa Fluor 594 (Molecular Probes, EUA).

3.5.3. Marcadores Fluorescentes

- Faloidina - toxina produzida pelo cogumelo *Amanita faloides*, que liga-se especificamente aos filamentos de actina (F-actina). Faloidina conjugada com Alexa Fluor 488 (Molecular Probes Eugene, OR, EUA).
- DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindole, dihidrocloride) - para visualização dos núcleos celulares (Molecular Probes Eugene, OR, EUA);

3.6. Corantes

3.6.1. Coomassie Brilliant Blue G

Foi utilizado para a quantificação de proteínas em solução (Spector, 1978). O reagente foi preparado em nosso laboratório, Coomassie Brilliant Blue G 117 μ M (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), etanol 4,8% e ácido fosfórico 8,5% (Merck, Darmstadt, Alemanha) diluídos em água destilada.

3.6.2. Azul de Toluidina

Os glicosaminoglicanos corados com azul de toluidina apresentam metacromasia, que resulta na mudança da cor azul do corante, para roxo (Jaques *et al.*, 1968). Desta forma, para a coloração dos GAGs após a eletroforese em gel de agarose, foi utilizada uma solução com azul de toluidina 0,1% (Fisher Scientific Co., Fair Lawn, NY, EUA), etanol 50% e ácido acético 1% diluídos em água destilada, o excesso de corante foi removido pela mesma solução, sem o corante.

3.7. Glicosaminoglicanos padrões

- Heparan sulfato purificado de pulmão bovino como descrito por Dietrich e Nader (1974);
- Condroitim 4-sulfato e condroitim 6-sulfato, extraídos respectivamente de cartilagem de baleia e de tubarão (Seikagaku, Kogyo Co, Tóquio, Japão);

- Dermatam sulfato, extraído de mucosa intestinal bovina (Opocrin Laboratories, Modena, Itália).

3.8. Outros materiais

- Agarose (BioRad Laboratories, Inc. Richmond, CA, EUA);
- Albumina sérica bovina (BSA) Fração V (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EUA);
- Brometo de cetiltrimetilamônio (CETAVLON) (Merck Darmstadt, Alemanha);
- Câmara de Neubauer (Abbott);
- EDTA - Etilenodiamino tetracetato (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EUA);
- Etanol absoluto (Merck Darmstadt, Alemanha);
- Filtro para 500mL com membrana de acetato de celulose 0,22 μ m, Modelo 25942, da (Corning Laboratory Sciences Co., NY, EUA);
- Filtros para 150mL com membrana de acetato de celulose de 0,22 μ m, modelo Sterifil D-6S (Milipore Corp., Bedford, MA, EUA);
- Formaldeído 20% em ampola (Electron Microscopy Science Ft. Washington, PA, EUA);
- Garrafas de cultura, 150cm² da (Corning Laboratory Sciences Co., NY, EUA);
- Glicina (Merck Darmstadt, Alemanha);
- Insulina extraída de pâncreas bovino (100mg em pó) Sigma;
- Lâmina histológica White glass, especial para microscopia (Knittel Glaser Alemanha);
- Lamínulas para cultivo de células com 12mm de diâmetro (Glastécnica, São Paulo, SP, Brasil);
- Líquido de cintilação: Ultima Gold (Packard Instruments Company Inc. Downers Grove, IL, EUA);

- Meio de montagem aquoso Fluoromount-G (Electro Microscopy Sciences, Ft. Washington, PA, EUA);
- Membrana de diálise Spectrapor com poro de 6000 a 8000 kDa (Spectrum Medical Industries, Houston, TX, EUA);
- Papéis Whatman nº 1 e 3MM (W & R Balston Ltda, Inglaterra);
- Placas de cultura, “multiwell” de 6, 24 e de 96 poços (Nalge Nunc International Corporation Naperville, IL, EUA);
- Placas para cultura de poliestireno de 35x10mm e 60x10mm (Falcon, New Jersey, EUA);
- TGF- β 1 Humano Recombinante (R&D Systems, Inc. Minneapolis, MN), amostra liofilizada de TGF- β 1 (2 μ g) reconstituída com 4 mM HCl estéril contendo 1 mg/ml de BSA para uma concentração final de 2 μ g/ml. Alíquotas de 200 μ l foram estocadas a -70°C;
- Transwell[®] placa de 6 poços, contendo 6 insertos com membrana de policarbonato de 24mm com poros de 0,4 μ m (Costar Corning Incorporated, NY, EUA);
- Saponina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA);
- Tubos para centrifuga de 15 ou 50mL estéreis (Corning Laboratory Sciences Co., NY, EUA);
- Unidade filtrante para seringa com membrana de acetato de celulose 0,22 μ m (Millipore Corporation, Bedford, MA, EUA);
- Uréia ultrapura (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA);

3.9. Aparelhos

Além dos aparelhos usuais de laboratório foram utilizados:

- Agitadores: Vortex-Genie 2 modelo G250 (Scientific Industries Bohemia, NY, EUA) e Corning Stirring Plate (Corning, NY, EUA);
- Autoclave vertical e horizontal (Soc. FABBE Ltda, São Paulo, SP, Brasil);
- Banhos de temperatura constante (FANEM Ltda., São Paulo, SP, Brasil);
- Câmaras para eletroforese em gel de agarose, modelo desenvolvido por

- Jaques e col. (1968), manufaturado pela (Técnica Permatron Ltda São Paulo, SP, Brasil);
- Centrífuga de eppendorf modelo 5415C (W Brinkman Instruments, Inc. estbury, NY, EUA);
 - Cyclone™ Sistema de estoque de fósforo (Packard Instrument Company Meriden, CT, EUA), com software OptiQuant™, para análise de imagem;
 - Contador de cintilação TRI-CARB 2100TR (Packard Meriden, CT. EUA);
 - Espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, EUA);
 - Espectrofotômetro Spectronic 2000 (Baush & Lomb Rochester, NY, EUA) e Espectrofotômetro U-2000 Hitashi (Tóquio, Japão);
 - Estufa (Soc. FABBE Ltda, São Paulo, SP, Brasil);
 - Fluxo laminar horizontal (Vecco, Campinas, SP, Brasil);
 - Fontes de corrente contínua e reguláveis desenvolvidas pelo Dr. H. Rzeppa (Técnica Permatron Ltda., São Paulo, SP, Brasil);
 - Incubadora de CO₂ modelo 315 acoplada a torpedos de CO₂ pelo Gas Guard modelo 3030 (Forma Scientific Marietta, OH, EUA);
 - Lâmpada de U.V. de alta intensidade modelo UVG-11 (Ultra-Violet Products Inst. San Gabriel, CA, EUA);
 - Leitor de ELISA EXL800, Universal Microplat Reader (Bio-TEK Instruments, Inc.);
 - Medidor de pH modelo 125, da (Corning Laboratory Sciences Co., NY, EUA);
 - Microagitador magnético modelo PC-161 (Corning Laboratory Sciences Company, NY, EUA);
 - Microscópio AFM invertido de campo claro e contraste de fase (Nikon, Nippon Kogakuk, Tóquio, Japão);
 - Microscópio invertido de campo claro e contraste de fase, modelo TE-100, com câmera fotográfica digital acoplada, modelo Coolpix 990, ambos (Nikon, Nippon Kogakuk Tóquio, Japão);

- Microscópio de Fluorescência Nikon Eclipse E600 (Nikon, Nippon Kogakuk Tóquio, Japão);
- Microscópio confocal de varredura a laser LSM-510 NLO (Zeiss Carl, Jena, Alemanha).

4. MÉTODOS

4.1. Cultura das linhagens IEC, Caco-2, HCT-116 e fibroblastos

Células das linhagens IEC, Caco-2 e fibroblastos foram mantidas em meio DMEM enriquecido com 10% de SFB a 37°C sob tensão de 5% de CO₂. A linhagem IEC recebeu suplementação de insulina bovina (4 µg/ml). A linhagem HCT-116 foi mantida sob as mesmas condições descritas acima, porém em meio RPMI. Para o subcultivo, placas de 60x10mm (Falcon, New Jersey, EUA) de células confluentes foram lavadas com uma solução de EBSS para total remoção do SFB. Em seguida, foi adicionada solução de Tripsina/EDTA em PBS - 0,2% de tripsina, 0,02 % de EDTA. As placas foram mantidas no fluxo laminar de 3 a 4 min. para que as células se desprendessem.

As células foram ressuspensas cuidadosamente com uma pipeta Pasteur e colocadas em novas placas contendo o respectivo meio enriquecido com 10% de SFB. Após 24 h, o meio de cultura foi trocado, e a partir daí as trocas ocorreram a cada dois dias, até obtenção da confluência necessária para novo ensaio ou para posterior subcultivo.

4.2. Meio Condicionado

As células da linhagem Caco-2 e os fibroblastos foram cultivados em placas P100 (Falcon, New Jersey, EUA) em meio DMEM com soro, até atingirem aproximadamente 70% de confluência. Após este período, as células foram lavadas várias vezes com PBS/BSA (1mg/ml), e cultivadas por 48 h em meio sem soro, para produção do meio condicionado. O meio condicionado coletado foi armazenado a -70°C ou preferencialmente usado fresco.

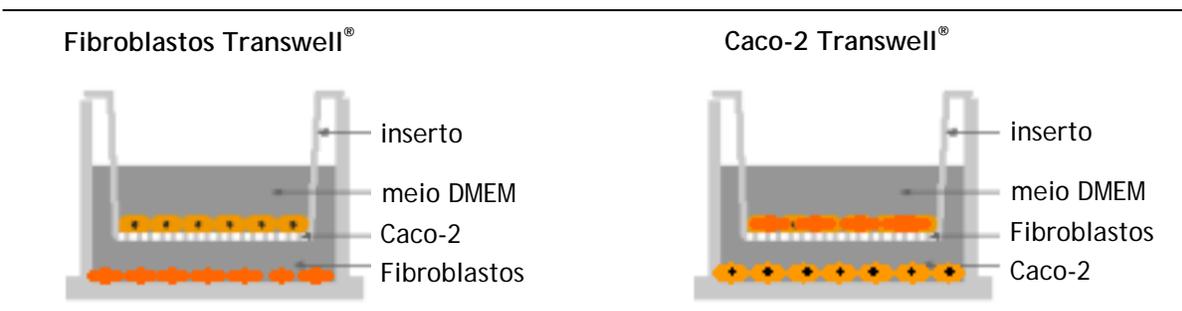
Para os experimentos de marcação metabólica dos GAGs, fibroblastos e células Caco-2 foram plaqueados numa concentração de $3 \cdot 10^5$ células em placas de 35 mm e mantidos por 24h em meio DMEM com 10%SFB. Transcorrido este tempo, algumas placas foram lavadas várias vezes com DMEM/ BSA (1mg/ml) e receberam o meio condicionado. Os controles foram mantidos em DMEM com 10% SFB (substituído por soro dialisado durante a marcação metabólica).

Para os experimentos de proliferação celular foram plaqueadas $3 \cdot 10^4$ células em placas de 6 poços recebendo o meio condicionado sob as mesmas condições acima citadas. Os controles foram mantidos em DMEM com 10%SFB ou sem soro. Para este experimento as células foram mantidas em cultura por 7 dias.

4.3. Transwell®

As linhagens Caco-2 e os fibroblastos foram cocultivados em sistema Transwell para análise da interação câncer-estroma *in vitro*. Para os experimentos de proliferação celular, foram plaqueadas $2,5 \cdot 10^4$ células no inserto (acima) e $5 \cdot 10^4$ células na placa, que foram mantidas por 7 dias.

Para os experimentos de marcação metabólica dos GAGs, imunocitoquímica e biologia molecular, foram plaqueadas $2,5 \cdot 10^5$ células no inserto (acima) e $5 \cdot 10^5$ células na placa e mantidas por 4 dias.



As células, em ambos compartimentos foram mantidas em meio DMEM com 10%SFB (para os experimentos com $[^{35}\text{S}]$ -Sulfato o soro foi previamente dialisado). A membrana do inserto Transwell® apresenta poros de $0,4\mu\text{m}$, que permite a troca de fatores de crescimento entre as células. Os grupos controles,

para todos os experimentos foram cultivados sob as mesmas condições, porém sem o inserto Transwell®.

4.4. TGF- β 1 exógeno

Foram plaqueadas 3.10^5 células (fibroblastos e células da linhagem Caco-2) em placas de 35mm de diâmetro, e mantidas em DMEM com 10%SFB por 3 dias. Após esse período, as culturas celulares subconfluentes foram incubadas por 16h com DMEM/ BSA (1mg/ml) para retirar fatores de crescimento exógenos, presentes no soro. Finalmente, as células foram lavadas com EBSS e incubadas por 24h na presença ou ausência de TGF- β 1 nas concentrações (2ng/ml; 4ng/ml e 8ng/ml) em meio de cultura sem soro. Em todos os casos, após 4h, 100 μ Ci/ml de [35 S]-sulfato de sódio foram incluídos no meio de incubação.

4.5. Marcação Metabólica de Glicosaminoglicanos Extraídos de Linhagens

4.5.1. Incorporação de [35 S]-Sulfato para Análise Estrutural de Glicosaminoglicanos

As células foram cultivadas em um número de 3.10^5 , em placas de 35mm de diâmetro (grupos controle, com meio condicionado e com TGF- β 1) e em placas de 6 poços, como descrito no item 3. (grupo Transwell®) por 3 dias, até atingirem subconfluência. Para a marcação metabólica, realizada do 3° para o 4° dia de cultivo, as células foram lavadas 3 vezes com EBSS e a seguir foi adicionado meio de marcação. O meio de marcação continha [35 S]-sulfato numa concentração final igual a 100 μ Ci/ml sem soro (para meio condicionado e TGF- β 1) ou com SFB previamente dialisado contra NaCl 0,15M em membrana de diálise Spectrapor com poro de 6000 a 8000kDa (Spectrum Medical Industries, Houston, TX, EUA). As células foram mantidas por 24h a 37°C sob tensão de 5% de CO₂. Após o tempo de incubação, o meio foi removido e armazenado a -20°C para posterior análise. As células foram lavadas 3 vezes com PBS, e removidas da placa com 1mL de EDTA 0,025% em PBS, após 30min. (para que as células se desprendessem, deixando a matriz na placa). As células removidas foram colocadas em microtubos, onde foi adicionado 1ml da solução de uréia 3,5M em

tampão Tris-HCl 10mM, pH 8,0. Finalmente, as placas receberam uma solução de tripsina em PBS (5% de tripsina, 4% EDTA 0,025%) para remoção da matriz; após 16h a matriz foi removida com o auxílio de um "scraper". Uma alíquota de 20µL da fração celular foi separada para a dosagem de proteínas, utilizando-se o reagente Coomassie Brilliant Blue G (Spector, 1978).

Dessa forma foram obtidas as marcações metabólicas com [³⁵S]-sulfato da célula, meio de cultura e matriz extracelular das linhagens estudadas.

4.5.2. Extração de GAGs marcados metabolicamente com [³⁵S]-sulfato

Após a marcação metabólica, o extrato celular, o meio de cultura e a matriz extracelular foram submetidos à proteólise com Maxatase (4mg/ml em Tris-HCl 50mM, pH 8.0 contendo 1,5mM NaCl) a 60°C por 24h. Após a proteólise as amostras foram centrifugadas a 5.000xg por 15min. para remoção de material insolúvel. Após a centrifugação foram adicionados 3 volumes de etanol ao sobrenadante e as amostras foram mantidas a -20°C por 24h. Os glicosaminoglicanos precipitados por etanol foram coletados por centrifugação a 5.000xg por 30min. Em seguida, os GAGs foram analisados por eletroforese em gel de agarose em tampão PDA.

4.5.3. Eletroforese em gel de agarose

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose, método desenvolvido por Jaques e col. (1968) e modificado por Dietrich & Dietrich (1976). Alíquotas de 5µl de cada amostra foram aplicadas em lâminas de gel de agarose 0,6% (Bio Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, EUA), com uma espessura de 0,2cm, preparado em tampão PDA (1,3 diaminopropano acetato 0,05M, pH 9.0) sobre uma lâmina de vidro. A eletroforese foi realizada em caixa refrigerada a 4°C (5-8V/cm durante aproximadamente 40min.). Este tampão discrimina os compostos de acordo com interação com a diamina. Os GAGs migram para o pólo positivo, pois possuem carga negativa devido aos grupamentos sulfato e carboxila. Pela ordem decrescente de mobilidade eletroforética temos: o

condroitim 4- e 6-sulfatos, dermatam sulfato, heparam sulfato e heparina. Decorrido o tempo necessário para a adequada migração eletroforética, os glicosaminoglicanos foram precipitados no gel pelo detergente brometo de cetil trimetilamônio 0,1% CETAVLON® (Merck, Darmstadt, Alemanha) por, no mínimo, 2h. A seguir, o gel foi seco sob calor e ventilação, e corado com uma solução de azul de toluidina 0,1% (Fisher Scientific Co., Fair Lawn, NY, EUA) em ácido acético 1% e etanol 50% por 15min., o excesso de corante foi removido por uma solução de ácido acético 1% em etanol 50%, a seguir os géis foram secos à temperatura ambiente. Depois de secos os géis foram expostos a um filme radiosensível *Multipurpose* (Packard Instruments Co.) por 24h e submetidos à varredura em um sistema de análise de imagem.

4.5.4. Cromatografia em papel

Após precipitação com etanol, como descrito no item 4.5.2., os GAGs receberam ácido tricloroacético TCA 90%, numa concentração final de 10%, por 15min. a 4°C. As amostras foram centrifugadas a 12.000xg e o sobrenadante, contendo os GAGs, neutralizado com NaOH. Novamente os GAGs foram precipitados com 3 volumes de metanol e mantidos a -20°C por 24h. Após centrifugação a 5.000xg por 30min., o precipitado, foi ressuspenso com água destilada.

A cromatografia em papel foi utilizada para separação dos produtos formados por ação das enzimas específicas. Os substratos foram incubados com as enzimas heparitinase I e II, para análise do heparam sulfato e condroitinase AC ou ABC, para análise do condroitim sulfato, por 24h. Após a incubação, os produtos formados foram aplicados em papel Whatman n°1 e submetidos à cromatografia descendente em papel, por 18h, em ácido isobutírico: NH₄OH 1,25 M (5:3 - v/v).

A seguir, os cromatogramas com as amostras marcadas com [³⁵S]-sulfato foram secos a temperatura ambiente e os cromatogramas com os padrões com aquecimento (80°C). Os produtos dos padrões foram detectados por absorção em

U.V., revelados com nitrato de prata em meio alcalino e fixados com tiosulfato de sódio a 5%.

Os cromatogramas com material marcado com [³⁵S]-sulfato foram impressionados e quantificados em sistema de análise de imagem, Cyclone[®] (Storage Phosphor System - Packard Instr.), "scanner" de radioatividade, que realizou a leitura de um filme ao qual as amostras foram expostas por 48h. A quantificação dos compostos marcados com o radioisótopo foi realizada com o "software" Opti Quanti[®].

4.5.5. Quantificação dos GAGs marcado metabolicamente

Os GAGs marcados com [³⁵S]-sulfato de sódio foram identificados em sistema de análise de imagem, Cyclone[®] (Storage Phosphor System - Packard Instr.), "scanner" de radioatividade, que realiza a leitura de um filme ao qual os géis ficam expostos por tempos variáveis, dependendo dos níveis de radioatividade das amostras. Com o "software" Opti Quanti[®], a quantificação dos compostos marcados com o radioisótopo foi realizada.

Alternativamente após a eletroforese em gel de agarose em tampão PDA, as lâminas de agarose após terem sido expostas ao filme radiosensível tiveram suas bandas, contendo os compostos marcados com [³⁵S]-sulfato, recortadas do gel e a radioatividade foi determinada em um contador de cintilações utilizando como líquido de cintilação Ultima Gold (Packard Instruments Company Inc. Downers Grove, IL, EUA). A quantidade total de cpm de cada amostra foi calculada com base nos valores obtidos para a alíquota submetida à eletroforese. A concentração de proteína de cada amostra foi determinada em uma alíquota do extrato celular utilizando-se o método de dosagem por Coomassie Blue segundo descrito por Spector (Spector, 1978).

4.6. Imunocitoquímica

As células foram cultivadas sobre lamínula circular de 12mm de diâmetro (3 lamínulas por poço) em uma concentração de $4 \cdot 10^5$ células/poço e $2 \cdot 10^5$ no inserto Transwell[®]. Foram mantidas em placas Transwell de 6 poços a 37°C sob

tensão de 5% de CO₂, por 4 dias. Os controles foram cultivados sob as mesmas condições, porém sem o inserto Transwell.

4.6.1. Marcação externa - Versicam

Após esse período de cultivo, o meio foi removido e as células lavadas 5 vezes em meio DMEM na ausência de SFB. A seguir, as células foram incubadas com anticorpo primário, em PBS contendo 5% de SFB por 1h a 4°C. Ao final da incubação, as células foram lavadas por cinco vezes em PBS 0,1 M e então fixadas em formaldeído 2% em PBS por 30 min. à temperatura ambiente. Após a fixação, as células foram lavadas 2 vezes em PBS 0,1, e uma vez em PBS contendo 0,1M de glicina (para bloquear os radicais aldeídicos) e 2 vezes em PBS (anticorpos primários e secundários utilizados estão descritos em materiais).

4.6.2. Revelação do anticorpo

Posteriormente, as células foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com marcador fluorescente Alexa Fluor 594, diluído 1:100 (12µg/mL) em PBS, previamente centrifugados 10min. a 10.000rpm a 4°C. A incubação do anticorpo secundário foi realizada por 40min. no escuro. A seguir, as células foram lavadas cinco vezes em PBS.

4.6.3. Coloração do núcleo

Para os ensaios descritos acima, as células foram incubadas com DAPI 1:1.000 em PBS com 0,01% de saponina por 15min., com o objetivo de visualizar os núcleos celulares.

A seguir, as células foram lavadas 5 vezes em PBS, lavadas rapidamente em água bidestilada e montadas em lâminas histológicas com Fluormont G.

4.6.4. Controles

Os controles para os experimentos de imunomarcção foram realizados omitindo-se o anticorpo primário.

4.6.5. Observação do material

As lâminas foram observadas e analisadas em microscópio de fluorescência Nikon E-600 e, em microscópio confocal LSM - 510 NLO (Zeiss, Alemanha).

4.7. Curva de crescimento (ensaio com MTT)

O princípio deste método consiste na absorção do sal MTT (Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]) (Sigma Chemical Co.) pelas células sendo reduzido pela succinato desidrogenase mitocondrial no interior da mitocôndria a formazan, que tem cor violeta. Este produto acumulado dentro da célula, pode ser solubilizado com a adição de dimetilsulfóxido (DMSO) (MP Biomedicals).

Para o ensaio colorimétrico de proliferação, MTT, as células foram cultivadas por diferentes tempos (24, 72, 120 e 168h), em placa de 24 poços. Foram plaqueadas $2,5 \cdot 10^4$ células no inserto Transwell (acima) e $5 \cdot 10^4$ células na placa (abaixo); os controles e as células com meio condicionado foram cultivados sem o inserto Transwell. Para quantificação indireta do número de células, nos tempos previstos, estas foram incubadas com $200\mu\text{L}/\text{poço}$ do corante brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (MTT - $2\text{mg}/\text{mL}$), preparado em meio DMEM (sem corante) sem SFB. Após 3h a 37°C , o meio de cultura foi retirado cuidadosamente e os cristais de formazan produzidos foram solubilizados pela adição de $200\mu\text{L}$ de DMSO. As placas foram agitadas por 10min. e a absorbância foi medida no leitor de placas Leitor de ELISA EXL800, Universal Microplat Reader (Bio-TEK Instruments, Inc.) a 540nm . A proliferação das células foi estimada comparando-se os valores de absorbância das células nos diferentes tempos com os valores de absorbância dos controles.

4.8. Protocolos de Biologia Molecular

4.8.1. Preparação de Soluções, Material Plástico e Vidraria

Para evitar a degradação do RNA por RNAses todo material foi cuidadosamente preparado previamente. Ponteiras, microtubos e materiais

plásticos livres de RNase e DNase foram autoclavados. A vidraria foi tratada com solução de dietilpirocarbonato (DEPC) (MP Biomedicals) 0,1% v/v em água por 2h a 37°C. A cuba de eletroforese, utilizada para analisar a integridade do RNA, foi tratada com solução de H₂O₂ 3% v/v; por 10min. e lavada com água DEPC 0,1% antes do uso.

Todas as soluções foram preparadas com água livre de RNase. Toda a manipulação foi realizada usando luvas sem talco e máscara.

4.8.2. Extração de RNA Total

A fração de RNA total foi extraída das linhagens celulares ($2-4 \times 10^7$ células) utilizando o reagente Trizol[®] (Invitrogen, EUA).

Um mililitro de Trizol[®] para cada 20cm² foi adicionado às placas de cultura onde estavam sendo cultivadas as linhagens estudadas, as células foram homogeneizadas até completa dissociação. Os microtubos foram mantidos a temperatura ambiente por 5min. e a eles foram adicionados 200µl/ml de clorofórmio (Merck), invertendo-se os microtubos vigorosamente por 15s. Os microtubos foram mantidos em temperatura ambiente por mais 5 min. e centrifugados a 12.000xg por 30min. a 4°C. Após a centrifugação, aproximadamente 400µl da fase aquosa superior foram transferidos para um novo microtubo contendo 1ml de etanol absoluto (Merck). A precipitação do RNA foi obtida pela manutenção das soluções contendo etanol por 14-16 horas a -20°C. O RNA então foi coletado por centrifugação a 12.000xg por 30min. a 4°C em centrífuga modelo 5410 (Eppendorf, Hamburg, Alemanha). O precipitado de RNA (gel-like) foi lavado uma vez com 1ml de etanol 75% em água livre de RNase e centrifugado a 7.500xg por 5min. Após centrifugação o RNA foi seco e solubilizado em 50µl de água livre de RNase e armazenado a -80°C até a realização da reação de PCR.

4.8.3. Quantificação do RNA

As amostras de RNA foram quantificadas por leitura em 260nm (RNA) e 280nm (proteína) utilizando o espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, EUA).

4.8.4. Desenho dos *Primers*

Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados para a reação de amplificação foram desenhados a partir de pesquisas em banco de dados de seqüências e de dados já publicados. Foi utilizada a base de dados pública *online* "Genbank" BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) (Altschul *et al.*, 1997). As diversas seqüências foram alinhadas com o auxílio do programa Clustal W (EMBL-EBI, European Bioinformatics Institute) para a verificação de uma possível homologia entre os genes e para localização dos *primers* na seqüência. Os *primers* foram desenhados com o auxílio do programa da Idt (Integrated DNA Technologies <http://www.idtdna.com>) e do software Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). As especificações dos *primers* são apresentadas na tabela 3.

gene (GenBank)	seqüência	T _m	produto (pb)
Sindecam-1 (NM_001006946)	F: AGGGCTCCTGCACCTTACTTGCTTA R: ATGTGCAGTCATACACTCCAGGCA	60°C	164
Sindecam-2 (NM_002998)	F: AACTTCTGCCGTAGCTCCCTTTCA R: AGGCTGCTCTCTGAAGCTCTTCTT	60°C	132
Sindecam-3 (NM_014654)	F: AAGGAGGTGCTCGTAGCTGTGATT R: TCCTGCTTGTGAGGCTTCTGGTAT	60°C	167
Sindecam-4 (NM_002999)	F: CCAGTTTGATGTTGCTGGGTGGTT R: AGCCCTAGAGCCTGAAGAAAGCAA	60°C	195
Biglicam (NM_001711)	F: AAGCTCAACTACCTGCGCATCTCA R: ATCATCCTGATCTGGTTGTGGCCT	60°C	179
Decorim (NM_133507)	F: TGGACCGTTTTCAACAGAGAGGCTT R: TGGACCACTCGAAGATGGCATTGA	60°C	182
Versicam (NM_004385)	F: AGCGGAGACCAGTGTGAACTTGAT R: TAGCACTGCCCTTGAATTTGTGC	60°C	185
Heparan sulfato 2-O-Sulfotransferase (NM_012262)	F: ATTATGATGCCGCCCAAGTTGCAG R: CTCCTCCAGTTTCTGGATCTGGTT	60°C	93
Heparan sulfato 6-O-sulfotransferase-1 (NM_004807)	F: CACGCCAGGAAGTTCTACT R: GCCATCACACATATGCAAC	58°C	127
NAcGal -4 sulfato 6-O-sulfotransferase (NM_015820)	F: CAAAAAGGGGAAGCGATGTA R: CCTCCGTAATGGAAAGGTGA	58°C	149
β-actina (NM_001101)	F: ACCAACTGGGACGACATGGAGAAA R: TAGCACAGCCTGGATAGCAACGTA	60°C	192
GAPDH (NM_002046)	F: TCGACAGTCAGCCGCATCTTCTTT R: ACCAAATCCGTTGACTCCGACCTT	60°C	94
B2M: β-2-microglobina (NM_004048)	R: GTGCTCGCGCTACTCTCTC R: GTCAACTTCAATGTCGGAT	60°C	113

Tabela 3. Principais características dos *primers* utilizados. Todos os primers foram desenhados nos com o auxílio dos programas acima citados, exceto o *primer* para B2M (Dydensborg, et al., 2006). T_m: temperatura de anelamento.

4.8.5. RT-PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*)

Cerca de 2µg do RNA total foram adicionados a um tubo para PCR com 0,5mM de Oligo(dT)₁₅ (Promega, EUA) e água livre de RNase até completar um volume de 5µl, as amostras foram incubadas a 70°C por 5min. seguido de um período de 5min. a 4°C.

Após incubação foi adicionada às amostras uma mistura de: 0,5 l de Recombinant RNasin[®] Ribonuclease, 1µl de dNTP mix (0,5mM, concentração final), 1µl de transcriptase reversa ImProm-II Reverse Transcription System (Promega), 6,1µl de água livre de RNase, 3mM de MgCl₂ e 4µl do tampão da enzima. O programa utilizado em termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems, EUA) para a realização da reação de transcrição reversa (RT) para obtenção do cDNA consistiu de: 25°C por 5min., 42°C por 60min., 70°C por 15min. e 4°C por tempo infinito.

Em um microtubo em gelo foram adicionados 1ml de cDNA e a ele foi adicionada uma mistura de: 1µl do *primer sense* (10µM) (Prodinol Biotecnologia S.A, Belo Horizonte, MG, Brasil), 1µl do *primer anti-sense* (10µM), 10µl de PCR Master Mix (Promega) e 7µl de água livre de RNase. O ciclo da reação para cada gene está descrito na tabela 4.

Os produtos do PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose (Bio Rad Laboratories Inc.) 1,5% em tampão TAE (Tris-Acetato 2M, EDTA 0,05M, pH 8,0), corado com brometo de etídio, 100V por 30min. Os produtos expostos à luz ultravioleta e fotografados digitalmente e seus tamanhos foram determinados usando um padrão de peso molecular (Fermentas, Canadá, EUA). O gel foi digitalmente fotografado utilizando o sistema de aquisição de géis e o *software* desenvolvido pela Soft Solutions[®].

Genes	Ciclos
Sindecam-1, -2, -3 e -4, biglicam, decorim, versicam, β -Actina, GAPDH, B2M, HS2OST	94°C por 1 min 94°C por 1 min 60°C por 1 min 72°C por 1 min 72°C por 5 min 4°C ∞
HS6OST-1 e NAcGal-4S-6OST	94°C por 1 min 94°C por 1 min 58°C por 1 min 72°C por 1 min 72°C por 5 min 4°C ∞

Tabela 4. Ciclos e temperaturas utilizados na amplificação dos genes. (HS2OST = heparam sulfato 2-O-sulfotransferase; HS6OST= heparam sulfato 6-O-sulfotransferase; NAcGal-4S-6OST = N-acetil-galactosamina, 4-sulfato 6-O-sulfotransferase).

4.8.6. PCR em Tempo Real

A técnica de PCR em tempo real consiste em uma reação em cadeia da polimerase em tempo real, sendo uma metodologia que permite a quantificação dos produtos de amplificação gênica em todas as fases da reação de PCR. Durante a reação, o acúmulo de *amplicons* é detectado em "tempo real", para cada ciclo da reação, por meio da excitação de fluorocromos que marcam sondas seqüência-específicas ou *primers* usados na reação (Faderl, Hochhaus & Hughes, 2004). Durante os ciclos consecutivos de PCR, a quantidade de DNA de fita dupla se eleva de maneira exponencial, aumentando assim a quantidade do marcador fluorescente, neste caso o SYBR[®] Green, que intercala entre as duplas fitas de DNA (figura 14). Entretanto, quando ocorre amplificação inespecífica ou amplificação de dímeros de *primers*, estes também são detectados, interferindo com a quantificação final dos produtos específicos da reação. Para avaliar se produtos de PCR inespecíficos formados na reação, uma curva de dissociação é

construída. Se apenas os produtos específicos de PCR foram amplificados, um único pico será visualizado no gráfico de dissociação (van der Velden *et al.*, 2003) (figura 15).

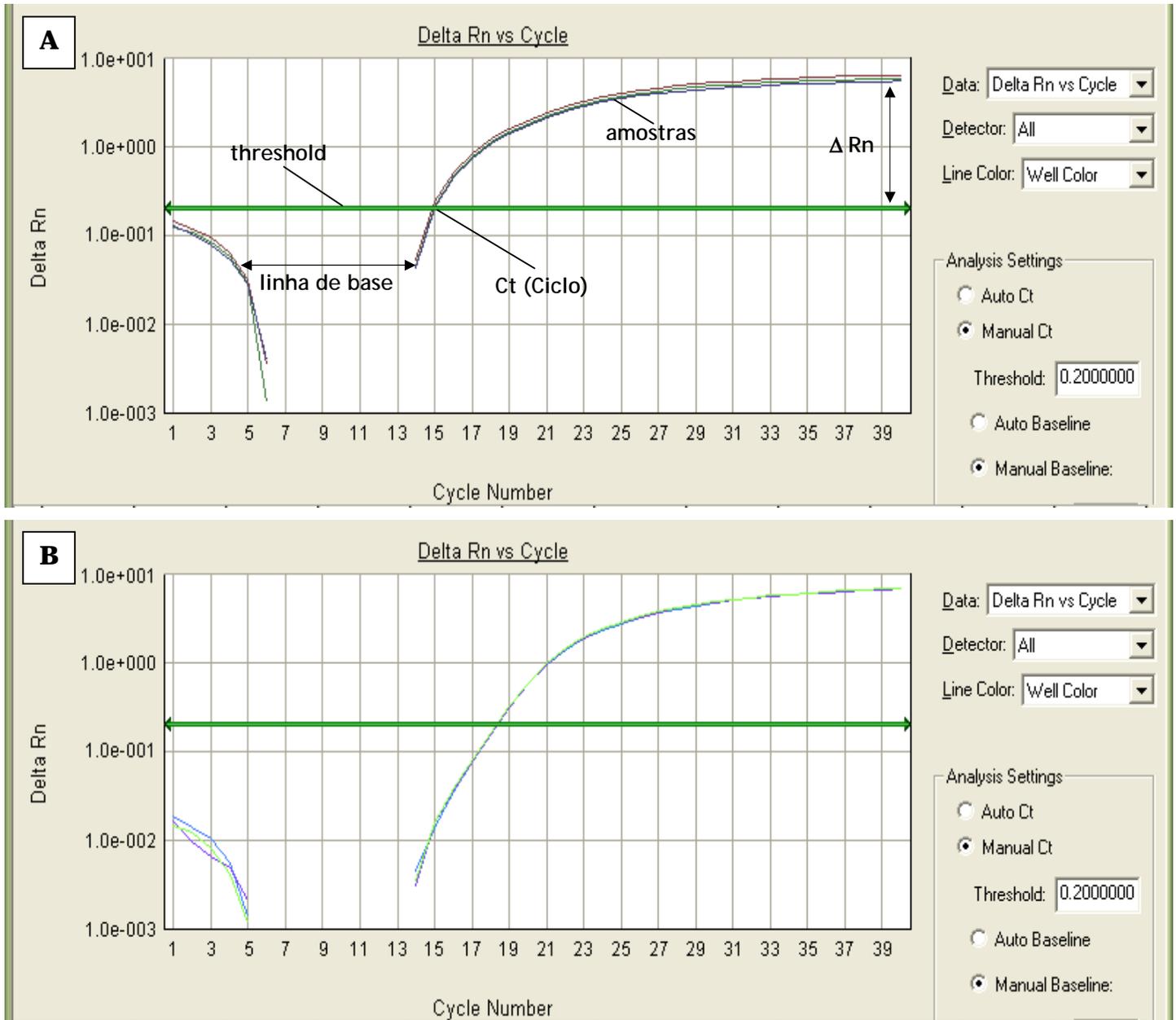


Figura 14. Curva de amplificação da PCR em tempo real. A) Curva de amplificação da β -actina e B) do versicam. Ct: *cycle threshold*: ciclo onde a reação cruza o limiar de detecção; *Threshold*: nível de Rn utilizado para a determinação do Ct; Rn: sinal do alvo normalizado pelo sinal da referência passiva (ROX); ROX: fluorescência presente no meio (correção do volume); Normalização: fluorescência total- fluorescência ROX.

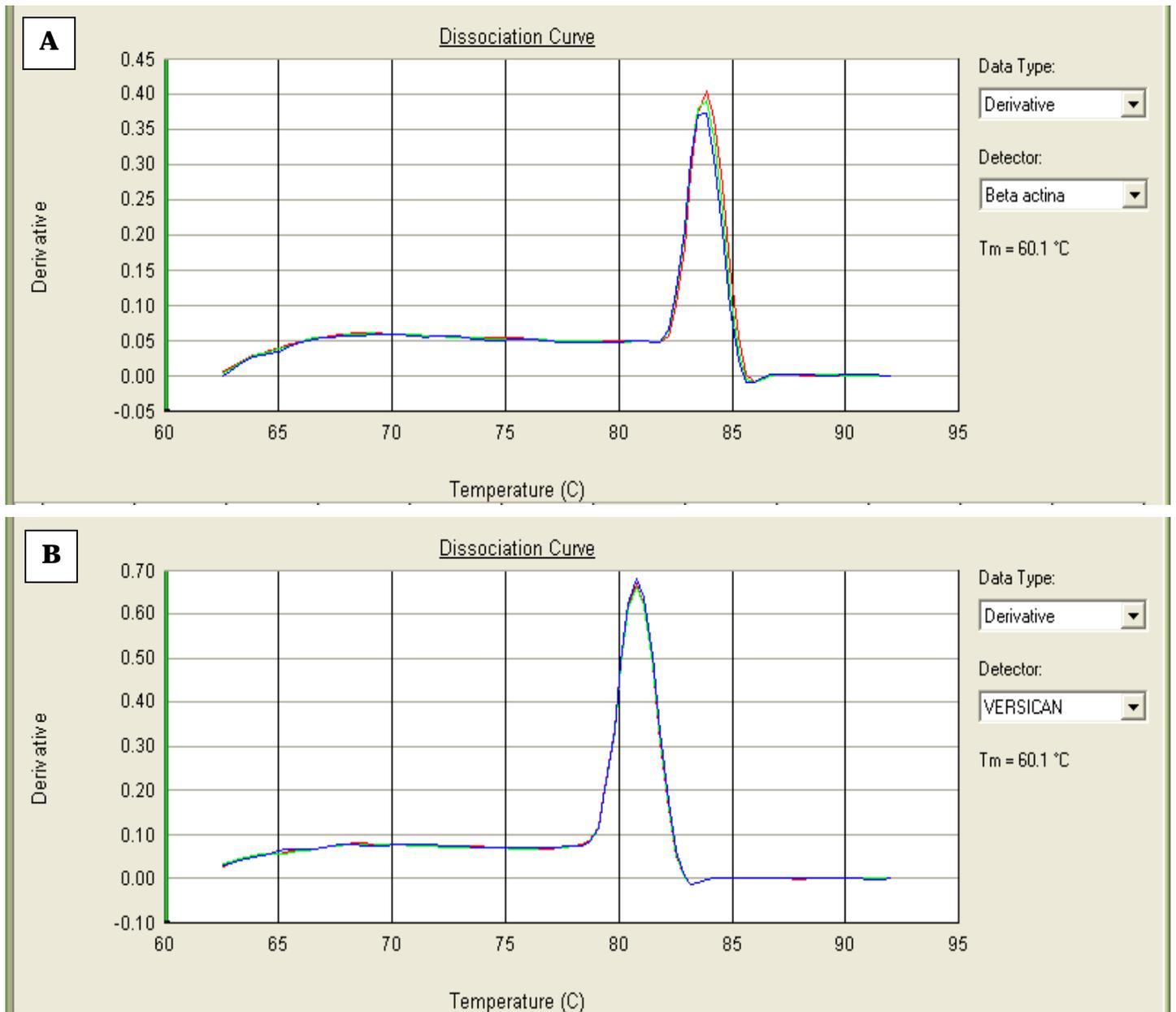


Figura 15. Curva de dissociação dos produtos de PCR derivados da amplificação. A reação de amplificação A) da β -actina e B) do versicam apresentam somente um produto amplificado.

A reação de PCR em tempo real foi realizada utilizando SYBR[®]-Green PCR Master Mix, incluindo AmpliTaq-GOLD polymerase (Applied Biosystems, USA) em um aparelho ABI PRISM 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, EUA).

Para cada reação, 1µl de cDNA diluído foi adicionado a 10µl de SYBR[®] Green, 1µl do *primer sense* (0,5µM, concentração final), 1µl do *primer anti-sense* (0,5µM, concentração final) e 7µl de água livre de RNase. Todas as reações foram feitas em triplicata. O ciclo das reações consistiu de: ativação a 95°C por 10min. e 40 ciclos de 95°C por 15s (etapa de desnaturação), 55-60°C por 1min. (etapa de anelamento e extensão) e 72°C por 30 s.

Enquanto a reação de PCR se processa, a polimerase sintetiza novas cadeias a partir dos *primers* resultando em aumento do sinal fluorescente que é captado a cada ciclo até atingir um limiar (*threshold*), no qual todas as amostras podem ser comparadas. Este limiar corresponde ao momento utilizado para análise da fluorescência. É um ponto definido pelo usuário e, obrigatoriamente, deve estar na faixa em que a quantidade de fluorescência gerada pela amplificação das amostras torna-se significativamente maior que a fluorescência de base (*background*). O limiar é definido na fase exponencial da reação de PCR, quando a quantidade de produto formada traduz de forma satisfatória a concentração inicial de fitas molde (mRNA/cDNA) amplificadas pela reação $N_f = N_0 (1+Y)^n$ onde:

- N_0 : número inicial de cópias de DNA-dupla fita (*template*);
- N_f : número final de cópias da seqüência alvo (dupla fita);
- Y: eficiência da extensão do *primer* por ciclo, (Y=1 se a eficiência de amplificação for 100%);
- n: número de ciclos.

A quantificação relativa da expressão de um gene pode ser realizada através da comparação da amplificação desse gene com um controle endógeno. Para a quantificação dos genes e normalização do método, foi utilizado o gene da -actina como controle endógeno. A expressão relativa dos genes foi calculada usando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001) onde:

- Ct (*Cycle Threshold*): indica o número do ciclo no qual a quantidade do gene alvo amplificado alcança um limiar fixo, quanto menor o valor numérico de Ct, mais rapidamente foi atingido o número de cópias estabelecido;

- ΔCt : normalização com gene de expressão constitutiva; é obtido pela diferença entre o Ct do gene alvo e o Ct do gene endógeno (neste caso, -actina) para cada amostra;

- $\Delta\Delta Ct$: média do ΔCt do grupo controle - ΔCt de cada gene para cada amostra.

A PCR em tempo real é, quase sempre, comparativa. Duas moléculas alvo são amplificadas, simultaneamente em duas reações distintas: gene de interesse (x) e controle endógeno (r). Para chegarmos a expressão relativa temos: $N_{fx} = N_{0x} (1+Y_x)^{C_{tx}}$ para o gene de interesse e $N_{fr} = N_{0r} (1+Y_r)^{C_{tr}}$ para o controle endógeno.

Se $Y_x = Y_r = 1$, podemos escrever: $N_{0x} = N_{fx} \cdot 2^{-C_{tx}}$ (1) $N_{0r} = N_{fr} \cdot 2^{-C_{tr}}$ (2), definido que $N_f/N_0 = 2^{C_t} \therefore N_0/N_f = 2^{-C_t} \therefore N_0 = 2^{-C_t}$ e dividindo (1) por (2) temos que: $X_N = K \cdot 2^{-\Delta Ct}$.

Em nossos experimentos o valor de X_N é a quantidade normalizada de moléculas do gene de interesse em relação ao número de moléculas controle e é medido em diferentes condições experimentais, assim temos:

$$X_{NA} = K \cdot 2^{-\Delta CtA}$$

$$X_{NB} = K \cdot 2^{-\Delta CtB}; \text{ que é igual a } 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

4.9. Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas pelo método ANOVA. Foi realizada análise de variância em uma via ANOVA (não paramétrico) seguida do pós-teste de Múltipla Comparação Tukey's e análise de variância em uma via ANOVA (não paramétrico) seguida do pós-teste de Múltipla Comparação Bonferroni's com o auxílio do *software* GraphPad Prism version 5.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Os resultados são apresentados como a média \pm desvio padrão e foram considerados estatisticamente significantes se $p < 0.05$.

Resultados



5. RESULTADOS

5.1. Modulação da síntese de glicosaminoglicanos (GAGs) pela interação parácrina entre células de estroma e de adenocarcinoma colorretal humano *in vitro*

Dois modelos *in vitro* foram utilizados para o estudo dos efeitos da interação parácrina entre células de estroma (fibroblastos) e de adenocarcinoma colorretal humano (Caco-2) na síntese de GAGs. Inicialmente, para analisar a influência de fatores solúveis secretados utilizamos o meio condicionado das linhagens e posteriormente, para analisar o *cross-talking* das linhagens, utilizamos o sistema de em placas *Transwell*.

5.1.1. Fibroblastos

Os fibroblastos controle quando marcados com [³⁵S]-sulfato de sódio secretam principalmente condroitim sulfato (CS) e dermatam sulfato (DS) para o meio extracelular, e grande parte do heparam sulfato (HS) é mantido na superfície celular (Figura 16).

O crescimento de fibroblastos em presença de meio condicionado de células de adenocarcinoma colorretal (Caco-2) induziu um significativo aumento, no meio de cultura, da síntese de condroitim sulfato (CS) ($p < 0,001$), dermatam sulfato ($p < 0,001$) e heparam sulfato ($p < 0,001$), quando comparado aos fibroblastos controle (Figuras 16 e 17). Os GAGs extraídos dos outros compartimentos, como o intracelular (célula) e matriz extracelular não apresentaram diferenças significantes, pelo método estatístico utilizado (Figura 17). DS não foi detectado na matriz extracelular (Figuras 16 e 17).

Quando os dois tipos celulares foram cocultivados em sistema *Transwell* (Figuras 18 e 19), os fibroblastos apresentaram um aumento significativo de CS no meio de cultura ($p < 0,001$) e na matriz ($p < 0,05$). Observamos no sistema *Transwell* um perfil de síntese diferente do observado com o meio condicionado (Figura 17), com DS ($p < 0,001$) e HS ($p < 0,001$) apresentando-se retidos na célula. Esta diferença visível nos dois sistemas de interação, não ocorreu devido à confluência das células, uma vez que em ambas as condições as células estiveram subconfluentes (~70% de confluência). É bem possível que este efeito se deva a um *cross-talking* entre as

células tumorais e estromais, possibilitado pelo *Transwell*, uma vez que no meio condicionado a concentração de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento é finita e esgotável nas condições utilizadas. Na matriz extracelular CS ($p < 0,05$) e HS ($p < 0,05$) apresentaram níveis significativamente aumentados apenas no sistema *Transwell* (Figura 19).

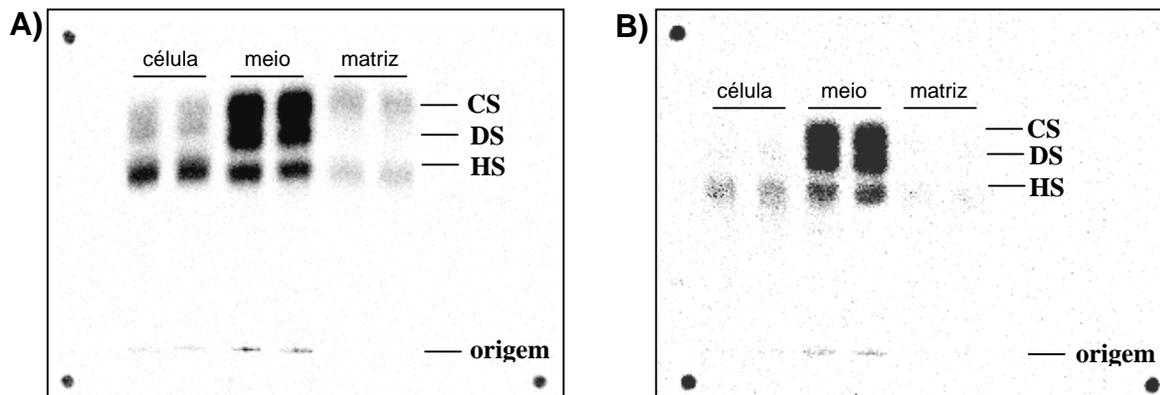


Figura 16. Glicosaminoglicanos sintetizados pelos fibroblastos controle e com meio condicionado. A) Os fibroblastos controle foram cultivados três dias em meio DMEM com 10% de soro fetal bovino (SFB). B) Fibroblastos cultivados três dias em meio condicionado da linhagem Caco-2. No 4º dia, os fibroblastos foram cultivados por 24h na presença de $[^{35}\text{S}]$ -Sulfato de Sódio. Os glicosaminoglicanos metabolicamente marcados foram analisados por eletroforese em gel de agarose em tampão PDA, após coloração o gel foi exposto a um filme radiosensível por 24h. Os experimentos foram realizados em duplicata em pelo menos dois experimentos independentes. (CS = condroitim sulfato; DS = dermatam sulfato; HS = heparam sulfato).

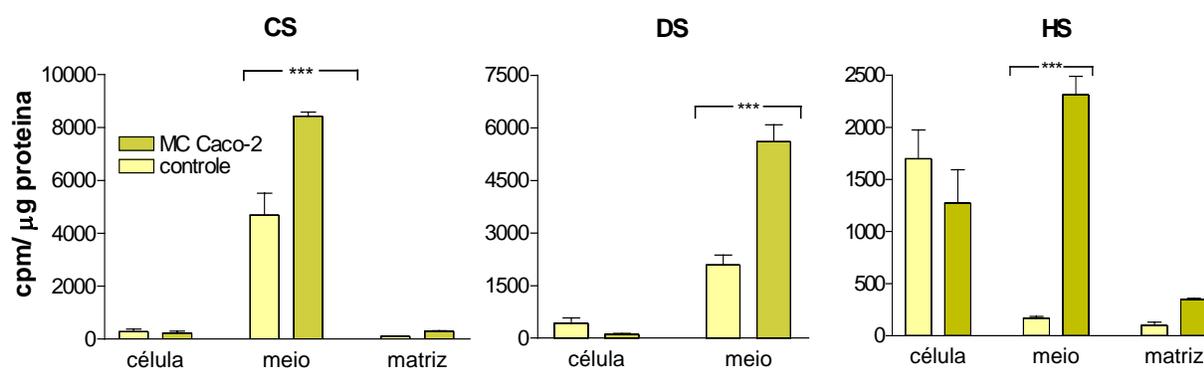


Figura 17. Efeito do meio condicionado da linhagem Caco-2 sobre a síntese de GAGs de fibroblastos em cultura. Os gráficos representam valores obtidos na Figura 16, após contagem em cpm das bandas dos géis de agarose em tampão PDA (descrito em Métodos) dos fibroblastos do grupo controle, que foram mantidos por três dias em meio DMEM com 10%SFB e o grupo mantido em meio condicionado da linhagem Caco-2. Resultados de três experimentos independentes e expressos como a média \pm desvio padrão quantificados em cpm por μg de proteína. One-way ANOVA (and nonparametric) Bonferroni's Multiple Comparison Test. (MC Caco-2 = meio condicionado da linhagem Caco-2; *** = $p < 0,001$; CS = condroitim sulfato; DS = dermatam sulfato; HS = heparam sulfato).

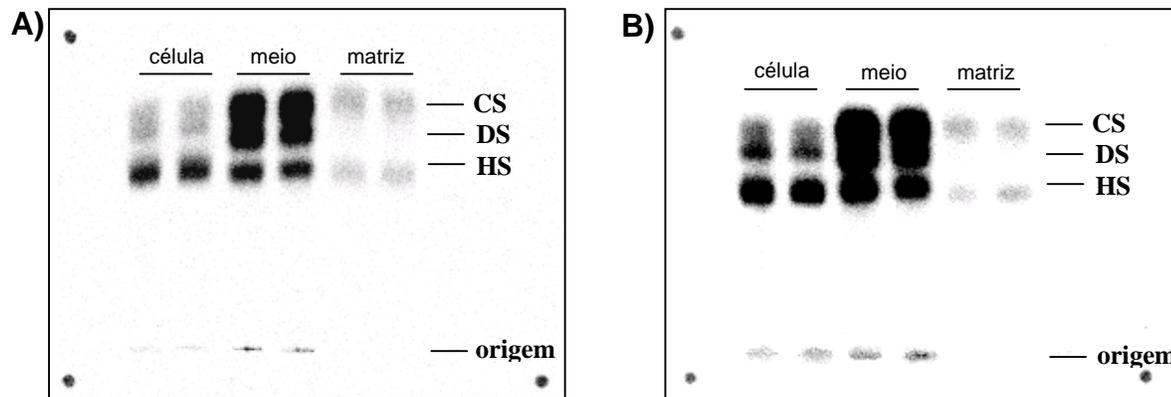


Figura 18. Glicosaminoglicanos sintetizados pelos fibroblastos controle e no sistema *Transwell*[®]. A) Os fibroblastos controle foram cultivados três dias em meio DMEM com 10%SFB. B) Fibroblastos cocultivados por três dias em sistema *Transwell*[®] com a linhagem Caco-2. No 4º dia, os fibroblastos foram cultivados por 24h na presença de [³⁵S]-Sulfato de Sódio. Os glicosaminoglicanos metabolicamente marcados foram analisados por eletroforese em gel de agarose em tampão PDA, após exposição a um filme radiosensível por 24h. Os experimentos foram realizados em duplicata em pelo menos dois experimentos independentes. (CS = condroitim sulfato; DS = dermatam sulfato; HS = heparam sulfato).

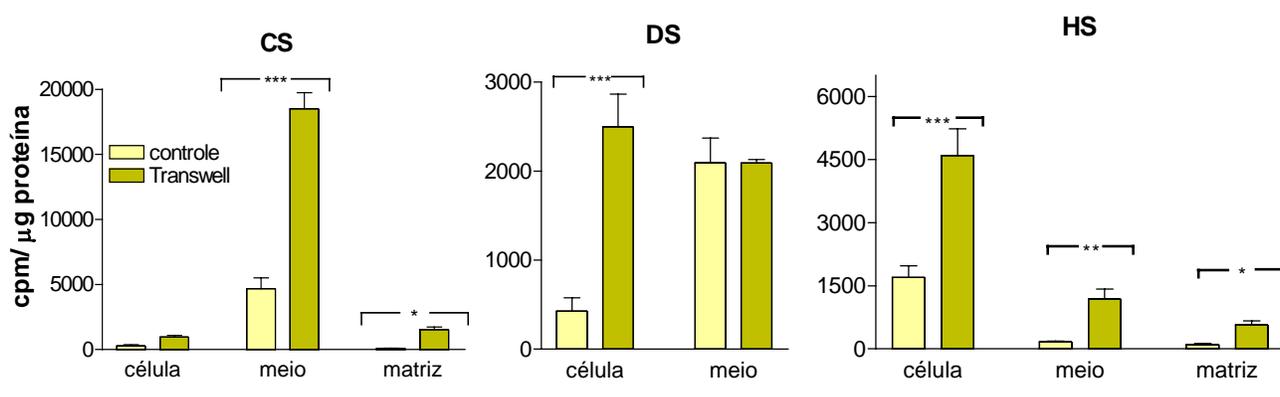


Figura 19. Efeitos da co-cultura de Caco-2 e fibroblastos em Sistema *Transwell*[®] na síntese de GAGs dos Fibroblastos. Os gráficos representam os géis de PDA (Figura 18) dos fibroblastos controle e dos cocultivados com a linhagem Caco-2 em sistema *Transwell*[®], mantidos em cultura por três dias. Resultados de duplicatas de pelo menos dois experimentos independentes expressos como a média ± desvio padrão quantificados em cpm por µg de proteína. One-way ANOVA (and nonparametric) Bonferroni's Multiple Comparison Test. (CS = condroitim sulfato; DS = dermatam sulfato; HS = heparam sulfato; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

5.1.2. Linhagem Caco-2

Os efeitos da interação parácrina também foram investigados marcando-se a linhagem de adenocarcinoma colorretal Caco-2 com [³⁵S]-sulfato de sódio, em presença de meio condicionado de fibroblastos e no sistema de em *Transwell*.

Em presença de meio condicionado de fibroblastos, as células Caco-2 também secretam ao meio extracelular CS e HS, além do que o HS é retido na célula (Figuras 20 e 21). No sistema de *Transwell* as quantidades de CS e HS estão aumentadas em todos os compartimentos, com exceção do HS na matriz, que não apresentou aumento estatisticamente significativo (Figuras 22 e 23).

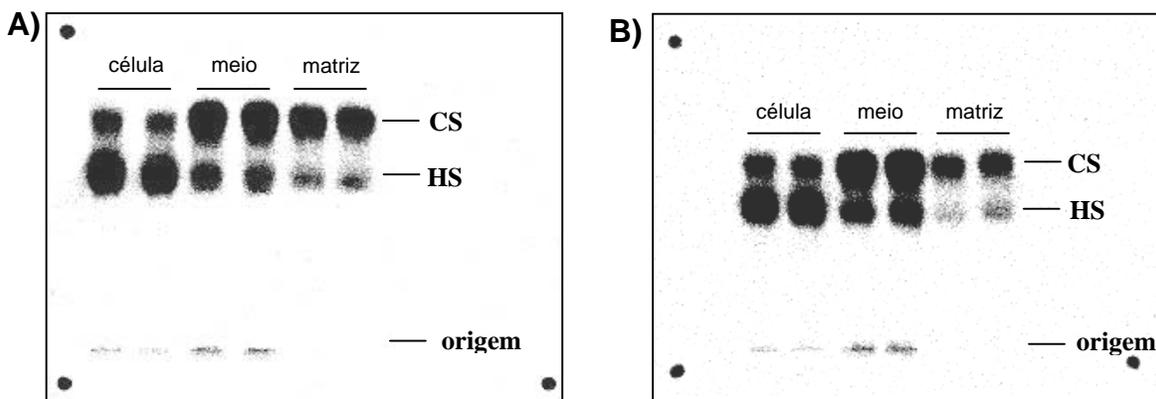


Figura 20. Glicosaminoglicanos sintetizados pela linhagem Caco-2 controle e com meio condicionado. A) Grupo controle cultivado por três dias em meio DMEM com 10%SFB. B) Linhagem Caco-2 cultivada três dias em meio condicionado de fibroblastos. No 4º dia, os dois grupos foram cultivados por 24h na presença de $[^{35}\text{S}]$ -Sulfato de Sódio. Os glicosaminoglicanos metabolicamente marcados foram analisados por eletroforese em gel de agarose em tampão PDA, após exposição do gel a um filme radiosensível por 24h. Os experimentos foram realizados em duplicata em pelo menos dois experimentos independentes. (CS = condroitim sulfato; HS = heparam sulfato).

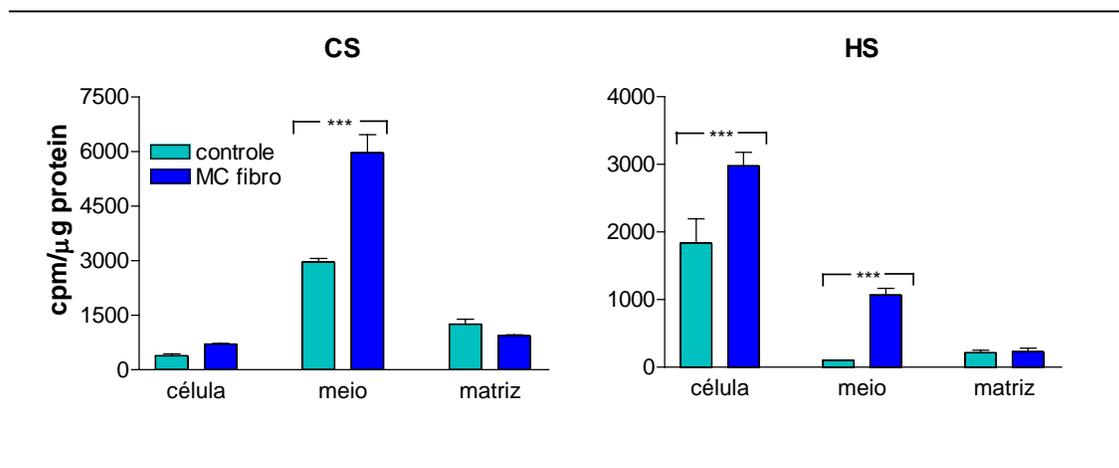


Figura 21. Efeito do meio condicionado de fibroblastos sobre a síntese de GAGs na linhagem Caco-2 em cultura. Os gráficos representam os géis de PDA (Figura 20) da linhagem Caco-2 do grupo controle, cultivado em DMEM com 10%SFB e do grupo com meio condicionado de fibroblastos, após três dias em cultura. Resultados de duplicatas de pelo menos dois experimentos independentes e expressos como a média \pm desvio padrão contados em cpm por μg de proteína. One-way ANOVA (and nonparametric) Bonferroni's Multiple Comparison Test. (MC fibro = meio condicionado de fibroblastos; CS = condroitim sulfato; HS = heparam sulfato; *** = $p < 0,001$).

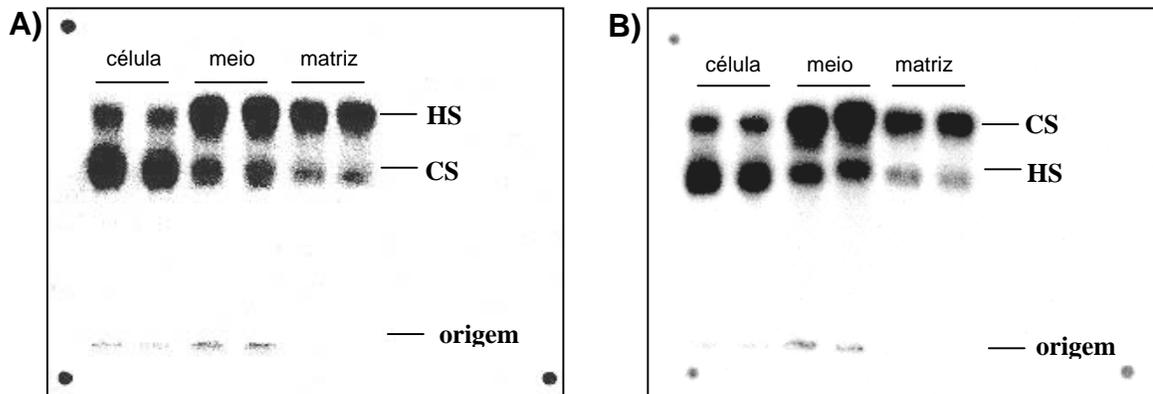


Figura 22. Glicosaminoglicanos sintetizados pela linhagem Caco-2 controle e no sistema *Transwell*[®]. A) Grupo controle cultivado por três dias em meio DMEM com 10%SFB. B) Linhagem Caco-2 cocultivada três dias com fibroblastos em sistema *Transwell*[®]. No 4º dia, os dois grupos foram cultivados por 24h na presença de [³⁵S]-Sulfato de Sódio. Os glicosaminoglicanos metabolicamente marcados foram analisados por eletroforese em gel de agarose em tampão PDA, após exposição a um filme radiosensível por 24h. Os experimentos foram realizados em duplicata em pelo menos dois experimentos independentes. (CS = condroitim sulfato; HS = heparam sulfato).

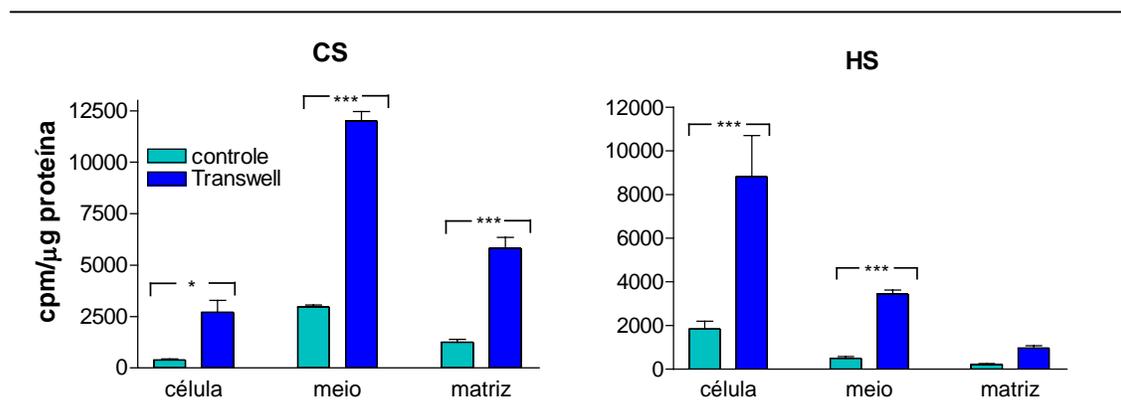


Figura 23. Efeitos da co-cultura de Caco-2 e fibroblastos em Sistema *Transwell*[®] na síntese de GAGs da linhagem Caco-2 em cultura. Os gráficos representam os géis de PDA (Figura 22) da linhagem Caco-2 do grupo controle, cultivado em DMEM com 10%SFB e do grupo cocultivado com fibroblastos, em sistema *Transwell*[®], após três dias em cultura. Resultados de duplicatas de pelo menos dois experimentos independentes e expressos como a média \pm desvio padrão contados em cpm por μ g de proteína. One-way ANOVA (and nonparametric) Bonferroni's Multiple Comparison Test. (CS = condroitim sulfato; HS = heparam sulfato; * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$).

A Tabela 5, a seguir, representa de modo sumarizado as diferenças estatísticas na síntese de GAGs dos fibroblastos e da linhagem Caco-2, com meio condicionado e no sistema *Transwell*, em relação ao grupo controle:

linhagem	interação	célula			meio			matriz	
		CS	DS	HS	CS	DS	HS	CS	HS
Fibroblastos	MC Caco-2				***	***	***		
	<i>Transwell</i>		***	***	***		**	*	
Caco-2	MC fibro			***	***		***		
	<i>Transwell</i>	*		***	***		***	***	

Tabela 5. Sumarização da alteração na síntese de GAGs dos fibroblastos e da linhagem Caco-2. Resumo das diferenças estatísticas dos grupos com meio condicionado e co-cultura *Transwell*[®] em relação aos grupos controles. One-way ANOVA (and nonparametric) Bonferroni's Multiple Comparison Test. (MC Caco-2 = meio condicionado da linhagem Caco-2; MC fibro = meio condicionado dos fibroblastos; *** = $p < 0,001$; ** = $p < 0,01$; * = $p < 0,05$).

Após a interação fibroblastos-Caco-2, as alterações mais expressivas na síntese de GAGs ocorrem no meio de cultura de ambas as linhagens, tanto com meio condicionado, como na co-cultura *Transwell* (tabela 5).

No gráfico a seguir (Figura 24) re-apresentamos os dados dos gráficos anteriores mostrando os GAGs liberados para o meio de cultura de ambas as linhagens celulares, após interação estroma-câncer (figura 24).

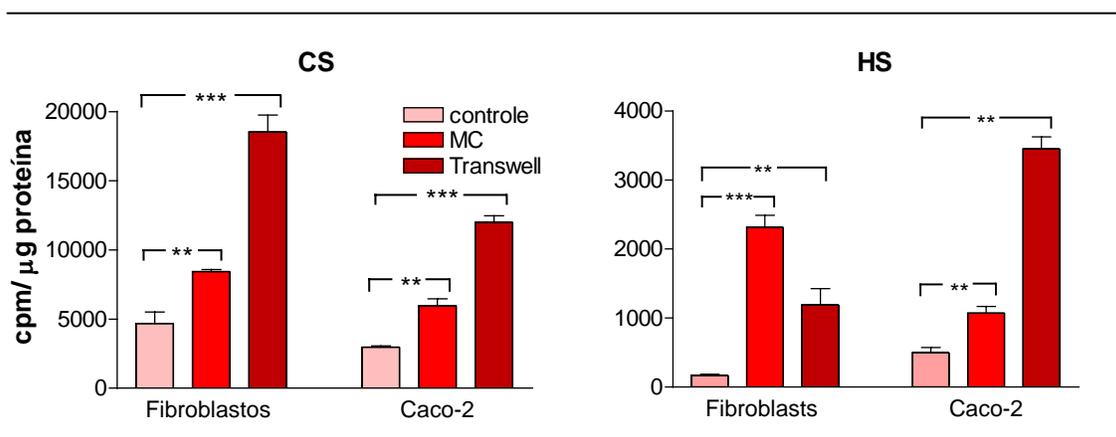


Figura 24. Secreção de condroitim sulfato e heparam sulfato no meio de cultura dos fibroblastos e de Caco-2. Os gráficos representam os géis de PDA dos fibroblastos e da linhagem Caco-2 nos grupos: controle (cultivados em DMEM com 10% SFB); MC (com meio condicionado) e *Transwell*[®] (cocultivados em sistema *Transwell*[®]). Resultados de duplicatas de pelo menos dois experimentos independentes, expressos como a média ± desvio padrão contados em cpm por µg de proteína. One-way ANOVA (and nonparametric) Bonferroni's Multiple Comparison Test. (MC = meio condicionado; CS = condroitim sulfato; HS = heparam sulfato; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

Tanto nas condições de utilização de meio condicionado, quanto no sistema *Transwell*, um grande aumento na síntese e secreção de CS e HS ao meio extracelular, foi observado nos fibroblastos e na Caco-2. No entanto, é notável a potencialização deste efeito no sistema *Transwell*. Exceção foi conservada para HS dos fibroblastos, onde o meio condicionado apresentou uma maior quantidade desses GAGs.

A Figura 24, aliada a todo esse conjunto de resultados, mostra que o sistema *Transwell* permitiu mais do que o fornecimento de fatores solúveis secretados pelas células, como é o caso do meio condicionado. Provavelmente configurando um *crosstalking* entre as linhagens, permitindo a troca ativa de fatores solúveis, e assim simulando *in vitro*, uma das condições que ocorre durante a carcinogênese.

5.2. Crescimento Celular na Interação Estroma-Câncer

Como demonstramos, a interação estroma-câncer ocasionou aumento da síntese de GAGs nos fibroblastos e na linhagem Caco-2. Para determinar se esta interação afetaria também a proliferação celular, usamos o ensaio MTT para quantificar o número de células num período de 7 dias.

5.2.1. Efeito da Linhagem Caco-2 no Crescimento de Fibroblastos com Meio Condicionado e Cocultivados no Sistema *Transwell*

O crescimento dos fibroblastos diminuiu de maneira estatisticamente significativa para os grupos com meio condicionado da linhagem Caco-2 (CM) em relação ao controle com 10%SFB (figura 25A). Nem mesmo a suplementação do meio condicionado com 10%SFB, restabeleceu o crescimento celular dos fibroblastos com meio condicionado.

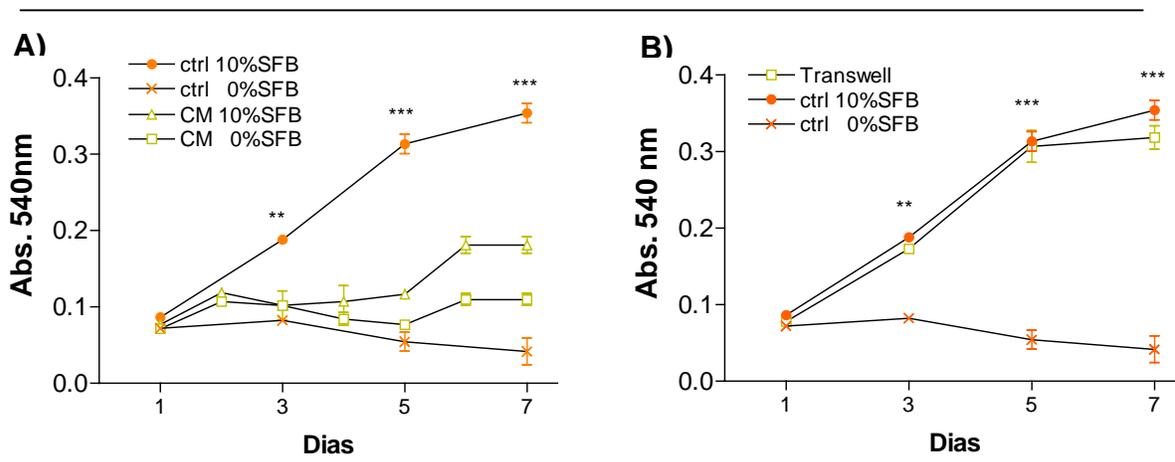


Figura 25. Crescimento dos fibroblastos quantificada pelo ensaio MTT. Os controles foram cultivados em meio sem soro (-X-) e com 10% de SFB (-●-). A) Fibroblastos na presença de meio condicionado de Caco-2 com soro (-Δ-) e sem soro (-□-). B) Fibroblastos no sistema *Transwell*[®] de co-cultura com a linhagem Caco-2 com soro (-□-). Cada ponto representou a média ± desvio padrão de 6 replicatas de dois experimentos independentes. Teste estatístico: One-way ANOVA (and nonparametric) Tukey's Multiple Comparison Test. (ctrl = controle; CM = meio condicionado; SFB = soro fetal bovino; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

O meio condicionado de Caco-2 inibiu o crescimento de fibroblastos com ou sem soro, quando comparado com o grupo controle com 10% SFB (figura 25A). A partir do 3° dia, todos os outros grupos (controle sem soro, meio condicionado sem e com soro) foram estatisticamente diferentes do controle com 10% SFB.

A co-cultura com Caco-2 em sistema *Transwell*[®] não afetou o crescimento dos fibroblastos, haja vista que não há diferença estatística quando comparamos a co-cultura e o grupo controle com 10% SFB (figura 25B). A partir do 3° dia ($p < 0,01$), 5° e 6° dias ($p < 0,001$) os grupos controle (10% SFB) e o cocultivado no *Transwell*[®] foram estatisticamente diferentes do controle com 0% SFB.

5.2.2. Crescimento da Linhagem Caco-2 com Meio Condicionado de Fibroblastos e em Co-cultura no Sistema *Transwell*

Realizamos o ensaio MTT para avaliar alterações no crescimento celular da linhagem Caco-2 cultivada em meio condicionado de fibroblastos e em sistema *Transwell* de co-cultura.

A proliferação de Caco-2 foi estatisticamente aumentada nos grupos com meio condicionado (com ou sem soro) em relação ao controle com 10% de soro fetal

bovino (SFB), no 3° e 5° dias (figura 26A). No 7° dia, a proliferação dos grupos com meio condicionado e controle (10% SFB), não apresentaram diferença na proliferação. Todos os grupos apresentaram proliferação estatisticamente maior que o controle sem soro ($p < 0,001$) (figura 26A).

No 3° dia ($p < 0,01$), 5° e 7° dias ($p < 0,01$), a proliferação da linhagem Caco-2 no sistema *Transwell*, apresentou aumento estatisticamente significativo quando comparada com o controle cultivado em 10% SFB (figura 26B).

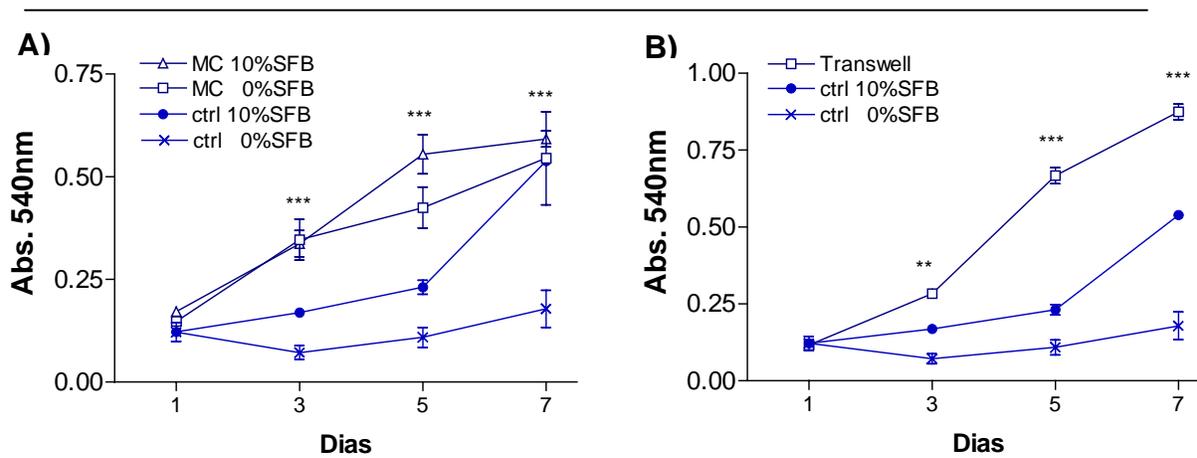


Figura 26. Crescimento das células da linhagem Caco-2 quantificada pelo ensaio MTT. Os controles foram cultivados em DMEM sem soro (-X-) e com 10% de SFB (-●-). A) Caco-2 na presença de meio condicionado de fibroblastos com soro (-Δ-) e sem soro (-□-). B) Caco-2 no sistema *Transwell*® de co-cultura com os fibroblastos com soro (-□-). Cada ponto representou a média de 6 replicatas ± desvio padrão de dois experimentos independentes. Teste estatístico: One-way ANOVA (and nonparametric) Tukey's Multiple Comparison Test. (ctrl = controle; MC = meio condicionado; SFB = soro fetal bovino; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

Analisando o 7° dia do experimento, o meio condicionado dos fibroblastos não ocasionou aumento no crescimento da linhagem de adenocarcinoma colorretal humano, já a co-cultura no sistema *Transwell*, aumentou significativamente a proliferação desta linhagem.

Com base nestes dados e nos resultados da síntese de GAGs, podemos inferir que o sistema *Transwell* ocasiona maior aumento da síntese de GAGs e no crescimento das linhagens estudadas, quando comparado ao meio condicionado.

Devido a estes resultados, os demais experimentos para investigar a relação estroma-câncer, foram realizados apenas no sistema *Transwell* de co-cultura.

5.3. Influência da Interação Parácrina na Síntese de Proteoglicanos

O aumento de condroitim sulfato na matriz extracelular dos fibroblastos ($p < 0,05$) e da linhagem Caco-2 ($p < 0,001$), durante a interação parácrina (tabela 5, página 72), nos levou a analisar o versicam, um importante PGCS de matriz extracelular, como citado na introdução.

5.3.1. Análise do Proteoglicano Versicam na Matriz Extracelular das Linhagens Cocultivadas em Sistema *Transwell*

As células foram examinadas por Microscopia Confocal de Fluorescência, para a visualização do proteoglicano versicam nas linhagens estudadas. Observamos maior marcação de versicam dos fibroblastos controle (figura 27A), quando comparados com o controle da linhagem Caco-2 (figura 27C), o que aponta maior quantidade de versicam na matriz extracelular dos fibroblastos. Como já foi apresentado na introdução, o proteoglicano versicam, assim como o biglicam e o decorim são mais abundantes em tecidos conjuntivos e células relacionadas, como células endoteliais e fibroblastos (Iozzo & Murdoch, 1996). Observamos ainda, um aumento muito mais acentuado de marcação dos fibroblastos que foram cocultivados com a linhagem Caco-2 em sistema *Transwell* (figura 27B) quando comparado ao grupo controle (figura 27A). A linhagem Caco-2 cocultivada com os fibroblastos (figura 27D) também apresenta aumento da marcação de versicam, porém menor do que a apresentada pelos fibroblastos cocultivados.

Estes resultados corroboram com os obtidos com [^{35}S]-sulfato de sódio, mostrando que os fibroblastos são os responsáveis pela secreção de grande parte do CS no meio e matriz extracelular, com um surpreendente aumento dessa síntese após interação parácrina com as células Caco-2.

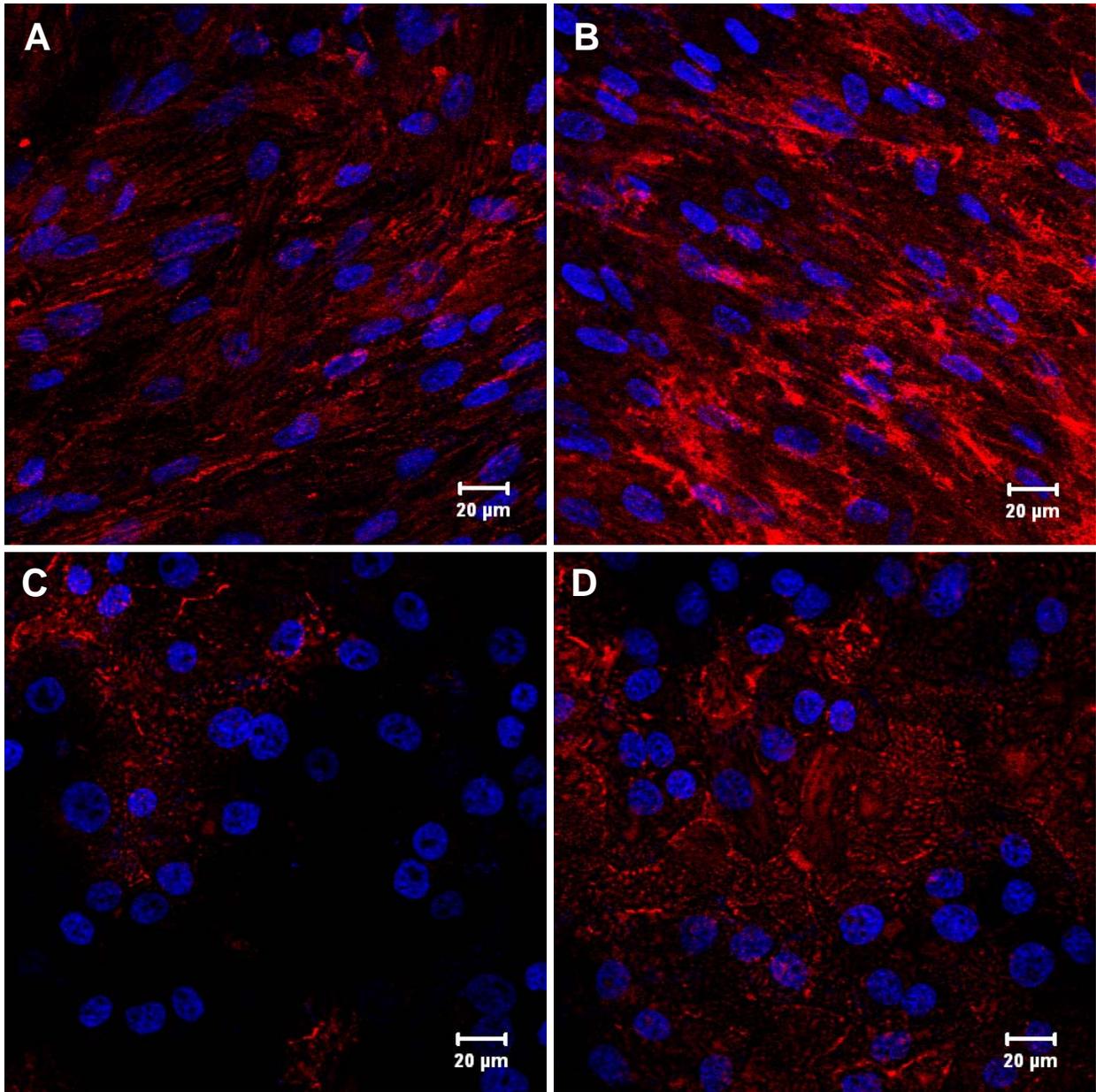


Figura 27. Análise do proteoglicano versican na interação parácrina Caco-2 - fibroblastos por imunofluorescência. Grupos controles fibroblastos (A) e Caco-2(C); células cocultivadas em sistema *Transwell*[®] por três dias fibroblastos (B) e linhagem Caco-2 (D). Painel A, B: versican da matriz extracelular de fibroblastos (vermelho). Painel C, D: versican da matriz extracelular de Caco-2 (vermelho). As células foram tratadas como descrito anteriormente, fixadas com paraformaldeído e marcadas com anticorpo anti-versican humano e Alexa Flúor 596 conjugado com anticorpo anti-mouse IgG. As células foram contra-coradas com 4-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) para detectar o núcleo (azul).

5.4. Análise da Expressão Gênica de Proteoglicanos de Superfície e de Matriz Extracelular durante Interação Parácrina entre Fibroblastos e Células Caco-2.

A análise da expressão gênica de proteoglicanos foi realizada num primeiro momento, com intuito de confirmar os resultados obtidos pela imunofluorescência, que revelaram aumento da marcação do versicam (isoforma v1), em ambas as linhagens, após interação parácrina entre fibroblastos e células Caco-2.

Inicialmente analisamos a expressão do versicam, e posteriormente também investigamos a expressão de dois outros PGs de matriz extracelular, biglicam e decorim. Como representante de PGs de superfície celular, investigamos a família do sindecam (sindecans-1, -2, -3 e -4). Estes PGs foram escolhidos para análise da expressão do *core* protéico, devido ao fato de, entre outros, estarem envolvidos na interação parácrina câncer-estroma.

O estudo da expressão dos genes de interesse foi realizado por RT-PCR em tempo real a partir de cDNA obtido pela transcrição reversa de mRNA obtidos das linhagens celulares Caco-2 e fibroblastos. Antes de iniciar as reações de RT-PCR em tempo real, a expressão destes genes foi analisada por RT-PCR semi-quantitativo para nos certificarmos de que eram expressos (dados não mostrados).

5.4.1. Expressão do Esqueleto Protéico dos Sindecans, Biglicam, Decorim e Versicam (v1) nos fibroblastos

O cocultivo dos fibroblastos com a linhagem Caco-2 em sistema *Transwell*, não alterou a expressão dos sindecans-1,-2,-3 e -4 nos fibroblastos. A expressão dos membros da família do sindecam pelos fibroblastos mostra que não ocorre alteração após interação parácrina com a linhagem Caco-2 (figura 28). Entretanto, as expressões dos PGs de matriz extracelular [biglicam, decorim e versicam (v1)] aumentam após interação parácrina com a linhagem de câncer, de maneira estatisticamente significativa (figura 28).

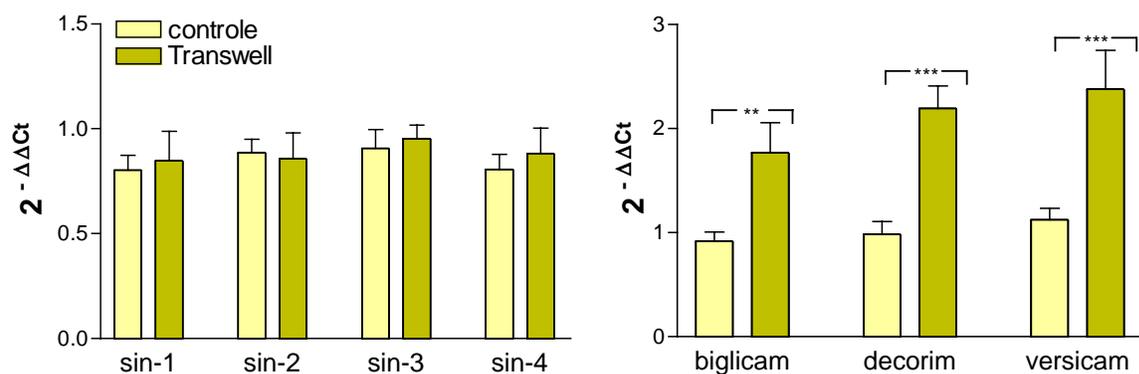


Figura 28. Expressão dos sindecans, biglicam, decorim e versicam (v1) nos fibroblastos durante interação parácrina com a linhagem Caco-2. O nível de expressão de cada gene foi normalizado pela expressão de β -actina. Os dados de cada experimento foram obtidos em triplicata e são apresentados como média \pm desvio padrão. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes se $p < 0,05$. Teste estatístico: One-way ANOVA (and nonparametric) Bonferroni's Multiple Comparison Test. (sin-1 = sindecam 1; sin-2 = sindecam 2; sin-3 = sindecam 3; sin-4 = sindecam 4; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

Versicam é o PG de matriz, dentre os estudados, que foi mais expresso nos fibroblastos durante a interação parácrina com a linhagem Caco-2 (figura 28). A expressão do biglicam após interação com Caco-2 é comparativamente mais baixa, contudo, este PG também sofre aumento estatisticamente significativo quando comparado ao grupo controle.

5.4.2. Expressão do Esqueleto Protéico dos Sindecans, Biglicam, Decorim e Versicam (v1) na Linhagem Caco-2

A expressão da família do sindecam pela linhagem Caco-2 mostra um perfil distinto após a interação parácrina com os fibroblastos. O nível de expressão do sindecam-2 e -4 diminui, sendo estatisticamente diferente do nível de expressão no controle. A expressão dos sindecans-1 e -3 não apresenta alteração após interação parácrina (figura 29).

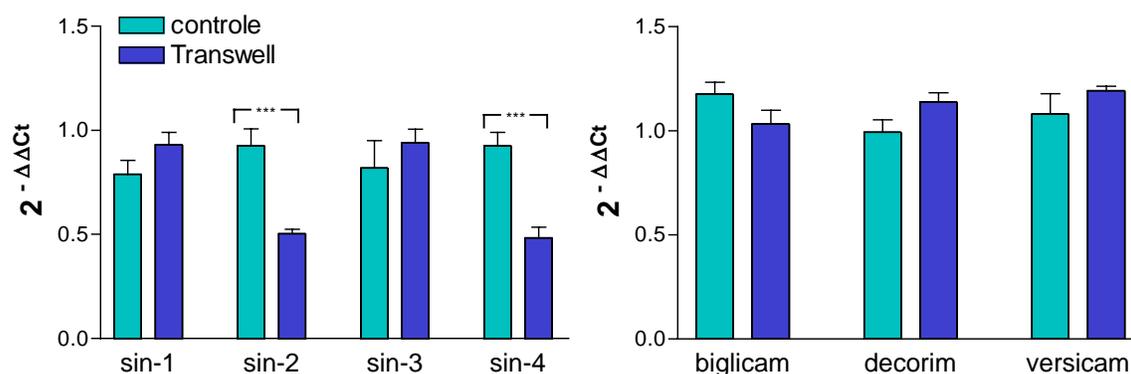


Figura 29. Expressão dos sindecans, biglicam, decorim e versicam (v1) na linhagem Caco-2 durante interação parácrina com fibroblastos. O nível de expressão de cada gene foi normalizado pela expressão de β -actina. Os dados de cada experimento foram obtidos em triplicata e são apresentados como média \pm desvio padrão. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes se $p < 0,05$. Teste estatístico: One-way ANOVA (and nonparametric) Bonferroni's Multiple Comparison Test. (sin-1 = sindecam 1; sin-2 = sindecam 2; sin-3 = sindecam 3; sin-4 = sindecam 4; *** = $p < 0,001$).

A expressão do mRNA do versicam da Caco-2, quando co-cultivadas em *Transwell*, não apresentou alteração estatisticamente significativa em comparação ao controle (Figura 29), em desacordo com o aumento de versicam detectado nas células Caco-2, por imunofluorescência (figura 27D, página 77). Nessas condições, também não houve diferença de expressão de biglicam e decorim pelas células Caco-2.

5.5. TGF- β 1 Exógeno na Síntese de Glicosaminoglicanos dos Fibroblastos e da Linhagem Caco-2

Com o objetivo de investigarmos se o fator de crescimento transformante- β 1 (TGF- β 1) estaria participando das alterações observadas na síntese de GAGs da linhagem Caco-2 e dos fibroblastos, após interação parácrina, adicionamos TGF- β 1 exógeno, nessas culturas. Os GAGs sintetizados foram analisados por incorporação de [³⁵S]-sulfato de sódio (Figura 30). As células foram incubadas com TGF- β 1 nas seguintes concentrações (2 ng/ml; 4 ng/ml e 8 ng/ml) em meio sem soro.

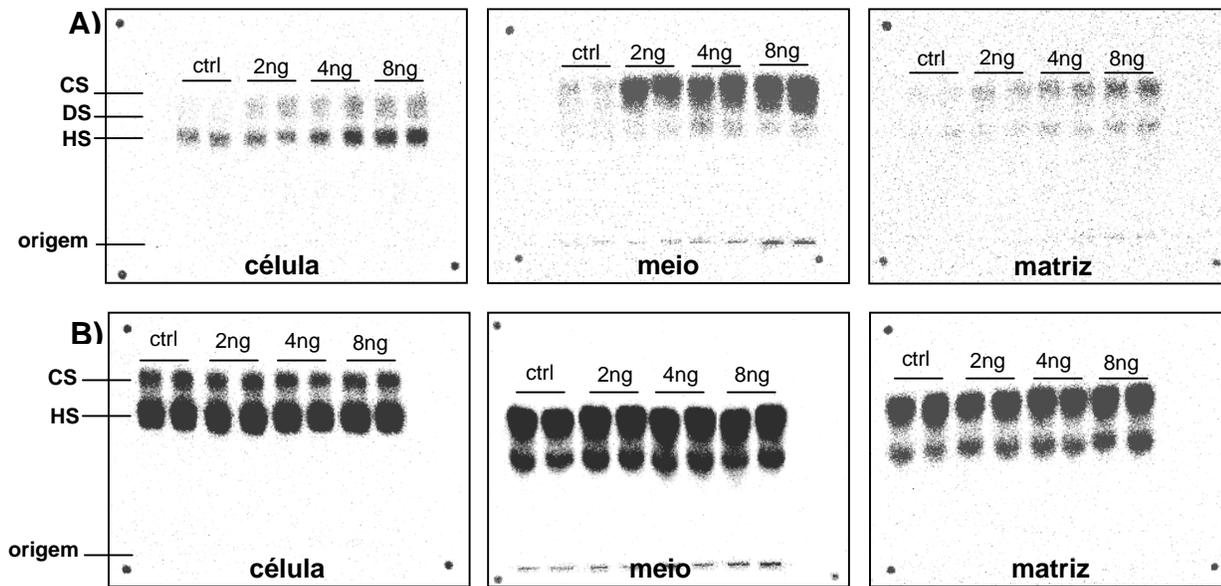


Figura 30. Glicosaminoglicanos sintetizados pelos fibroblastos e pela linhagem Caco-2 com TGF- β 1 exógeno. As células foram tratadas com TGF- β 1 por 24h nas concentrações 2 ng/ml; 4ng/ml e 8ng/ml em meio de cultura sem soro (como descrito em materiais e métodos). A) Fibroblastos e B) linhagem Caco-2 cultivados por 24h na presença de [35 S]-Sulfato de Sódio. Os glicosaminoglicanos metabolicamente marcados foram analisados por eletroforese em gel de agarose em tampão PDA, após coloração o gel foi exposto a um filme radiosensível por 24h. Os experimentos foram realizados em duplicata em pelo menos dois experimentos independentes (ctrl = controle; CS = condroitim sulfato; DS = dermatam; HS = heparim sulfato).

Os controles foram cultivados em meio sem soro sob as mesmas condições dos grupos incubados com TGF- β 1, o que ocasionou uma fraca marcação radioativa dos GAGs nos fibroblastos controle (figura 30A). Isso se deve ao fato das linhagens normais apresentarem soro dependência maior que as linhagens de câncer.

Um acentuado efeito do TGF- β 1 ocorreu sobre a síntese de CS, sendo dose-dependente e ocorrendo principalmente nos fibroblastos (Figura 31), apresentando um aumento estatisticamente significativo, tanto nas células, como no meio de cultura e matriz extracelular. Até mesmo nas concentrações mínimas de TGF- β 1 (2ng/ml) observamos efeito sobre a síntese de GAGs dos fibroblastos (Figura 31). Já HS e DS nos fibroblastos, apresentaram aumento significativo apenas nas concentrações mais elevadas de 4 e 8 ng/ml.

Nas células Caco-2 apenas o CS do meio apresentou um aumento significativo, em todas as concentrações testadas, sendo que a síntese do HS foi completamente indiferente ao efeito do TGF- β 1.

Estes resultados sugerem fortemente o envolvimento do TGF- β 1 com a síntese do condroitim sulfato, principalmente nos fibroblastos.

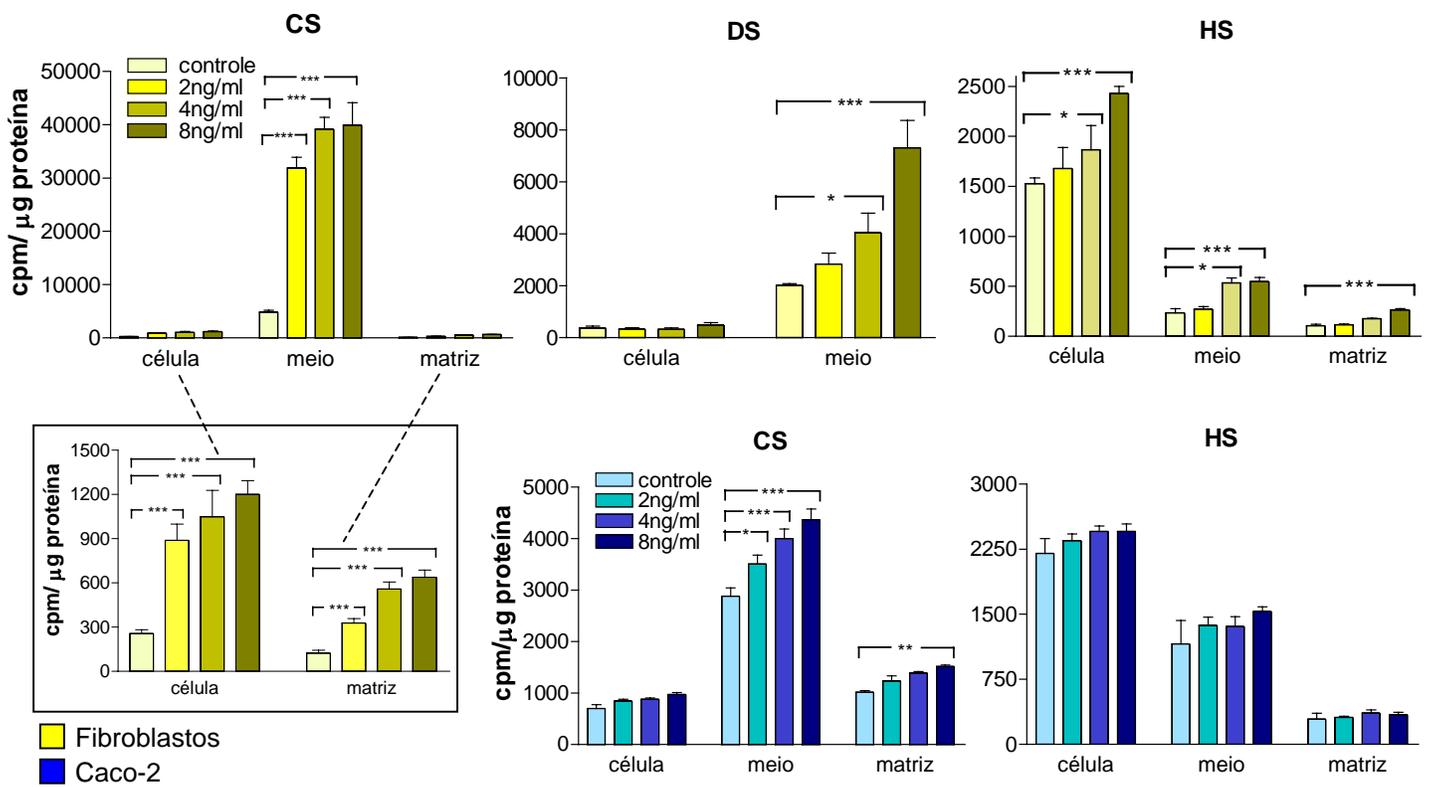


Figura 31. Efeito do TGF- β 1 na síntese de GAGs dos fibroblastos e da linhagem Caco-2. Gráficos representativos dos géis de PDA (figura 30) dos fibroblastos e da linhagem Caco-2 do grupo controle sem soro e dos grupos tratados com TGF- β 1 por 24h nas concentrações 2 ng/ml; 4ng/ml e 8 ng/ml em meio de cultura sem soro. Resultados de duplicatas de dois experimentos independentes e expressos como a média \pm desvio padrão, quantificados em cpm por μ g de proteína. Teste estatístico: One-way ANOVA (and nonparametric) Bonferroni's Multiple Comparison Test. (CS = condroitim sulfato; DS = dermatam sulfato; HS = heparam sulfato; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

5.6. Caracterização dos GAGs Sulfatados em duas linhagens de Câncer Colorretal Humano *in vitro*

Dois linhagens celulares de câncer colorretal humano com potencial metastático crescente, Caco-2 e HCT-116 foram investigadas com relação à síntese de glicosaminoglicanos. A produção de GAGs foi analisada por marcação com [^{35}S]-sulfato de sódio, separação por eletroforese em gel de agarose, detecção e quantificação no Cyclone®, descritos em *Métodos*.

Uma linhagem de epitélio intestinal de rato, IEC-6 (Redondo *et al.*, 2004) foi utilizada como controle. Apesar da linhagem IEC-6 não ser derivada de cólon, é a célula intestinal normal melhor caracterizada, e tem sido amplamente usada para comparar diversas propriedades com as de epitélio de cólon (Quaroni *et al.*, 1979; McKaig *et al.*, 1999; Redondo *et al.*, 2004).

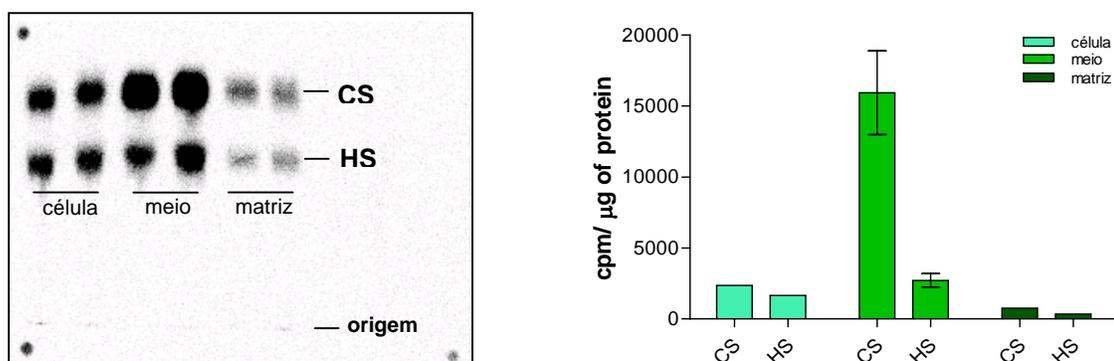


Figura 32. Síntese de glicosaminoglicanos sulfatados na linhagem IEC. Linhagem de intestino normal (IEC-6), cultivada por três dias em meio com 10%SFB. No 4º dia, os GAGs foram submetidos a marcação metabólica com $^{35}\text{S}\text{-Na}_2\text{SO}_4$ e quantificados como descrito em *Métodos*. O gráfico à direita representa os resultados de duplicatas de pelo menos dois experimentos independentes e expressos como a média \pm desvio padrão, dos GAGs quantificados em cpm por μg de proteína.

As células IEC-6 sintetizam uma quantidade um pouco maior de CS do que HS na superfície celular (célula) e na matriz extracelular (Figura 32), e secretam para o meio de cultura uma quantidade cinco vezes maior de CS quando comparado ao HS (Figura 32).

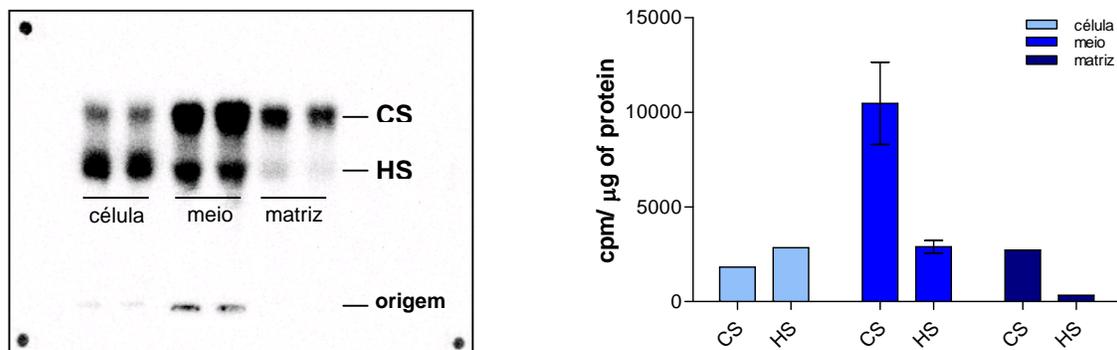


Figura 33. Síntese de glicosaminoglicanos sulfatados na linhagem Caco-2. Linhagem de carcinoma colorretal humano (Caco-2) cultivada por três dias em meio com 10%SFB. No 4º dia, os GAGs foram submetidos a marcação metabólica com $^{35}\text{S-Na}_2\text{SO}_4$ e quantificados como descrito em *Métodos*. O gráfico à direita representa os resultados de duplicatas de pelo menos dois experimentos independentes e expressos como a média \pm desvio padrão, dos GAGs quantificados em cpm por μg de proteína.

Na linhagem Caco-2, ocorre o predomínio de CS na matriz e no meio extracelular (3,5 vezes mais que HS), enquanto a quantidade de HS na superfície celular (célula) é maior (Figura 33).

As células HCT-116 quando comparadas a IEC-6 e a Caco-2, levam mais tempo para aderir a placa de cultura e se desprendem mais facilmente sob a ação da tripsina. Estas características podem ter relação com a baixa quantidade de GAGs encontrada na matriz extracelular (Figura 34). A HCT-116 sintetiza quantidades proporcionais de CS e HS na superfície celular, porém no meio de cultura maior proporção de CS foi encontrado.

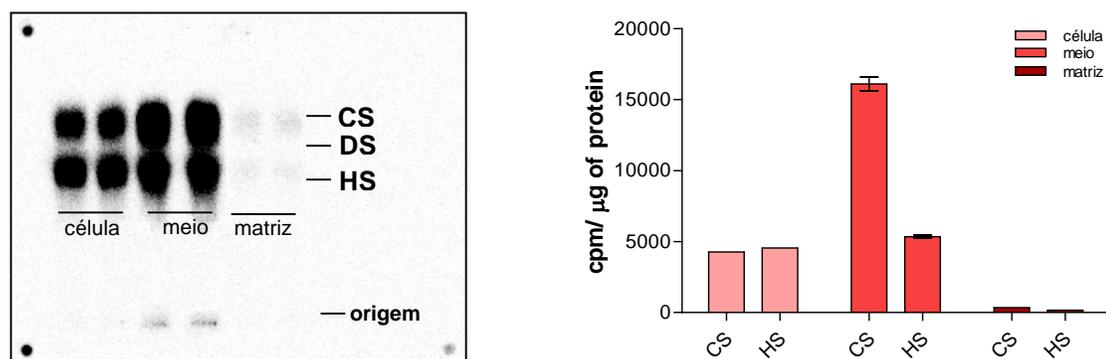


Figura 34. Síntese de glicosaminoglicanos sulfatados na linhagem HCT-116. Linhagem de adenocarcinoma colorretal humano (HCT-116) cultivada por três dias em meio com 10%SFB. No 4º dia, os GAGs foram submetidos a marcação metabólica com $^{35}\text{S-Na}_2\text{SO}_4$ e quantificados como descrito em *Métodos*. O gráfico à direita representa os resultados de duplicatas de pelo menos dois experimentos independentes e expressos como a média \pm desvio padrão, dos GAGs quantificados em cpm por μg de proteína.

5.7. Comparação da Síntese dos Glicosaminoglicanos Sulfatados nas Três Linhagens

Na comparação entre as três linhagens analisadas (Figura 35) é possível observar que as células HCT-116 sintetizam maiores quantidades de CS e HS de superfície celular. No entanto, a matriz extracelular da HCT116 apresentou os menores índices de GAGs, como já apresentado anteriormente. De maneira geral, poderíamos dizer que quanto maior o potencial metastático, maior a síntese de CS e HS localizado na superfície celular e HS no meio de cultura.

Curiosamente, o HS na célula e no meio de cultura aumentam proporcionalmente ao potencial metastático das linhagens estudadas.

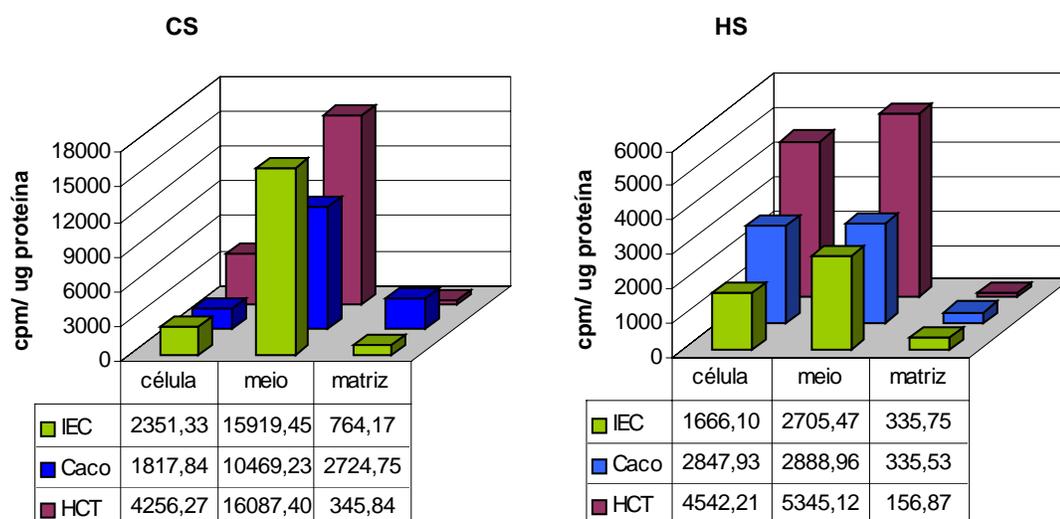


Figura 35. Síntese de CS e HS nas linhagens IEC, Caco-2 e HCT-116. As linhagens foram cultivadas por três dias em meio com 10%SFB para análise da síntese de GAGs sulfatados. No 4º dia, os GAGs foram submetidos a marcação metabólica com $^{35}\text{S-Na}_2\text{SO}_4$ e quantificados como descrito em *Métodos*. Os gráficos representam os resultados da média de duplicatas de pelo menos dois experimentos independentes, expressos em cpm por μg de proteína. O desvio padrão das amostras foi apresentado nos gráficos anteriores (Figuras 32, 33 e 34).

5.8. Degradação das cadeias de heparam sulfato das linhagens IEC-6, Caco-2 e HCT-116.

Análise da estrutura das cadeias de heparam sulfato das linhagens IEC-6, Caco-2 e HCT-116 foi realizada com as enzimas específicas heparitinasas I e II de *Flavobacterium heparinum*. Os produtos foram separados por cromatografia descendente em papel e detectados no Cyclone®, por Phospho Image (Figura 36).

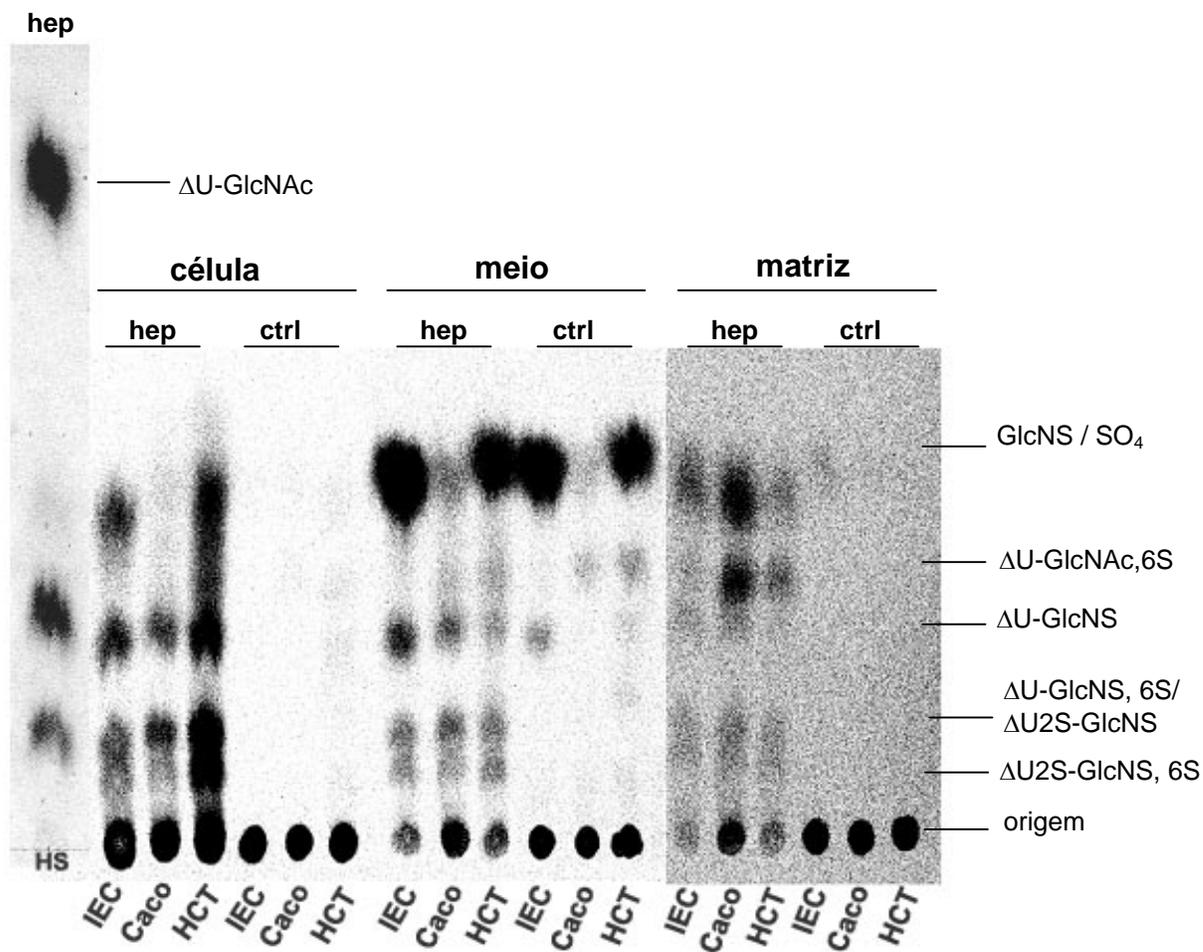
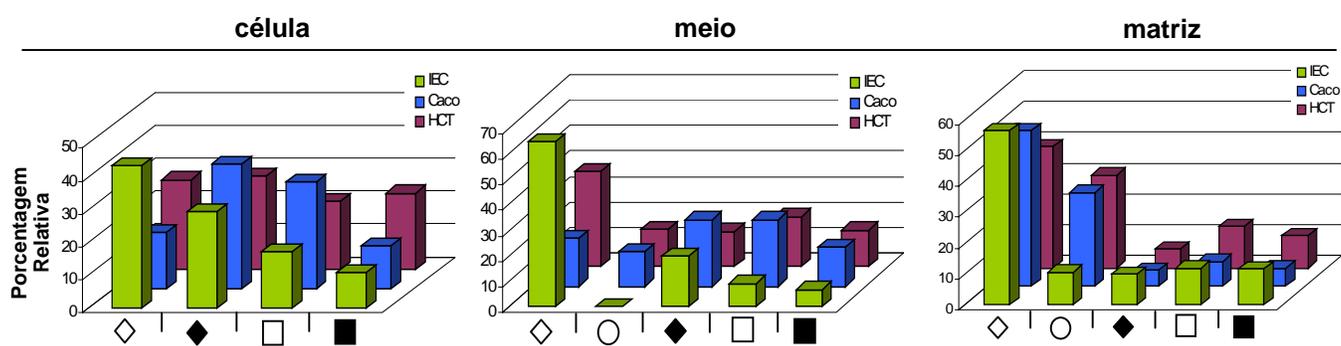


Figura 36. Produtos da degradação do HS nas linhagens IEC, Caco-2 e HCT-116. Após incubação com heparitinasas I e II, as amostras foram aplicadas em papel Whatman como descrito anteriormente em *Métodos*. O HS (sem marcação radioativa) foi usado como padrão de degradação. Além da incubação com as heparitinasas, as amostras foram incubadas com água (ctrl), para obtenção do controle de amostras não degradadas. (hep= heparitinase I e II; ctrl=controle; GlcNAc= N-acetil-glucosamina; GlcNS= glucosamina N-sulfatada, ΔU-GlcNS= ácido urônico - glucosamina N-sulfatada; ΔU-GlcNAc,6S= ácido glucurônico - N-acetil-glucosamina-6-sulfato; ΔU-GlcNS,6S/ΔU2S-GlcNS= ácido urônico-glucosamina N,6-sulfato/ ácido idurônico, 2-sulfato - glucosamina N-sulfato; ΔU2S-GlcNS, 6S= ácido idurônico, 2-sulfato - Glucosamina, N,6-sulfato).

Nas condições experimentais utilizadas, o sulfato inorgânico co-migra com GlcNS. Nos experimentos controles, que consistem dos substratos incubados com água, podemos constatar que os GAGs-³⁵S da superfície celular (célula) e matriz estão livres de [³⁵S]-sulfato de sódio não incorporado, que foi eliminado na diálise. No entanto, nos GAGs-³⁵S do meio, constatamos contaminação com [³⁵S]-sulfato de sódio livre na IEC-6 e HCT-116. Estes valores foram subtraídos dos valores obtidos com GAG-³⁵S do meio, para comporem a tabela da Figura 37.



	símbolos	◇	○	◆	□	■
		produtos da degradação	GlcNS (%)	ΔU-GlcNAc,6S (%)	ΔU-GlcNS (%)	ΔU-GlcNS,6S/ΔU2S-GlcNS (%)
célula	IEC	42,96	---	29,09	17,15	10,79
	Caco-2	17,10	---	37,69	32,29	12,92
	HCT-116	27,43	---	28,38	20,83	23,36
meio	IEC	64,76	0,00	19,66	9,00	6,58
	Caco-2	18,83	13,54	26,16	26,21	15,26
	HCT-116	37,60	14,79	13,80	19,51	14,30
matriz	IEC	56,25	10,49	9,94	11,68	11,63
	Caco-2	50,37	30,39	5,24	8,08	5,92
	HCT-116	39,36	30,18	6,35	13,49	10,61

Figura 37. Porcentagem relativa das unidades dissacarídicas do HS nas linhagens IEC, Caco-2 e HCT-116. Gráfico e tabela representativos do cromatograma da degradação do HS com heparitinases I e II. A quantidade de dissacarídeos foi quantificada e posteriormente expressa pela porcentagem relativa a soma das unidades dissacarídicas totais de cada linhagem celular. No meio de cultura, os valores expressos para GlcNS foram subtraídos do sulfato inorgânico. Foram realizados pelo menos dois experimentos independentes. Os dados estão expressos em porcentagem relativa, o que justifica a ausência das barras de desvio nos gráficos.

A incubação controle com HS padrão de pâncreas bovino com heparitinasas I e II levou à formação dos dissacarídeos dissulfatados (Δ U-GlcNS,6S/ Δ U2S-GlcNS), dissacarídeos N-sulfatados (Δ U-GlcNS) e dissacarídeos N-acetilados (Δ U-GlcNAc), como previamente esperado (Nader *et al.*, 1990).

Uma quantidade razoável de [³⁵S]-GlcNS foi detectado após ação das heparitinasas. Esses monossacarídeos representam provavelmente o açúcar do terminal não redutor das cadeias de HS, como previamente demonstrado em trabalhos do laboratório (Tersariol *et al.*, 1994).

Em geral, os produtos radioativos Δ U2S-GlcNS,6S (dissacarídeo trissulfatado ou DiTri), Δ U-GlcNS,6S/ Δ U2S-GlcNS (dissacarídeo dissulfatado ou DiDi) e Δ U-GlcNAc,6S estão aumentados na Caco-2 e HCT-116 em todos os compartimentos celulares, quando comparados com a IEC-6.

Muito curioso em nossos resultados, foi a detecção do dissacarídeo Δ U-GlcNAc,6S nas proporções encontradas principalmente na matriz das células Caco-2 e HCT-116. Nas linhagens de câncer colorretal, Caco-2 e HCT116 o aumento de Δ U2S-GlcNS,6S foi observado na superfície celular e no meio de cultura (Figura 37).

5.9. Degradação das Cadeias de Condroitim Sulfato das linhagens IEC-6, Caco-2 e HCT-116.

As figuras 38, 39 e 40 apresentam os produtos de degradação do condroitim sulfato extraídos respectivamente dos compartimentos, superfície celular (célula), meio e matriz, após digestão com condroitinases AC e ABC.

A digestão de condroitim 6-sulfato padrão com condroitinases AC e ABC resultou na formação preferencial de dissacarídeos-6-sulfatados (Δ U-GalNAc,6S). Dermatan sulfato padrão não foi digerido pela condroitinase AC, mas foi degradado pela condroitinase ABC, resultando em dissacarídeos-4-sulfatados (Δ U-GalNAc,4S).

A incubação de GAGs padrões permitiu concluir que ambas as condroitinases não se encontram contaminadas com sulfatases, uma vez que não houve formação de Δ U-GalNAc,0S (dissacarídeos não sulfatados).

O condroitim sulfato radioativo da superfície das células IEC-6, quando incubadas com condroitinases AC e ABC, apresentou dissacarídeos 4-sulfatados (Δ U-GalNAc,4S), mostrando tratar-se de condroitim 4-sulfato (Figura 38).

Um dado muito curioso e intrigante foi verificado com as células Caco-2 e HCT-116, onde além da formação de Δ U-GalNAc,4S (dissacarídeos 4-sulfatados), observou-se ainda a formação de Δ U-GalNAc,6S (dissacarídeos 6-sulfatados), apenas sob ação de condroitinase AC, sendo portanto um Δ U-GalNAc,6S com ácido glucurônico (Figura 38). Além disso, esse dissacarídeo 6-sulfatado não foi liberado sob ação da condroitinase ABC.

O condroitim sulfato radioativo do meio de cultura das células IEC-6, incubadas com condroitinases AC e ABC, também resultou na formação de dissacarídeos 4-sulfatados (Δ U-GalNAc,4S), compatíveis com condroitim 4-sulfato.

Vale ressaltar que o composto que aparece na incubação controle (água) trata-se de sulfato inorgânico não incorporado, e que comigra com Δ U-GalNAc,4S nas condições experimentais utilizadas. Estes valores foram subtraídos dos valores de Δ U-GalNAc,4S para comporem as porcentagens das Tabelas (figuras 38 e 39).

Além disso, no meio de cultura das células Caco-2 e HCT-116 o condroitim sulfato se apresenta 4- e 6-sulfatado, sendo que na Caco-2 Δ U-GalNAc,6S só é formado sob ação da condroitinase AC.

Nas células HCT-116, Δ U-GalNAc,6S foi formado também com condroitinase ABC, indicando que parte do Δ U-GalNAc,6S poderia ser formado de ácido idurônico-GalNAc,6S.

O condroitim sulfato radioativo da matriz extracelular repetiu o padrão observado na superfície e meio extracelular, onde nas células IEC-6 o condroitim sulfato é 4-sulfatado e nas células Caco-2 e HCT-116, 4- e 6-sulfatado.

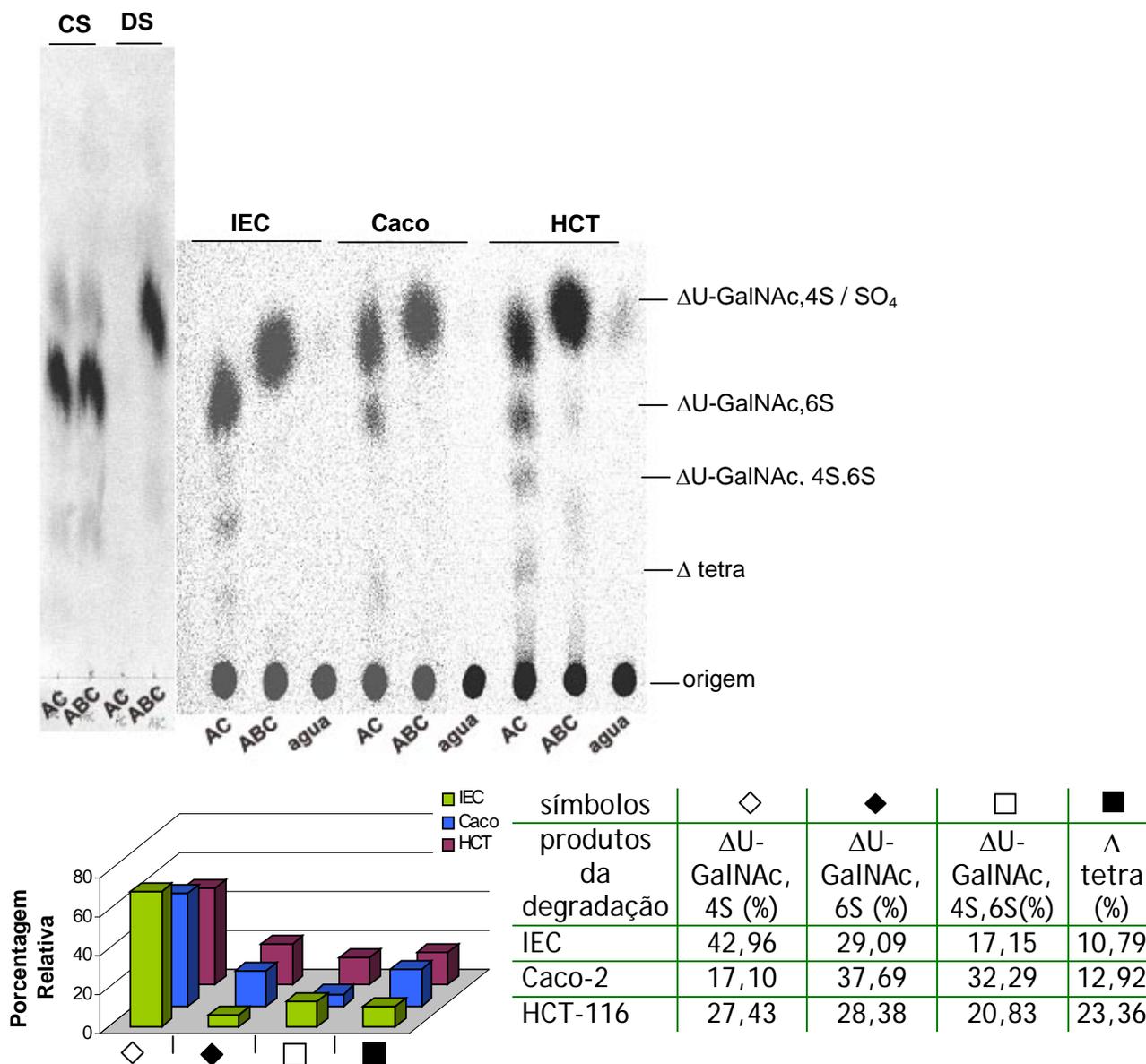


Figura 38. Produtos de degradação do CS da superfície das células das linhagens IEC, Caco-2 e HCT-116. O cromatograma mostra os produtos de degradação do CS da superfície das células, após incubação com as condroitinases AC e ABC. Além da incubação com as condroitinases, as amostras foram incubadas com água (ctrl), para obtenção de amostras não degradadas. As amostras foram aplicadas em papel Whatman® como descrito anteriormente em *Métodos*. Os valores expressos para Δ U-GalNAc,4S foram subtraídos do sulfato inorgânico. O gráfico e a tabela representam os dissacarídeos degradados pela condroitinase AC, quantificados e expressos pela porcentagem relativa à soma das unidades dissacarídicas totais de cada amostra. Foram realizados pelo menos dois experimentos independentes. Os dados estão expressos em porcentagem relativa, o que justifica a ausência das barras de desvio no gráfico.

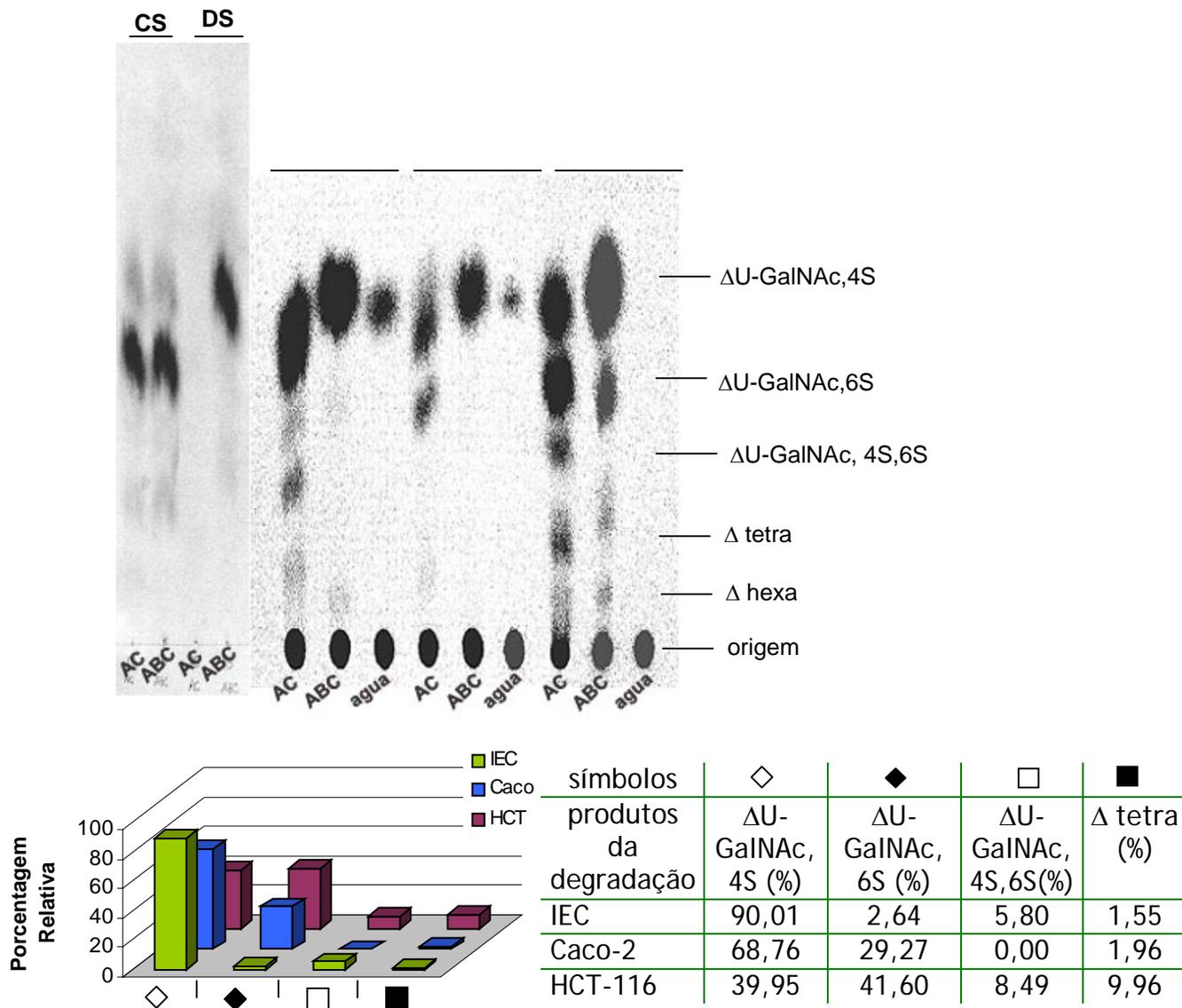


Figura 39. Percentagem relativa das unidades dissacarídicas do CS no meio das linhagens IEC, Caco-2 e HCT-116. O cromatograma mostra os produtos de degradação do CS, no meio de cultura, após incubação com as condroitinases AC e ABC. Além da incubação com as condroitinases, as amostras foram incubadas com água (ctrl), para obtenção do controle de amostras não degradadas. As amostras foram aplicadas em papel Whatman® como descrito anteriormente em *Métodos*. Os valores expressos para ΔU-GalNAc,4S foram subtraídos do sulfato inorgânico. O gráfico e a tabela representam os dissacarídeos degradados pela condroitinase AC, quantificados e expressos pela percentagem relativa à soma das unidades dissacarídicas totais de cada amostra. Foram realizados pelo menos dois experimentos independentes. Os dados estão expressos em percentagem relativa, o que justifica a ausência das barras de desvio no gráfico.

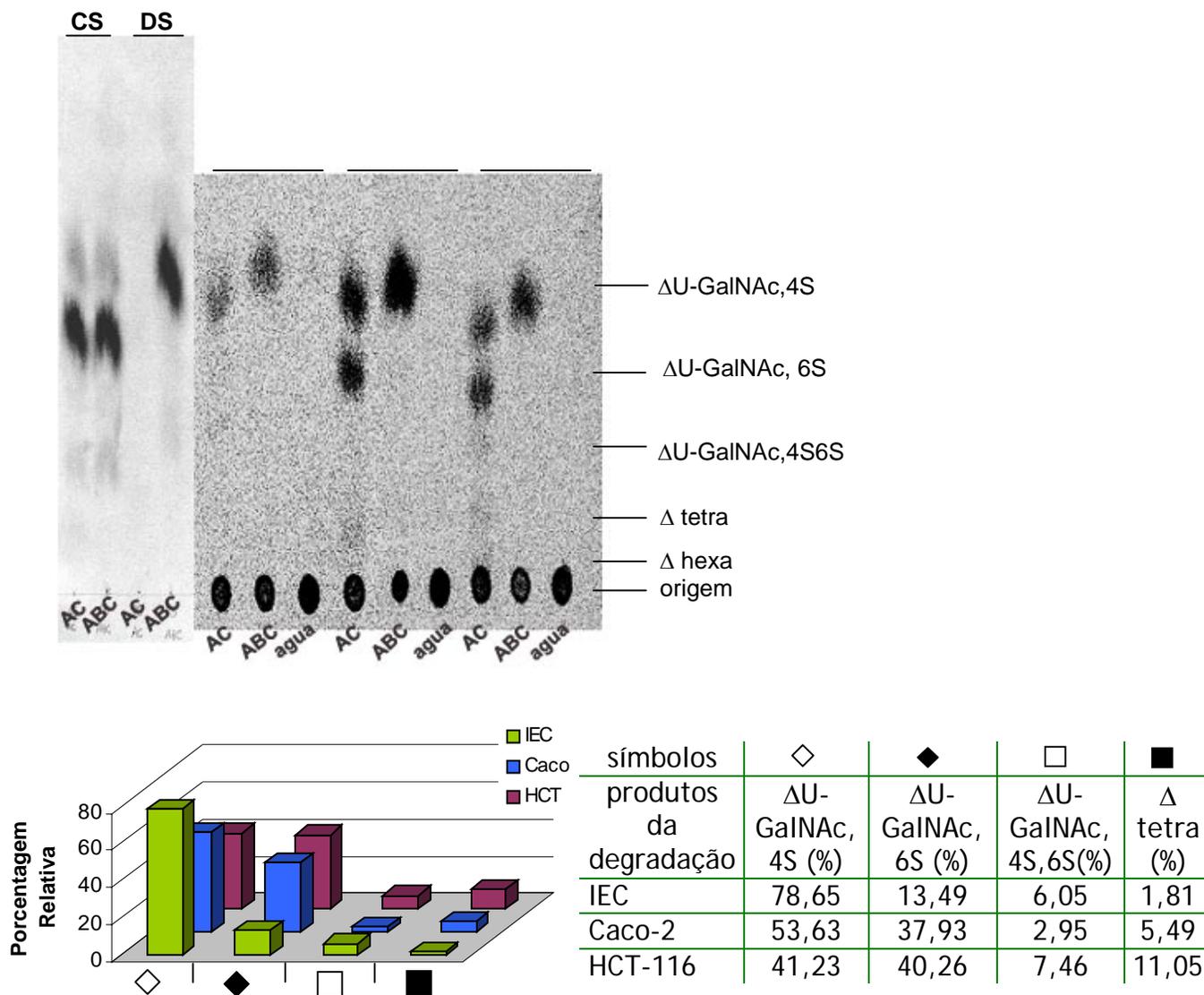


Figura 40. Percentagem relativa das unidades dissacarídicas do CS na matriz das linhagens IEC, Caco-2 e HCT-116. O cromatograma mostra os produtos de degradação do CS da matriz extracelular, após incubação com as condroitinases AC e ABC. Além da incubação com as condroitinases, as amostras foram incubadas com água (ctrl), para obtenção do controle de amostras não degradadas. As amostras foram aplicadas em papel Whatman® como descrito anteriormente em *Métodos*. O gráfico e a tabela representam os dissacarídeos degradados pela condroitinase AC, quantificados e expressos pela percentagem relativa à soma das unidades dissacarídicas totais de cada amostra. Foram realizados pelo menos dois experimentos independentes. Os dados estão expressos em percentagem relativa, o que justifica a ausência das barras de desvio no gráfico.

5.10. Análise da Expressão de Proteoglicanos de Superfície e de Matriz Extracelular

A análise da expressão de proteoglicanos, foi realizada por RT-PCR em Tempo Real, com o intuito de investigar as possíveis diferenças na expressão do esqueleto protéico de PGs nas linhagens estudadas.

Estudamos a expressão do versicam, como representante dos PGs de matriz extracelular e a família do sindecam (sindecans-1, -2, -3 e -4), como representantes de PGs de superfície celular. Estes PGs foram escolhidos devido ao fato de, entre outros, estarem alterados em vários tipos de câncer.

O RT-PCR em Tempo Real foi feito a partir de cDNA obtido pela transcrição reversa de mRNA obtidos das linhagens celulares IEC, Caco-2 e HCT-116. Antes de iniciar as reações, a expressão destes genes foi analisada por RT-PCR convencional para nos certificarmos de que eram expressos (dados não mostrados).

Para confirmar o aumento da 6-O-sulfatação do CS e do HS proporcional ao potencial metastático das linhagens, observado nos cromatogramas, analisamos a expressão das enzimas 6-O-sulfotransferase de HS (HS6OST) e 6-O-sulfotransferase de CS (CS46OST).

Inicialmente, analisamos três potenciais genes endógenos: β -actina, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e β -2-microglobulina (B2M), para avaliar qual o gene que apresentaria expressão mais estável nas três linhagens utilizadas (figura 41). O endógeno β -actina foi o único que não apresentou diferença estatisticamente significativa entre as três linhagens. Concluímos, então, ser a β -actina dentre os testados, o melhor controle interno, e todos os demais experimentos foram realizados com este endógeno.

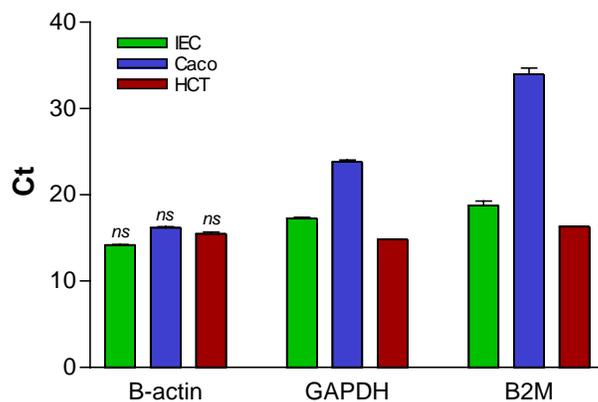


Figura 41. Expressão de genes endógenos nas linhagens IEC, Caco-2 e HCT-116. O nível de expressão de cada endógeno foi avaliado pelo valor do Ct. Os dados de cada experimento foram obtidos em triplicata e são apresentados como média \pm desvio padrão. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes se $p < 0,05$. Teste estatístico: One-way ANOVA (and nonparametric) Bonferroni's Multiple Comparison Test. (*ns* = estatisticamente não significativa)

A Figura 42, mostra que não houve diferença na expressão de sindecam-1, -2, -3 e -4 nas células Caco-2 quando comparadas com IEC-6. No entanto, nas células HCT-116, um aumento notável foi observado na expressão de sindecam-1 ($p < 0,001$) e diminuição significativa de sindecam-2 ($p < 0,001$) e -4 ($p < 0,05$). Sindecam-3 manteve-se estável nas três linhagens, não apresentando diferença estatisticamente significativa na sua expressão.

Em muitos trabalhos, sindecam-4 aparece como sendo um co-receptor de vários ligantes da matriz extracelular, modificando a resposta mediada por integrinas, e é importante no conjunto e rearranjo das fibras de estresse do citoesqueleto de actina (Greene, Tumova, Couchman, & Woods, 2003; Woods & Couchman, 2001). A expressão de sindecam-4 apresentou-se diminuída na linhagem HCT-116, com alto potencial metastático, e pode estar associado a alterações no citoesqueleto desta linhagem, associado à adesão celular.

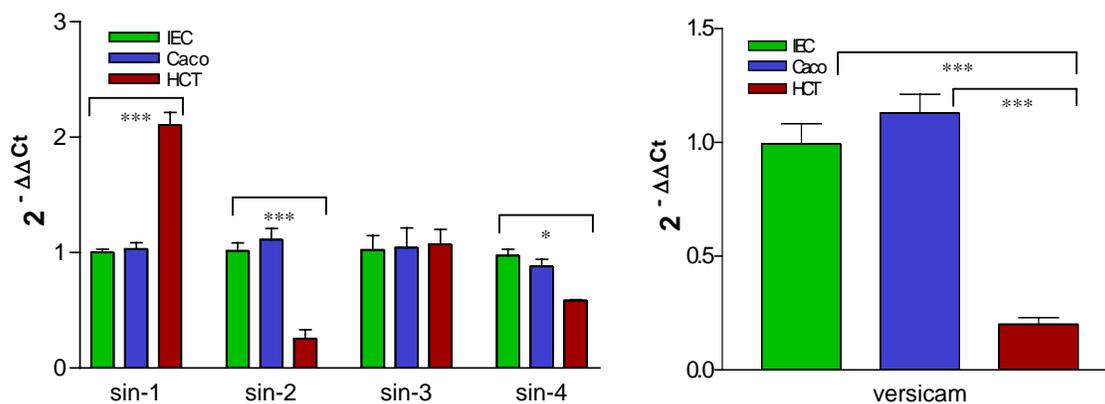


Figura 42. Expressão dos sindecans e do versicam (v1) nas linhagens IEC, Caco-2 e HCT-116. O nível de expressão de cada gene foi normalizado pela expressão de β -actina. Os dados de cada experimento foram obtidos em triplicata e são apresentados como média \pm desvio padrão. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes se $p < 0,05$. Teste estatístico: One-way ANOVA (and nonparametric) Bonferroni's Multiple Comparison Test.

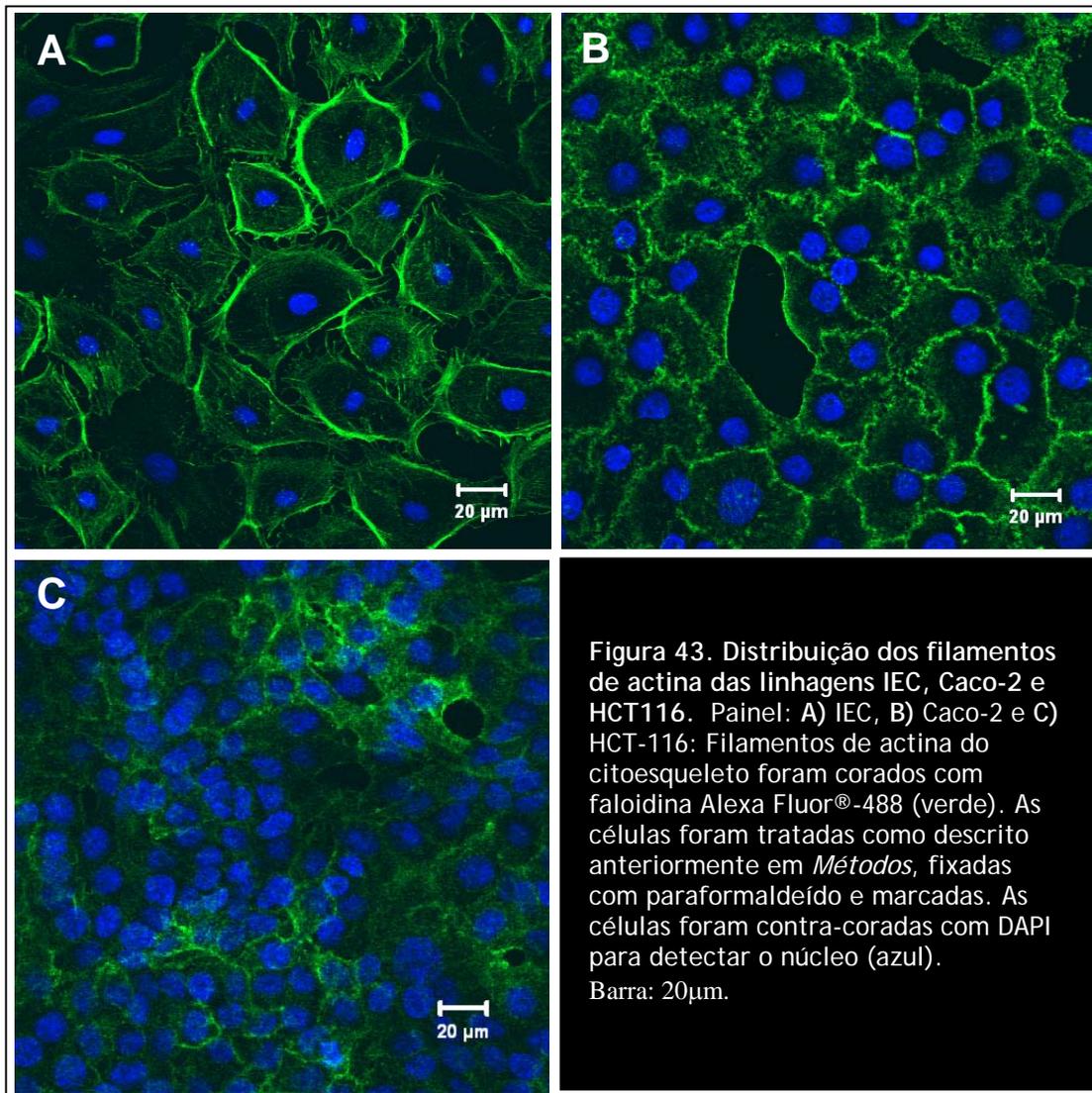
A expressão de versicam não apresentou diferença estatisticamente significativa entre as linhagens IEC e Caco-2 (figura 42). Por outro lado, na linhagem HCT-116 encontra-se bastante diminuída em relação às outras duas linhagens ($p < 0,001$), o que pode estar relacionado com a menor quantidade de condroitim sulfato encontrado na matriz extracelular desta linhagem.

As concentrações aumentadas de $[^{35}\text{S}]$ -CS encontradas na superfície da HCT-116 (Figura 35, da página 85) podem estar relacionadas a outros PGs de superfície celular como o próprio sindecam-1, que se encontra aumentado nessa célula (Figura 42), neste caso, este PG estaria compartilhando no mesmo *core*, cadeias de CS e de HS.

A menor expressão de sindecam-4 na HCT-116, em relação às linhagens IEC e Caco-2, nos levou a investigação preliminar da disposição dos filamentos de actina nas três linhagens. Sabe-se que os filamentos de actina estão relacionados com adesão celular, num processo que envolve o proteoglicano sindecam-4, entre outros componentes celulares.

Os filamentos de actina foram analisados por Microscopia Confocal de Fluorescência. A linhagem controle IEC (intestino normal) apresentou fibras de estresse atravessando o citoplasma, após marcação com Faloidina-Alexa Fluor 488[®] (figura 43A). As linhagens de carcinoma e adenocarcinoma colorretal, Caco-

2 (figura 43B) e HCT116 (figura 43C), respectivamente, apresentam variável desorganização e redução das fibras de estresse dos filamentos de actina. Em ambas linhagens de carcinoma, observa-se uma proeminente marcação submembrana dos filamentos de actina. Observamos também, que a linhagem normal apresenta forma poligonal e as linhagens de câncer colorretal apresentam formato arredondado.



A adesão celular desempenha um importante papel durante uma variedade de funções, como motilidade celular, morfogênese, diferenciação e proliferação (Dimitrijevic-Bussod, Balzaretta-Maggi, & Gadbois, 1999). Dados da literatura sugerem que o sindecam-4 é um regulador de adesão focal e formação de fibras de estresse, e influencia na morfologia e migração celular (Couchman, 1999; Saoncella *et al.*, 1999 Longley *et al.*, 1999 Woods *et al.*, 2000).

Estudos adicionais serão necessários para o melhor esclarecimento da relação entre os filamentos de actina e o sindecam-4 nas linhagens estudadas e o envolvimento destes elementos na adesão celular.

5.11. Análise da Expressão Gênica de Sulfotransferases Envolvidas na Biossíntese do Heparan e do Condroitim Sulfato

A expressão das sulfotransferases revelou aspectos interessantes entre as três linhagens (figura 44). Os níveis de expressão da 2-O-sulfotransferase de heparan sulfato foram similares entre as linhagens normal (IEC) e com médio potencial metastático (Caco-2), porém apresentando-se bastante diminuída na linhagem com alto potencial metastático (HCT-116). Diferentemente, a expressão da 6-O-sulfotransferase de heparan sulfato apresenta-se aumentada nas duas linhagens de câncer de intestino (Caco-2 e HCT-116).

Estes resultados justificam a presença de todos os dissacarídeos 6-O-sulfatados aumentados, encontrados nas células Caco-2 e HCT-116 (Δ U2S-GlcNs,6S, Δ U-GlcNS,6S/ Δ U2S-GlcNS e Δ U-GlcNAc,6S). No entanto, a diminuição de 2-O-sulfotransferase nas células HCT-116, não compatibiliza com essas estruturas. É possível que os níveis aumentados do dissacarídeo que comigra como Δ U2S-GlcNs,6S seja na realidade produto de uma 3-O-sulfotransferase, e não 2-O-sulfotransferase como supomos. Estes dados merecem ser melhor investigados.

Outra correlação importante entre as estruturas obtidas e os resultados de tempo real refere-se ao dissacarídeo dissulfatado Δ U-GlcNS,6S/ Δ U2S-GlcNS. O aumento da 6-O-sulfotransferase e diminuição da 2-O-sulfotransferase, mostra que é possível que o dissacarídeo predominante seja Δ U-GlcNS,6S.

A expressão da 6-O-sulfotransferase de condroitim sulfato (CS46ST= N-acetil-galactosaminil-4-sulfato, 6-O-sulfotransferase), que promove a 6-O-sulfatação do CS 4-sulfatado, apresenta-se maior nas células HCT-116 em relação à IEC, entretanto, nas células Caco-2, essa sulfotransferase não está aumentada (figura 44).

No entanto, ambas as células apresentam 6-O-sulfatação do CS (Figuras 38 e 39, páginas 90 e 91). Essa aparente discrepância pode ser explicada pelo fato de que a 6-O-sulfotransferase de CS, que está aumentada na HCT-116, talvez seja responsável pela sulfatação de CS previamente 4-sulfatado, formando tetrassacarídeos (GlcA-GalNAc(4,6-S)-GlcA(2S)-GalNAc(6S) (Yamaguchi, 2007) e dissacarídeos dissulfatados (Δ U-GalNAc,4 -6S) (Habuchi, 2003) sob ação da condroitinase AC, ausentes na Caco-2 (Figuras 39). Provavelmente, a 6-O-sulfatação envolvida no CS da Caco-2 é realizada por uma outra sulfotransferase, não investigada neste trabalho.

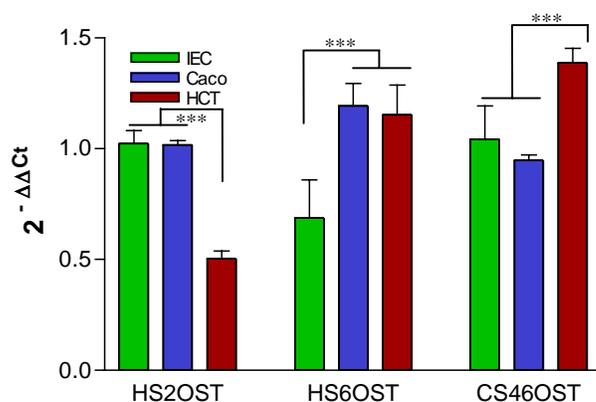


Figura 44. Expressão do mRNA de sulfotransferases nas três linhagens. O nível de expressão de cada gene foi normalizado pela expressão de β -actina. Os dados de cada experimento foram obtidos em triplicata e são apresentados como média \pm desvio padrão. Teste estatístico: One-way ANOVA (and nonparametric) Bonferroni's Multiple Comparison Test. (HS2OST= 2-O-sulfotransferase de heparam sulfato; HS6OST= 6-O-sulfotransferase de heparam sulfato; CS46OST= 6-O-sulfotransferase de condroitim 4-sulfato).

A Figura 45 mostra dois gráficos, com a soma das porcentagens das unidades dissacarídicas 6-O-sulfatadas de HS e CS em todos os compartimentos celulares, dos cromatogramas mostrados anteriormente. Um aumento crescente dessas unidades 6-O-sulfatadas pode ser observado, concomitante ao potencial

metastático das células. Esses dados estão em acordo com a expressão das enzimas de 6-O-sulfatação do HS e CS estudadas (Figura 44).

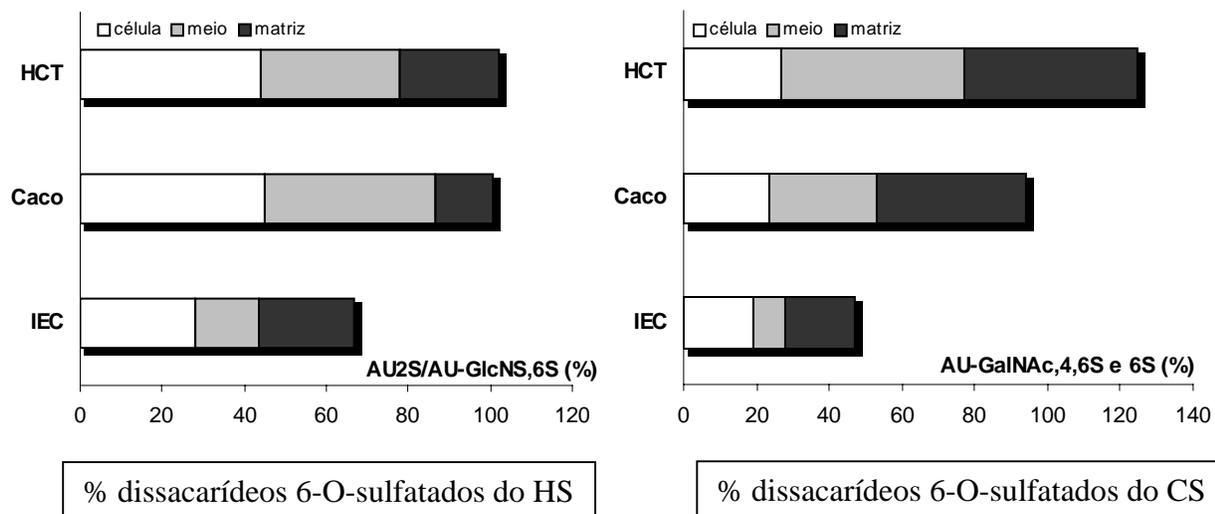


Figura 45. Soma das porcentagens relativas das unidades dissacarídicas 6-O-sulfatadas do HS e CS nas linhagens IEC, Caco-2 e HCT-116. Gráficos representativos dos cromatogramas mostrados anteriormente. Os dissacarídeos do HS 6-O-sulfatados (AU2S-GlcNS,6S + AU-GlcNS,6S) e os dissacarídeos 6-O-sulfatados do CS (AU-GalNAc, 4,6S + AU-GalNAc, 6S) apresentados nos gráficos, referem-se aos valores das porcentagens obtidas dos cromatogramas mostrados anteriormente, das células, meio e matriz, das linhagens estudadas.

Discussão

6. DISCUSSÃO

No presente estudo foram investigados os efeitos da interação parácrina entre fibroblastos e células de adenocarcinoma colorretal (Caco-2) na síntese de proteoglicanos (PGs) e glicosaminoglicanos (GAGs). Inicialmente, o meio condicionado foi utilizado como fonte de fatores solúveis, secretados pelas células, para investigar uma possível indução ou modificação na síntese de GAGs.

De maneira geral, tanto fibroblastos como as células Caco-2 aumentaram a síntese de CS e HS, que foram secretados ao meio extracelular. Além de CS e HS, os fibroblastos também produzem DS no meio, que se apresentou 2,6 vezes aumentado sob estímulo do meio condicionado da Caco-2.

Outros trabalhos demonstraram que células malignas em cultura aumentam a produção de GAGs pelos fibroblastos (Merrilees & Finlay, 1985; Iozzo, 1985).

Interessantemente, no sistema *Transwell* onde as duas células têm a possibilidade de uma interação mais ativa do que meramente um contato com fatores solúveis de outra célula, o padrão de síntese e secreção de DS foi distinto, sendo totalmente retido na célula, intracelularmente ou na superfície celular, mantendo-se constante no meio (Figura 18). Esse mesmo padrão também foi observado para o HS (Figura 18). A incorporação de CS e HS na matriz extracelular também foi mais significativa no sistema *Transwell*.

A Tabela 5 sumariza alguns dados, e nos mostra que a síntese de CS e HS no meio de cultura é muito maior no sistema *Transwell*, seja para as células Caco-2, quanto para os fibroblastos. Exceção foi observada para HS nos fibroblastos, onde o meio condicionado foi maior.

Com o intuito de investigarmos se os fatores que induzem a síntese de GAGs também afetariam a proliferação dessas células utilizamos o ensaio de MTT para quantificar o número de células num período de 7 dias. Com relação aos fibroblastos, o meio condicionado de Caco-2 inibiu sua proliferação, com ou sem soro, comparando-se com o grupo controle com 10% soro fetal bovino (SFB). É possível que a acidez do meio condicionado das células Caco-2 tenha interferido

na proliferação dos fibroblastos. Mas, esse efeito não ocorreu no sistema *Transwell*. Assim, a co-cultura com Caco-2 em *Transwell* não afetou a proliferação dos fibroblastos, quando comparado com o controle com 10% de SFB.

A proliferação de Caco-2 foi estatisticamente aumentada com meio condicionado de fibroblastos nos dias 3 e 5, mas não apresentou diferença no dia 7. Já, a co-cultura em *Transwell* com fibroblastos aumentou significativamente a proliferação da Caco-2 em todos os dias analisados, mostrando que os fibroblastos influenciam a proliferação das células carcinogênicas, e provavelmente participam ativamente da formação da matriz extracelular.

O sistema de co-cultura em *Transwell* ofereceu um modelo *in vitro* diferenciado em relação ao meio condicionado, uma vez que representa um modelo mais próximo à biologia *in vivo* do tumor, onde as células interagem ativamente umas com as outras, e estabelecem um *cross-talking*. Normalmente a célula cancerosa interage através de fatores parácrinos com o estroma, e influencia outras células, se beneficiando desta interação.

Um fato bastante interessante neste trabalho foi o aumento significativo na síntese de CS, haja vista que este GAG é expresso em grande quantidade numa variedade de tumores malignos e tem valor prognóstico em certos tumores. Diversos estudos demonstraram a presença de grandes quantidades de CS em vários tipos de câncer (Sampaio *et al.*, 1977; Yamori *et al.*, 1988; Adany *et al.*, 1990; Ricciardelli *et al.*, 1997; Ricciardelli *et al.*, 1999; Martins *et al.*, 2000; Theocharis *et al.*, 2000; Smetsers *et al.*, em 2003).

Trabalhos na literatura correlacionam a alta concentração de CS em tumores com o armazenamento de várias proteínas de ligação CS-específicas, promovendo o crescimento e formação de metástases. Tumores tratados com condroitinase demonstram redução do crescimento e da formação de metástase, indicando o envolvimento do CS na progressão tumoral (Denholm *et al.*, 2001).

Em nosso trabalho, a imunocitoquímica com anticorpo contra versicam mostrou um significativo aumento deste PGCS na matriz de fibroblastos, após co-cultura em *Transwell* com células Caco-2. Comparando-se com a situação

reversa, observamos um aumento comparativamente menor do versicam detectado nas células Caco-2.

Corroborando com o aumento detectado por imunocitoquímica e também por incorporação de sulfato radioativo nas cadeias de CS, observamos um aumento notável na expressão de versicam nos fibroblastos por PCR em Tempo Real.

Outros trabalhos observaram aumento de expressão do versicam no estroma de metástases em relação ao estroma do tumor primário. A formação de metástase pode ser considerada como sendo um sinal de agressividade, então o aumento de expressão de versicam em metástase sugere que a indução da expressão de versicam no estroma está associada com comportamento mais agressivo em tumores (Pukkila *et al.*, 2004; Brown *et al.*, 1999; Touab *et al.*, 2002).

Alta expressão de versicam em metástases reflete a importância dos mecanismos relacionados ao versicam: redução da adesão, aumento da proliferação (Zhang *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1999), e migração (Ang *et al.*, 1999) na formação de metástase.

Isto também pode indicar que o versicam está associado com a indução de angiogênese e a produção de estroma intensamente vascularizado, o qual adicionalmente promove invasão tumoral (Banerjee *et al.*, 2003). Estes mecanismos são provavelmente responsáveis pela associação entre a expressão de versicam e o comportamento agressivo do tumor (Ricciardelli *et al.*, 2002; Paulus *et al.*, 1996; Ricciardelli *et al.*, 1998; Voutilainen *et al.*, 2003).

No presente estudo, além do versicam, o biglicam e o decorim também foram investigados nos fibroblastos após co-cultura. A análise por Tempo Real demonstrou que estes apresentaram aumento de expressão, o que não ocorreu com os sindecans-1, -2, -3 e -4 cujas expressões se mantiveram constantes.

Decorim encontra-se significativamente aumentado no estroma de tumor de câncer de colon (Adany *et al.*, 1990). Um estudo realizado por Theocharis *et al.*, revelou que a diferenciação maligna em adenocarcinoma de colon é caracterizada pelo aumento da concentração de versicam e decorim anormal. Em

colon normal estes PGs contêm principalmente cadeias de DS, enquanto em carcinoma de colo estas são substituídas por cadeias de CS. Além disso, em tecidos cancerosos, ambos GAGs exibem um tamanho molecular menor e diferenciação na sulfatação (Theocharis *et al.*, 2002).

Decorin pode se ligar e inibir o fator de crescimento transformante- β (TGF- β). Por outro lado, TGF- β é capaz de regular a síntese de decorin em muitos tipos de células (Gallai *et al.*, 1996).

TGF- β exibe uma regulação bifuncional sobre o crescimento, inibindo o crescimento da maioria dos tipos celulares, incluindo células epiteliais, endoteliais, e linfócitos e estimulando a proliferação de células mesenquimais, assim como os fibroblastos. A atividade regulatória do crescimento desempenhada pelo TGF- β está envolvida em muitos processos fisiológicos e patológicos (desenvolvimento embrionário, morfogênese, carcinogênese, doenças autoimunes, Alzheimer) (Roberts & Sporn, 1993). TGF- β estimula a expressão de proteoglicanos, os quais podem desempenhar um papel regulatório (Noble *et al.*, 1992; Yokoyama & Deckert, 1996).

Nos nossos resultados, TGF- β 1 é provavelmente responsável por parte da indução de síntese de CS em fibroblastos e Caco-2, principalmente no meio e matriz. A síntese de CS é TGF- β 1 dose dependente, respondendo mesmo nas concentrações mais baixas de 2 ng/ml. Contudo, TGF- β 1 não foi responsável pelo aumento de HS nas células Caco-2, observado após *cross-talking* das duas linhagens. Provavelmente, HS é regulado por outro fator, como FGF-2 e/ou PDGF. Mesmo nos fibroblastos, DS e HS respondem a TGF- β 1 apenas em altas concentrações.

Chun-Lin *et al.*, em 2006, demonstraram que a deficiência ou remoção enzimática do heparan sulfato em células epiteliais aumentam a taxa de ligação do TGF- β 1 aos receptores T β R-I e T β R-II, atenuando a degradação de TGF- β 1 e aumentando a resposta celular TGF- β induzida. Isto sugere que o heparan sulfato modula negativamente a resposta a TGF- β pela facilitação da formação do complexo II (T β R-II) em células epiteliais.

Algumas células de carcinoma podem adquirir resistência à supressão da proliferação celular induzida pelo TGF- β , pelo aumento na síntese de HS (Kimura *et al.*, 1999; Kishibe *et al.*, 2000).

O aumento de ^{35}S -HS observado em ambas as células, Caco-2 e fibroblastos, após *cross-talking* não foi devido a um aumento dos PGs de sindecam, haja vista que o PCR em Tempo Real mostrou uma diminuição significativa de sindecam -2 e -4 nas células Caco-2, ainda mantendo os níveis de expressão de sindecam -1 e -3. Isto sugere o envolvimento de outro HSPG como o glipicam, perlecam ou ainda um aumento das cadeias de HS.

Outros trabalhos também demonstram claramente que existe uma correlação inversa entre o nível de expressão de sindecam-2 e -4 e o potencial metastático de linhagens de câncer colorretal humano (Munesue *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2002).

Também foi demonstrado que tecidos de osteosarcoma expressam baixas quantidades de sindecam-2 comparados a osteoblastos e osteócitos de osso normal. *In vitro*, foi demonstrado que células de osteosarcoma produzem baixas concentrações de sindecam-2 quando comparadas a células osteoblásticas humanas normais (Orosco *et al.*, 2007).

Outro dado interessante encontrado em nosso trabalho, foi a constatação de que não ocorreu aumento da expressão dos proteoglicanos versicam, biglicam e decorim nas células Caco-2, após interação com fibroblastos. Estes resultados contradizem os dados de incorporação de sulfato, onde o aumento de CS foi evidenciado. Uma possível explicação para estes dados podem ser o aumento no comprimento das cadeias de CS, sem aumento de síntese do *core* protéico, ou ainda devido a um aumento da sulfatação do CS.

Neste trabalho, células estromais foram capazes de induzir síntese de GAGs pelas células tumorais, e vice-versa, sugerindo que esta interação parácrina é importantes para a formação da matriz envolvida na adesão e migração celular, determinantes na progressão tumoral.

Segundo Bhowmick *et al.*, 2004, as células tumorais sobrevivem num complexo micro-ambiente que inclui a matriz extracelular (ECM), fatores de

crescimento solúveis e citocinas, e uma variedade de tipos celulares não-epiteliais, incluindo aquelas que compreendem a vasculatura (células endoteliais, pericitos e células musculares lisas), aquelas que respondem à infecção e injúria (linfócitos, macrófagos e mastócitos) e fibroblastos.

Como afirmam os autores acima citados, os fibroblastos têm um papel bem conhecido no processo carcinogênico. Eles são responsáveis pela síntese, deposição e remodelamento da matriz extracelular do estroma tumoral. Também são reconhecidos como fonte de fatores de crescimento na interação parácrina, influenciando assim o crescimento das células carcinogênicas.

O conceito envolvendo uma ligação entre a maturação da célula estromal e proliferação epitelial adjacente foi introduzida há mais de 20 anos, e desde então tem ganhado suporte. Esta interação é mediada por sinais solúveis parácrinos e componentes da MEC secretados, que induz o epitélio adjacente a proliferar rapidamente.

À medida que as células epiteliais diferenciam, também diferenciam as células estromais adjacentes. Estas células estromais diferenciadas, geralmente expressam quantidades pequenas de fatores de crescimento, e o epitélio diferenciado expressa citocinas para a manutenção da diferenciação estromal, sugerindo que um novo balanço epitélio-mesênquimal é alcançado durante a maturação tecidual.

Durante a tumorigênese, as células epiteliais pré-cancerosas adquirem mutações genéticas múltiplas, e o estroma associado se torna "ativado", comumente expressando marcadores de miofibroblastos. As características deste fibroblasto ativado (carcinoma-associado) ainda não estão completamente entendidas. Contudo, estudos têm demonstrado que tais células expressam α -actina de músculo liso, proteínas da matriz extracelular e fatores de crescimento, que agem em padrões autócrino e parácrino, e que potenciam e dão suporte à sobrevivência do tumor.

Em nosso trabalho, é possível que os fibroblastos, sob a influência das células de câncer estejam expressando marcadores de miofibroblastos.

As células de adenocarcinoma colorretal (Caco-2), previamente analisadas neste trabalho (interação estroma-câncer), também foram utilizadas para a uma investigação comparativa de GAGs e PGs, com uma linhagem de maior potencial metastático, HCT116.

A análise das duas linhagens permitiu-nos detectar alterações estruturais nos GAGs, comparando-se com uma linhagem de epitélio intestinal normal de rato, IEC-6. Marcação das células com [³⁵S]-sulfato de sódio e análise estrutural dos GAGs com heparitinases e condroitinases específicas, mostraram o aumento de 6-O-sulfatação das cadeias de HS e CS.

Interessantemente, após digestão com heparitinases I e II, os níveis aumentados de 6-O-sulfatação no HS foram representados pelos dissacarídeos Δ U-GlcNAc,6S, na matriz, Δ U-GlcNS, 6S e Δ U2S-GlcNS, 6S, nas células e no meio de cultura.

Igualmente notável, foram os altos níveis de Δ U-GalNAc,6S encontrados no CS de todos os compartimentos analisados, superfície celular, matriz e meio das linhagens Caco-2 e HCT116, quando comparadas a IEC-6.

Dam & Sugahara *et al.*, em 2007, observaram aumento da marcação de unidades dissacarídicas CS-4S,6S em carcinoma ovariano; além disso, os autores relataram que este epitopo é encontrado em tumores de vasos sanguíneos, sendo VEGF-dependente.

Estudos prévios têm demonstrado que carcinoma de colon humano apresenta níveis elevados de decorim com alterações nas cadeias de CS, nas quais são predominantes cadeias com unidades dissacarídicas 6-sulfatadas, detectadas por anticorpos específicos (Adany *et al.*, 1990). A composição ou a sulfatação do CS está alterada em carcinomas pancreático e gástrico, sendo observados níveis aumentados de unidades dissacarídicas 6-O-sulfatadas (Theocharis *et al.*, 2000, 2003).

Condroitim altamente sulfatado mostra interações específicas com fatores de crescimento *heparin-binding*, fator de crescimento de hepatócito, fator de crescimento de fibroblasto-2 (FGF-2), e co-fator II da heparina (Deepa *et al.*, 2002; Nandini *et al.*, 2004).

As interações HS-proteína dependem criticamente da quantidade e posição dos grupamentos sulfato, em particular, os 6-O-sulfatados, os quais formam sítios de ligação para proteínas (Esko & Lindahl, 2001; Nakato & Kimata, 2002). Desta forma, não é surpreendente que a 6-O-sulfatação do HS seja dinamicamente regulada durante o desenvolvimento embrionário (Yue *et al.*, 2004; Allen & Rapraeger, 2003; Walz *et al.*, 1997; Brickman *et al.*, 1998) e carcinogênese (Jayson, *et al.*, 1998; Safaiyan *et al.*, 1998).

No presente estudo, os dados estruturais encontrados foram confirmados por PCR em Tempo Real, onde foi detectada a expressão aumentada da enzima 6-O-sulfotransferase de heparam (HS6OST) nas linhagens de carcinoma, em relação a IEC-6. Já a enzima 6-O-sulfotransferase de condroitim-4-sulfato (CS46OST), apresentou expressão aumentada apenas na HCT116.

Esses dados justificariam a presença dos produtos tetrassacarídeo e dissacarídeo dissulfatado, após ação da condroitinase AC, presentes apenas no CS da HCT116, caracterizando o CSE (Δ U-GalNAc,4, 6S). O CSE contém resíduos de GalNAc, 4,6-sulfato, que tem sido implicados na ligação de uma variedade de moléculas biológicas, tais como quimiocinas, fatores ligantes de heparina (Deepa *et al.*, 2002), que incluem, selectinas L e P e CD44 (Kawashima, *et al.*, 2002). O CSE possui importantes funções fisiológicas, especialmente no sistema nervoso central (Sugahara *et al.*, 2003; Sugahara & Mikami, 2007). Ainda, trabalhos na literatura relatam que oligossacarídeos contendo CSE, aumentam a motilidade de células tumorais.

Conclusão

7. CONCLUSÃO

Nosso trabalho mostrou através do sistema de co-cultura *Transwell* que:

1. Os fibroblastos interagem de maneira ativa na proliferação das células de adenocarcinoma colorretal (Caco-2), e esta linhagem por sua vez, altera a síntese de glicosaminoglicanos da matriz extracelular dos fibroblastos;
2. Na interação parácrina, a Caco-2 estimulou os fibroblastos a expressarem os PGs de matriz extracelular versicam, biglicam e decorin. Já os fibroblastos, promoveram a diminuição da expressão de sindecam -2 e -4 na linhagem Caco-2. A microscopia confocal também mostrou um expressivo aumento de versicam nos fibroblastos;
3. TGF- β 1 foi testado nesse sistema e induziu um significativo aumento na síntese de CS principalmente nos fibroblastos, produzindo uma forte resposta CS-estimulante. Estes resultados mostram que este fator de crescimento pode ser em parte, responsável pelo aumento de CS observado nas células estromais, na interação parácrina;
4. Estudos estruturais com enzimas específicas, mostraram aumento da 6-O-sulfatação nas cadeias de HS e CS das duas linhagens de câncer colorretal, Caco-2 e HCT116;
5. A análise por PCR em tempo real confirmou a expressão aumentada da 6-O-sulfotransferase de heparam (HS6OST) nas linhagens de câncer, em relação à normal. A 6-O-sulfotransferase de condroitim-4-sulfato (CS46OST) apresentou-se aumentada apenas na HCT116, justificando a estrutura de GalNAc-4,6-sulfato encontrada nesta linhagem.

Referências Bibliográficas

Bibliográficas

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrink, M., M. Grujic, et al. (2004). "Serglycin is essential for maturation of mast cell secretory granule." J Biol Chem **279**(39): 40897-905.
- Adany, R., R. Heimer, et al. (1990). "Altered expression of chondroitin sulfate proteoglycan in the stroma of human colon carcinoma. Hypomethylation of PG-40 gene correlates with increased PG-40 content and mRNA levels." J Biol Chem **265**(19): 11389-96.
- Aikawa, J. and J. D. Esko (1999). "Molecular cloning and expression of a third member of the heparan sulfate/heparin GlcNAc N-deacetylase/ N-sulfotransferase family." J Biol Chem **274**(5): 2690-5.
- Alexopoulou, A. N., H. A. Multhaupt, et al. (2007). "Syndecans in wound healing, inflammation and vascular biology." Int J Biochem Cell Biol **39**(3): 505-28.
- Allen BL, AC Rapraeger (2003). "Spatial and temporal expression of heparan sulfate in mouse development regulates FGF and FGF receptor assembly." J Cell Biol. **10**;163(3):637-48.
- Andres, J. L., K. Stanley, et al. (1989). "Membrane-anchored and soluble forms of betaglycan, a polymorphic proteoglycan that binds transforming growth factor-beta." J Cell Biol **109**(6 Pt 1): 3137-45.
- Ang, L. C., Y. Zhang, et al. (1999). "Versican enhances locomotion of astrocytoma cells and reduces cell adhesion through its G1 domain." J Neuropathol Exp Neurol **58**(6): 597-605.
- Arikawa-Hirasawa, E. and Y. Yamada (2001). "[Roles of perlecan in development and disease: studies in knockout mice and human disorders]." Seikagaku **73**(10): 1257-61.
- Baciu, P. C., C. Acaster, et al. (1994). "Molecular cloning and genomic organization of chicken syndecan-4." J Biol Chem **269**(1): 696-703.
- Baker, J. R., J. A. Cifonelli, et al. (1975). "The linkage of corneal keratan sulfate to protein." Connect Tissue Res **3**(2): 149-56.
- Banerjee, A. G., I. Bhattacharyya, et al. (2003). "Aberrant expression and localization of decorin in human oral dysplasia and squamous cell carcinoma." Cancer Res **63**(22): 7769-76.
- Bernfield, M., M. Gotte, et al. (1999). "Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans." Annu Rev Biochem **68**: 729-77.
- Bernfield, M., M. T. Hinkes, et al. (1993). "Developmental expression of the syndecans: possible function and regulation." Dev Suppl: 205-12.
- Bernfield, M., R. Kokenyesi, et al. (1992). "Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans." Annu Rev Cell Biol **8**: 365-93.
- Betsholtz, C., A. Johnsson, et al. (1986). "cDNA sequence and chromosomal localization of human platelet-derived growth factor A-chain and its expression in tumour cell lines." Nature **320**(6064): 695-9.
- Bhavanandan, V. P. and K. Meyer (1967). "Studies on keratosulfates. Methylation and partial acid hydrolysis of bovine corneal keratosulfate." J Biol Chem **242**(19): 4352-9.
- Bhowmick NA, EG Neilson et al. (2004). "Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression." Nature. **18**;432(7015):332-7.
- Blochberger, T. C., J. P. Vergnes, et al. (1992). "cDNA to chick lumican (corneal keratan sulfate proteoglycan) reveals homology to the small interstitial proteoglycan gene family and expression in muscle and intestine." J Biol Chem **267**(1): 347-52.
- Bode-Lesniewska, B., M. T. Dours-Zimmermann, et al. (1996). "Distribution of the large aggregating proteoglycan versican in adult human tissues." J Histochem Cytochem **44**(4): 303-12.

Bibliográficas

- Bode, L., E. A. Eklund, et al. (2005). "Heparan sulfate depletion amplifies TNF-alpha-induced protein leakage in an in vitro model of protein-losing enteropathy." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **288**(5): G1015-23.
- Bourdon, M. A., T. Krusius, et al. (1987). "Identification and synthesis of a recognition signal for the attachment of glycosaminoglycans to proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(10): 3194-8.
- Breuer, B., G. Schmidt, et al. (1990). "Non-uniform influence of transforming growth factor-beta on the biosynthesis of different forms of small chondroitin sulphate/dermatan sulphate proteoglycan." Biochem J **269**(2): 551-4.
- Brickman YG, MD Ford et al. (1998). "Structural modification of fibroblast growth factor-binding heparan sulfate at a determinative stage of neural development." J Biol Chem. **273**(8):4350-9.
- Brimacombe, J. S. and M. Stacey (1964). "Mucopolysaccharides in Disease." Adv Clin Chem **7**: 199-234.
- Brown, C. T., M. A. Nugent, et al. (1999). "Characterization of proteoglycans synthesized by cultured corneal fibroblasts in response to transforming growth factor beta and fetal calf serum." J Biol Chem **274**(11): 7111-9.
- Brown, L. F., A. J. Guidi, et al. (1999). "Vascular stroma formation in carcinoma in situ, invasive carcinoma, and metastatic carcinoma of the breast." Clin Cancer Res **5**(5): 1041-56.
- Carey, D. J. (1997). "Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors." Biochem J **327** (Pt 1): 1-16.
- Carey, D. J., D. M. Evans, et al. (1992). "Molecular cloning and characterization of N-syndecan, a novel transmembrane heparan sulfate proteoglycan." J Cell Biol **117**(1): 191-201.
- Carlstedt, I., L. Coster, et al. (1983). "Proteoheparan sulfate from human skin fibroblasts. Isolation and structural characterization." J Biol Chem **258**(19): 11629-35.
- Carney, S. L. and H. Muir (1988). "The structure and function of cartilage proteoglycans." Physiol Rev **68**(3): 858-910.
- Cassaró, C. M. and C. P. Dietrich (1977). "Distribution of sulfated mucopolysaccharides in invertebrates." J Biol Chem **252**(7): 2254-61.
- Chavante, S. F., E. A. Santos, et al. (2000). "A novel heparan sulphate with high degree of N-sulphation and high heparin cofactor-II activity from the brine shrimp *Artemia franciscana*." Int J Biol Macromol **27**(1): 49-57.
- Choi, H. U., T. L. Johnson, et al. (1989). "Characterization of the dermatan sulfate proteoglycans, DS-PGI and DS-PGII, from bovine articular cartilage and skin isolated by octyl-sepharose chromatography." J Biol Chem **264**(5): 2876-84.
- Condon, M. S. (2005). "The role of the stromal microenvironment in prostate cancer." Semin Cancer Biol **15**(2): 132-7.
- Cool, S. M. and V. Nurcombe (2006). "Heparan sulfate regulation of progenitor cell fate." J Cell Biochem **99**(4): 1040-51.
- Coppock, D. L., C. Kopman, et al. (1993). "Preferential gene expression in quiescent human lung fibroblasts." Cell Growth Differ **4**(6): 483-93.
- Cornelison, D. D., S. A. Wilcox-Adelman, et al. (2004). "Essential and separable roles for Syndecan-3 and Syndecan-4 in skeletal muscle development and regeneration." Genes Dev **18**(18): 2231-6.
- Couchman, J. R., D. R. Abrahamson, et al. (1993). "Basement membrane proteoglycans and development." Kidney Int **43**(1): 79-84.
- Couchman, J. R., L. Chen, et al. (2001). "Syndecans and cell adhesion." Int Rev Cytol **207**: 113-50.
- Danielpour, D. (1999). "Transdifferentiation of NRP-152 rat prostatic basal epithelial cells toward a luminal phenotype: regulation by glucocorticoid, insulin-like

Bibliográficas

- growth factor-I and transforming growth factor-beta." *J Cell Sci* 112 (Pt 2): 169-79.
- David, C. L., J. Orpiszewski, et al. (1998). "Isoaspartate in chondroitin sulfate proteoglycans of mammalian brain." *J Biol Chem* 273(48): 32063-70.
- David, G. (1992). "Structural and functional diversity of the heparan sulfate proteoglycans." *Adv Exp Med Biol* 313: 69-78.
- David, G. (1993). "Integral membrane heparan sulfate proteoglycans." *FASEB J* 7(11): 1023-30.
- Deepa, S. S., Y. Umehara, et al. (2002). "Specific molecular interactions of oversulfated chondroitin sulfate E with various heparin-binding growth factors. Implications as a physiological binding partner in the brain and other tissues." *J Biol Chem* 277(46): 43707-16.
- Del Rosso, M., R. Cappelletti, et al. (1981). "Binding of the basement-membrane glycoprotein laminin to glycosaminoglycans. An affinity-chromatography study." *Biochem J* 199(3): 699-704.
- Denholm, E. M., Y. Q. Lin, et al. (2001). "Anti-tumor activities of chondroitinase AC and chondroitinase B: inhibition of angiogenesis, proliferation and invasion." *Eur J Pharmacol* 416(3): 213-21.
- Derksen, P. W., Keehnen, R. M., Evers, L. M., van Oers, M. H., Spaargaren, M. and Pals, S. T. (2002). Cell surface proteoglycan syndecan-1 mediates hepatocyte growth factor binding and promotes Met signaling in multiple myeloma. *Blood*. 99(4):1405-10.
- Desmouliere, A., C. Guyot, et al. (2004). "The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior." *Int J Dev Biol* 48(5-6): 509-17.
- Dietrich, C. P. (1968). "Novel heparin degradation products. Isolation and characterization of novel disaccharides and oligosaccharides produced from heparin by bacterial degradation." *Biochem J* 108(4): 647-54.
- Dietrich, C. P. (1969). "Studies on the induction of heparin-degrading enzymes in *Flavobacterium heparinum*." *Biochemistry* 8(8): 3342-7.
- Dietrich, C. P. (1984). "A model for cell-cell recognition and control of cell growth mediated by sulfated glycosaminoglycans." *Braz J Med Biol Res* 17(1): 5-15.
- Dietrich, C. P. and H. A. Armelin (1978). "Sulfated mucopolysaccharides from normal Swiss 3T3 cell line and its tumorigenic mutant ST1: possible role of chondroitin sulfates in neoplastic transformation." *Biochem Biophys Res Commun* 84(3): 794-801.
- Dietrich, C. P., H. A. Armelin, et al. (1982). "Turnover, change of composition with rate of cell growth and effect of phenylxyloside on synthesis and structure of cell surface sulfated glycosaminoglycans of normal and transformed cells." *Biochim Biophys Acta* 717(3): 387-97.
- Dietrich, C. P. and H. M. De Oca (1970). "Production of heparin related mucopolysaccharides by mammalian cells in culture." *Proc Soc Exp Biol Med* 134(4): 955-62.
- Dietrich, C. P., J. F. de Paiva, et al. (1985). "Isolation and characterization of a heparin with high anticoagulant activity from *Anomalocardia brasiliensis*." *Biochim Biophys Acta* 843(1-2): 1-7.
- Dietrich, C. P., Martins, J. R., Sampaio, L. O. and Nader, H. B. (1993). Anomalous structure of urinary chondroitin sulfate from cancer patients. A potential new marker for diagnosis of neoplasias. *Lab Invest*. 68 (4): 439-45.
- Dietrich, C. P. and H. Montes de Oca (1978). "Surface sulfated mucopolysaccharides of primary and permanent mammalian cell lines." *Biochem Biophys Res Commun* 80(4): 805-12.
- Dietrich, C. P. and H. B. Nader (1974). "Fractionation and properties of four heparitin sulfates from beef lung tissue. Isolation and partial characterization of a

Bibliográficas

- hemogeneous species of heparitin sulfate." Biochim Biophys Acta 343(1): 34-44.
- Dietrich, C. P., H. B. Nader, et al. (1971). "Chemical composition of heparitin sulfate. Fractionation and characterization of four acidic mucopolysaccharides in heparitin sulfate from beef lung tissue." Biochim Biophys Acta 237(3): 430-41.
- Dietrich, C. P., H. B. Nader, et al. (1983). "Structural differences of heparan sulfates according to the tissue and species of origin." Biochem Biophys Res Commun 111(3): 865-71.
- Dietrich, C. P., J. F. Paiva, et al. (1999). "Structural features and anticoagulant activities of a novel natural low molecular weight heparin from the shrimp *Penaeus brasiliensis*." Biochim Biophys Acta 1428(2-3): 273-83.
- Dietrich, C. P., L. O. Sampaio, et al. (1980). "Role of sulfated mucopolysaccharides in cell recognition and neoplastic transformation." An Acad Bras Cienc 52(1): 179-86.
- Dietrich, C. P., L. O. Sampaio, et al. (1976). "Characteristic distribution of sulfated mucopolysaccharides in different tissues and in their respective mitochondria." Biochem Biophys Res Commun 71(1): 1-10.
- Dietrich, C. P., L. O. Sampaio, et al. (1977). "Cell recognition and adhesiveness: a possible biological role for the sulfated mucopolysaccharides." Biochem Biophys Res Commun 75(2): 329-36.
- Dietrich, C. P., I. L. Tersariol, et al. (1998). "Structure of heparan sulfate: identification of variable and constant oligosaccharide domains in eight heparan sulfates of different origins." Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) 44(3): 417-29.
- Dydensborg, A. B., Herring, E., Auclair, J., Tremblay, E. and Beaulieu, J. F. (2006). "Normalizing genes for quantitative RT-PCR in differentiating human intestinal epithelial cells and adenocarcinomas of the colon." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 290 (5): G1067-74.
- Dong, J., J. Grunstein, et al. (2004). "VEGF-null cells require PDGFR alpha signaling-mediated stromal fibroblast recruitment for tumorigenesis." EMBO J 23(14): 2800-10.
- Echtermeyer, F., M. Streit, et al. (2001). "Delayed wound repair and impaired angiogenesis in mice lacking syndecan-4." J Clin Invest 107(2): R9-R14.
- Ehnis, T., W. Dieterich, et al. (1997). "Localization of a binding site for the proteoglycan decorin on collagen XIV (undulin)." J Biol Chem 272(33): 20414-9.
- Ehrlich, J. and S. S. Stivala (1973). "Chemistry and pharmacology of heparin." J Pharm Sci 62(4): 517-44.
- Elias, M. C., Veiga, S. S., Gremski, W., Porcionatto, M. A., Nader, H. B. and Brentani, R. R. (1999) Presence of a laminin-binding chondroitin sulfate proteoglycan at the cell surface of a human melanoma cell Mel-85. Mol Cell Biochem. 197 (1-2):39-48.
- Ellenrieder, V., S. F. Hendler, et al. (2001). "Transforming growth factor beta1 treatment leads to an epithelial-mesenchymal transdifferentiation of pancreatic cancer cells requiring extracellular signal-regulated kinase 2 activation." Cancer Res 61(10): 4222-8.
- Eriksson, I., Sandbäck, D., Ek, B., Lindahl, U. and Kjellén, L. (1994). cDNA cloning and sequencing of mouse mastocytoma glucosaminyl N-deacetylase/N-sulfotransferase, an enzyme involved in the biosynthesis of heparin. J Biol Chem. 269(14):10438-43.
- Esko, J. D. (1991). "Genetic analysis of proteoglycan structure, function and metabolism." Curr Opin Cell Biol 3(5): 805-16.

Bibliográficas

- Esko, J. D. and S. B. Selleck (2002). "Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulfate." Annu Rev Biochem **71**: 435-71.
- Esko JD, U Lindahl (2001). "Molecular diversity of heparan sulfate." J Clin Invest. **108**(2):169-73.
- Ferreira, T. M., M. G. Medeiros, et al. (1993). "Structure of heparan sulfate from the fresh water mollusc *Anomantidae* sp: sequencing of its disaccharide units." Int J Biochem **25**(9): 1219-25.
- Fisher, L. W., J. D. Termine, et al. (1989). "Deduced protein sequence of bone small proteoglycan I (biglycan) shows homology with proteoglycan II (decorin) and several nonconnective tissue proteins in a variety of species." J Biol Chem **264**(8): 4571-6.
- Flaumenhaft, R., D. Moscatelli, et al. (1989). "Role of extracellular matrix in the action of basic fibroblast growth factor: matrix as a source of growth factor for long-term stimulation of plasminogen activator production and DNA synthesis." J Cell Physiol **140**(1): 75-81.
- Flaumenhaft, R. and D. B. Rifkin (1992). "The extracellular regulation of growth factor action." Mol Biol Cell **3**(10): 1057-65.
- Forsee, W. T. and L. Roden (1981). "Biosynthesis of heparin. Transfer of N-acetylglucosamine to heparan sulfate oligosaccharides." J Biol Chem **256**(14): 7240-7.
- Fransson, L. A., I. Carlstedt, et al. (1984). "Binding of transferrin to the core protein of fibroblast proteoheparan sulfate." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(18): 5657-61.
- Fransson, L. A. and A. Malmstrom (1971). "Structure of pig skin dermatan sulfate. 1. Distribution of D-glucuronic acid residues." Eur J Biochem **18**(3): 422-30.
- Fransson, L. A. (1989). "Heparan sulfate proteoglycans: structure and properties. In: Lane, D.A. & Lindahl, U. (Eds), Edward Arnold, London, pp. 115-33.
- Fujiwara, S., H. Wiedemann, et al. (1984). "Structure and interactions of heparan sulfate proteoglycans from a mouse tumor basement membrane." Eur J Biochem **143**(1): 145-57.
- Fuki, I. V., K. M. Kuhn, et al. (1997). "The syndecan family of proteoglycans. Novel receptors mediating internalization of atherogenic lipoproteins in vitro." J Clin Invest **100**(6): 1611-22.
- Fuster, M. M. and J. D. Esko (2005). "The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets." Nat Rev Cancer **5**(7): 526-42.
- Gallagher, J. T. (1989). "The extended family of proteoglycans: social residents of the pericellular zone." Curr Opin Cell Biol **1**(6): 1201-18.
- Gallai M, I Kovalszky et al. (1996). " Expression of extracellular matrix proteoglycans perlecan and decorin in carbon-tetrachloride-injured rat liver and in isolated liver cells." Am J Pathol. **148**(5):1463-71.
- Ghatak, S., S. Misra, et al. (2002). "Hyaluronan oligosaccharides inhibit anchorage-independent growth of tumor cells by suppressing the phosphoinositide 3-kinase/Akt cell survival pathway." J Biol Chem **277**(41): 38013-20.
- Gomes, P. B. and C. P. Dietrich (1982). "Distribution of heparin and other sulfated glycosaminoglycans in vertebrates." Comp Biochem Physiol B **73**(4): 857-63.
- Gong, F., P. Jemth, et al. (2003). "Processing of macromolecular heparin by heparanase." J Biol Chem **278**(37): 35152-8.
- Gornik, O., J. Dumić, et al. (2006). "Glycoscience -- a new frontier in rational drug design." Acta Pharm **56**(1): 19-30.
- Gospodarowicz, D. (1990). "Fibroblast growth factor. Chemical structure and biologic function." Clin Orthop Relat Res(257): 231-48.
- Götte, M. (2003). Syndecans in inflammation. FASEB J. **17**(6):575-91.

Bibliográficas

- Gulyas, M. and A. Hjerpe (2003). "Proteoglycans and WT1 as markers for distinguishing adenocarcinoma, epithelioid mesothelioma, and benign mesothelium." *J Pathol* **199**(4): 479-87.
- Haas, J. S., Fitzmaurice, G., Brawarsky, P., Liang, S. Y., Hiatt, R. A., Klabunde, C. N., Brown, M. L. and Phillips, K. A. (2007). Association of regional variation in primary care physicians' colorectal cancer screening recommendations with individual use of colorectal cancer screening. *Prev Chronic Dis*. **4**(4):A90.
- Habuchi, O. (2000). "[Biological function of chondroitin sulfate and sulfotransferases]." *Seikagaku* **72**(6): 427-36.
- Han, F., C. S. Adams, et al. (2005). "Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) regulates ATDC5 chondrogenic differentiation and fibronectin isoform expression." *J Cell Biochem* **95**(4): 750-62.
- Hardingham, T. E. and A. J. Fosang (1992). "Proteoglycans: many forms and many functions." *FASEB J* **6**(3): 861-70.
- Hashimoto, Y., A. Orellana, et al. (1992). "Molecular cloning and expression of rat liver N-heparan sulfate sulfotransferase." *J Biol Chem* **267**(22): 15744-50.
- Hatae, Y., T. Atsuta, et al. (1977). "Glycosaminoglycans in human lung carcinoma." *Gann* **68**(1): 59-63.
- Hay, E. D. (2005). "The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it." *Dev Dyn* **233**(3): 706-20.
- Heldin, C. H. and B. Westermark (1984). "Growth factors: mechanism of action and relation to oncogenes." *Cell* **37**(1): 9-20.
- Helting, T. and U. Lindahl (1972). "Biosynthesis of heparin. I. Transfer of N-acetylglucosamine and glucuronic acid to low-molecular weight heparin fragments." *Acta Chem Scand* **26**(9): 3515-23.
- Huber, M. A., N. Kraut, et al. (2005). "Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression." *Curr Opin Cell Biol* **17**(5): 548-58.
- lozzo, R. V. (1997). "The family of the small leucine-rich proteoglycans: key regulators of matrix assembly and cellular growth." *Crit Rev Biochem Mol Biol* **32**(2): 141-74.
- lozzo, R. V. (1998). "Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function." *Annu Rev Biochem* **67**: 609-52.
- lozzo, R.V. (1999). The biology of the small leucine-rich proteoglycans. Functional network of interactive proteins. *J Biol Chem*. **274**(27):18843-6.
- lozzo, R. V. (2005). "Basement membrane proteoglycans: from cellar to ceiling." *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(8): 646-56.
- lozzo, R. V. and A. D. Murdoch (1996). "Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function." *FASEB J* **10**(5): 598-614.
- Ishai-Michaeli, R., A. Eldor, et al. (1990). "Heparanase activity expressed by platelets, neutrophils, and lymphoma cells releases active fibroblast growth factor from extracellular matrix." *Cell Regul* **1**(11): 833-42.
- Isogai, Z., T. Shinomura, et al. (1996). "2B1 antigen characteristically expressed on extracellular matrices of human malignant tumors is a large chondroitin sulfate proteoglycan, PG-M/versican." *Cancer Res* **56**(17): 3902-8.
- Itano, N., T. Sawai, et al. (1999). "Relationship between hyaluronan production and metastatic potential of mouse mammary carcinoma cells." *Cancer Res* **59**(10): 2499-504.
- Jackson, R. L., S. J. Busch, et al. (1991). "Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes." *Physiol Rev* **71**(2): 481-539.

Bibliográficas

- Jakobsson, L., J. Kreuger, et al. (2006). "Heparan sulfate in trans potentiates VEGFR-mediated angiogenesis." *Dev Cell* 10(5): 625-34.
- Jayson GC, M Lyon et al. (1998). "Heparan sulfate undergoes specific structural changes during the progression from human colon adenoma to carcinoma in vitro." *J Biol Chem*. 273(1):51-7.
- Jeanloz, R. W. (1960). "The nomenclature of mucopolysaccharides." *Arthritis Rheum* 3: 233-7.
- Jenniskens, G. J., W. J. Koopman, et al. (2003). "Phenotypic knock out of heparan sulfates in myotubes impairs excitation-induced calcium spiking." *FASEB J* 17(8): 878-80.
- Jeronimo, S. M., Sales, A. O., Fernandes, M. Z., Melo, F. P., Sampaio, L. O., Dietrich, C. P. and Nader, H. B. (1994). Glycosaminoglycan structure and content differ according to the origins of human tumors. *Braz J Med Biol Res*. 27(9):2253-8.
- Jorpes, J. E. and S. Gardell (1948). "On heparin monosulfuric acid." *J Biol Chem* 176(1): 267-76.
- Kainulainen, V., H. Wang, et al. (1998). "Syndecans, heparan sulfate proteoglycans, maintain the proteolytic balance of acute wound fluids." *J Biol Chem* 273(19): 11563-9.
- Kalluri, R. and M. Zeisberg (2006). "Fibroblasts in cancer." *Nat Rev Cancer* 6(5): 392-401.
- Kanwar, Y. S. and M. G. Farquhar (1979). "Presence of heparan sulfate in the glomerular basement membrane." *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(3): 1303-7.
- Kanwar, Y. S., A. Linker, et al. (1980). "Increased permeability of the glomerular basement membrane to ferritin after removal of glycosaminoglycans (heparan sulfate) by enzyme digestion." *J Cell Biol* 86(2): 688-93.
- Kawashima H, K Atarashi et al. (2002). "Oversulfated chondroitin/dermatan sulfates containing GlcA β 1/IdoA α 1-3GalNAc(4,6-O-disulfate) interact with L- and P-selectin and chemokines." *J Biol Chem*. 277(15):12921-30.
- Kim, C. W., O. A. Goldberger, et al. (1994). "Members of the syndecan family of heparan sulfate proteoglycans are expressed in distinct cell-, tissue-, and development-specific patterns." *Mol Biol Cell* 5(7): 797-805.
- Kimura S, J Cheng et al. (1999). "Basement membrane heparan sulfate proteoglycan (perlecan) synthesized by ACC3, adenoid cystic carcinoma cells of human salivary gland origin." *J Biochem*. 125(2):406-13.
- Kishibe J, S Yamada et al. (2000). "Structural requirements of heparan sulfate for the binding to the tumor-derived adhesion factor/angiomodulin that induces cord-like structures to ECV-304 human carcinoma cells." *J Biol Chem*. 275(20):15321-9.
- Kjellen, L. (2003). "Glucosaminyl N-deacetylase/N-sulphotransferases in heparan sulphate biosynthesis and biology." *Biochem Soc Trans* 31(2): 340-2.
- Kjellen, L. and U. Lindahl (1991). "Proteoglycans: structures and interactions." *Annu Rev Biochem* 60: 443-75.
- Koda, J. E. and M. Bernfield (1984). "Heparan sulfate proteoglycans from mouse mammary epithelial cells. Basal extracellular proteoglycan binds specifically to native type I collagen fibrils." *J Biol Chem* 259(19): 11763-70.
- Kojima, T., N. W. Shworak, et al. (1992). "Molecular cloning and expression of two distinct cDNA-encoding heparan sulfate proteoglycan core proteins from a rat endothelial cell line." *J Biol Chem* 267(7): 4870-7.
- Kosaki, R., K. Watanabe, et al. (1999). "Overproduction of hyaluronan by expression of the hyaluronan synthase Has2 enhances anchorage-independent growth and tumorigenicity." *Cancer Res* 59(5): 1141-5.
- Kowanetz, M., Valcourt, U., Bergström, R., Heldin, C. H. and Moustakas, A. (2004). Id2 and Id3 define the potency of cell proliferation and differentiation

Bibliográficas

- responses to transforming growth factor beta and bone morphogenetic protein. Mol Cell Biol. **24**(10):4241-54.
- Koyama, H., T. Hibi, et al. (2007). "Hyperproduction of hyaluronan in neu-induced mammary tumor accelerates angiogenesis through stromal cell recruitment: possible involvement of versican/PG-M." Am J Pathol **170**(3): 1086-99.
- Koziel, L., M. Kunath, et al. (2004). "Ext1-dependent heparan sulfate regulates the range of Ihh signaling during endochondral ossification." Dev Cell **6**(6): 801-13.
- Kraemer, P. M. (1971). "Heparan sulfates of cultured cells. I. Membrane-associated and cell-sap species in Chinese hamster cells." Biochemistry **10**(8): 1437-45.
- Kramer, K. L. and H. J. Yost (2002). "Ectodermal syndecan-2 mediates left-right axis formation in migrating mesoderm as a cell-nonautonomous Vg1 cofactor." Dev Cell **2**(1): 115-24.
- Kresse, H., H. Hausser, et al. (1993). "Small proteoglycans." Experientia **49**(5): 403-16.
- Kreuger, J., D. Spillmann, et al. (2006). "Interactions between heparan sulfate and proteins: the concept of specificity." J Cell Biol **174**(3): 323-7.
- Krusius, T., K. R. Gehlsen, et al. (1987). "A fibroblast chondroitin sulfate proteoglycan core protein contains lectin-like and growth factor-like sequences." J Biol Chem **262**(27): 13120-5.
- Krusius, T. and E. Ruoslahti (1986). "Primary structure of an extracellular matrix proteoglycan core protein deduced from cloned cDNA." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(20): 7683-7.
- Ladanyi, A., M. Gallai, et al. (2001). "Expression of a decorin-like molecule in human melanoma." Pathol Oncol Res **7**(4): 260-6
- Lander, A. D., Q. Nie, et al. (2002). "Do morphogen gradients arise by diffusion?" Dev Cell **2**(6): 785-96.
- Lander, A. D. and S. B. Selleck (2000). "The elusive functions of proteoglycans: in vivo veritas." J Cell Biol **148**(2): 227-32.
- Lane, D. A., G. Pejler, et al. (1986). "Neutralization of heparin-related saccharides by histidine-rich glycoprotein and platelet factor 4." J Biol Chem **261**(9): 3980-6.
- LaRochelle, W. J., M. May-Siroff, et al. (1991). "A novel mechanism regulating growth factor association with the cell surface: identification of a PDGF retention domain." Genes Dev **5**(7): 1191-9.
- Laterra, J., R. Ansbacher, et al. (1980). "Glycosaminoglycans that bind cold-insoluble globulin in cell-substratum adhesion sites of murine fibroblasts." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(11): 6662-6.
- Laurent, T. C. and J. R. Fraser (1986). "The properties and turnover of hyaluronan." Ciba Found Symp **124**: 9-29.
- Lidholt, K., L. Kjellen, et al. (1989). "Biosynthesis of heparin. Relationship between the polymerization and sulphation processes." Biochem J **261**(3): 999-1007.
- Lind, T., Lindahl, U. and Lidholt, K. (1993). Biosynthesis of heparin/heparan sulfate. Identification of a 70-kDa protein catalyzing both the D-glucuronosyl- and the N-acetyl-D-glucosaminyltransferase reactions. J Biol Chem. **268**(28):20705-8.
- Lindahl, U. (1966). "Further characterization of the heparin-protein linkage region." Biochim Biophys Acta **130**(2): 368-82.
- Lindahl, U. (1994). "[The great Scandinavian Jahre Prize 1993. What is the function of heparan sulfate?]." Nord Med **109**(1): 4-8.
- Lindahl, U. and M. Hook (1978). "Glycosaminoglycans and their binding to biological macromolecules." Annu Rev Biochem **47**: 385-417.
- Lindahl, U., M. Kusche-Gullberg, et al. (1998). "Regulated diversity of heparan sulfate." J Biol Chem **273**(39): 24979-82.

Bibliográficas

- Linhardt, R. J. and R. E. Hileman (1995). "Dermatan sulfate as a potential therapeutic agent." *Gen Pharmacol* **26**(3): 443-51.
- Linhardt, R. J. and T. Toida (2004). "Role of glycosaminoglycans in cellular communication." *Acc Chem Res* **37**(7): 431-8.
- Lohmander, L. S., S. De Luca, et al. (1980). "Oligosaccharides on proteoglycans from the swarm rat chondrosarcoma." *J Biol Chem* **255**(13): 6084-91.
- Lopes, C. C., C. P. Dietrich, et al. (2006). "Specific structural features of syndecans and heparan sulfate chains are needed for cell signaling." *Braz J Med Biol Res* **39**(2): 157-67.
- López-Casillas, F., Cheifetz, S., Doody, J., Andres, J. L., Lane, W. S. and Massagué, J. (1991). Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF-beta receptor system. *Cell*. **67**(4):785-95.
- MacArthur, J. M., J. R. Bishop, et al. (2007). "Liver heparan sulfate proteoglycans mediate clearance of triglyceride-rich lipoproteins independently of LDL receptor family members." *J Clin Invest* **117**(1): 153-64.
- Mahley, R. W. and Z. S. Ji (1999). "Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E." *J Lipid Res* **40**(1): 1-16.
- Marcum, J. A., Conway, E. M., Youssoufian, H. and Rosenberg, R. D. (1986). Anticoagulant active heparin-like molecules from cultured fibroblasts. *Exp Cell Res*. **166**(1):253-8.
- Martins JR, ME Gadelha, et al. (2000) "Patients with head and neck tumors excrete a chondroitin sulfate with a low degree of sulfation: a new tool for diagnosis and follow-up of cancer therapy." *Otolaryngol Head Neck Surg*. **122**(1):115-8
- McDonnell, K. M. and W. A. Grow (2004). "Reduced glycosaminoglycan sulfation diminishes the agrin signal transduction pathway." *Dev Neurosci* **26**(1): 1-10.
- Medeiros, G. F., A. Mendes, et al. (2000). "Distribution of sulfated glycosaminoglycans in the animal kingdom: widespread occurrence of heparin-like compounds in invertebrates." *Biochim Biophys Acta* **1475**(3): 287-94.
- Merrilees MJ and GJ. Finlay (1985). Human tumor cells in culture stimulate glycosaminoglycan synthesis by human skin fibroblasts. *Lab Invest*. **53**(1):30-6.
- Meyer, K., E. M. Smyth, et al. (1938). "The Nature of the Muco-Polysaccharide of Synovial Fluid." *Science* **88**(2275): 129.
- Michelacci, Y. M. and C. P. Dietrich (1976). "Structure of chondroitin sulfates. Analyses of the products formed from chondroitin sulfates A and C by the action of the chondroitinases C and AC from *Flavobacterium heparinum*." *Biochim Biophys Acta* **451**(2): 436-43.
- Michelacci, Y. M., J. Laredo and C.P. Dietrich (1981). "Proteoglycans and chondroitin sulfates from human multiple chondroma (enchondromatosis)." *Braz J Med Biol Res* **14**(2-3): 161-72.
- Michelacci, Y. M., P. A. Mourao, et al. (1979). "Chondroitin sulfates and proteoglycans from normal and arthrosic human cartilage." *Connect Tissue Res* **7**(1): 29-36.
- Modrowski, D., M. Basle, et al. (2000). "Syndecan-2 is involved in the mitogenic activity and signaling of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in osteoblasts." *J Biol Chem* **275**(13): 9178-85.
- Mook-Jung, I. and H. Gordon (1995). "Acetylcholine receptor clustering in C2 muscle cells requires chondroitin sulfate." *J Neurobiol* **28**(4): 482-92.
- Mourao, P. A. and C. P. Dietrich (1973). "Differences in the content of chondroitin sulfate C and chondroitin sulfate A in the epiphyseal growth cartilages of human vertebrae and long bones." *Biochim Biophys Acta* **320**(1): 210-3.

Bibliográficas

- Mourao, P. A., B. Giumaraes, et al. (1998). "Antithrombotic activity of a fucosylated chondroitin sulphate from echinoderm: sulphated fucose branches on the polysaccharide account for its antithrombotic action." *Br J Haematol* **101**(4): 647-52.
- Mourao, P. A., Y. M. Michelacci, O.M.S. Toledo et al. (1979). "Glycosaminoglycans and proteoglycans of normal and tumoral cartilages of humans and rats." *Cancer Res* **39**(7 Pt 1): 2802-6.
- Mourao, P. A., S. Rozenfeld, et al. (1976). "The distribution of chondroitin sulfates in articular and growth cartilages of human bones." *Biochim Biophys Acta* **428**(1): 19-26.
- Munesue S, Y Yoshitomi et al. (2007). "A novel function of syndecan-2, suppression of matrix metalloproteinase-2 activation, which causes suppression of metastasis." *J Biol Chem*. **21**;282(38):28164-74.
- Mueller, M. M. and N. E. Fusenig (2004). "Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer." *Nat Rev Cancer* **4**(11): 839-49.
- Nader, H. B., S. F. Chavante, et al. (1999). "Heparan sulfates and heparins: similar compounds performing the same functions in vertebrates and invertebrates?" *Braz J Med Biol Res* **32**(5): 529-38.
- Nader, H. B. and C. P. Dietrich (1974). "Effect of heparin sulfate fractions on coagulation and hemostasis." *Proc Soc Exp Biol Med* **146**(2): 504-8.
- Nader, H. B., C. P. Dietrich, et al. (1987). "Heparin sequences in the heparan sulfate chains of an endothelial cell proteoglycan." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(11): 3565-9.
- Nader, H. B., T. M. Ferreira, et al. (1984). "Isolation and structural studies of heparan sulfates and chondroitin sulfates from three species of molluscs." *J Biol Chem* **259**(3): 1431-5.
- Nader, H. B., T. M. Ferreira, et al. (1988). "Maintenance of heparan sulfate structure throughout evolution: chemical and enzymic degradation, and ¹³C-n.m.r.-spectral evidence." *Carbohydr Res* **184**: 292-300.
- Nader, H. B., C. C. Lopes, et al. (2004). "Heparins and heparinoids: occurrence, structure and mechanism of antithrombotic and hemorrhagic activities." *Curr Pharm Des* **10**(9): 951-66.
- Nader, H. B., W. Marx, et al. (1980). "Glycosaminoglycans of some mouse mastocytomas." *Biochim Biophys Acta* **631**(3): 463-78.
- Nader, H. B., F. W. Oliveira, et al. (1996). "Synchronized order of appearance of hyaluronic acid (or acidic galactan) --> chondroitin C-6 sulfate --> chondroitin C-4/C-6 sulfate, heparan sulfate, dermatan sulfate --> heparin during morphogenesis, differentiation and development." *Braz J Med Biol Res* **29**(9): 1221-6.
- Nader, H. B., M. A. Porcionatto, et al. (1990). "Purification and substrate specificity of heparitinase I and heparitinase II from *Flavobacterium heparinum*. Analyses of the heparin and heparan sulfate degradation products by ¹³C NMR spectroscopy." *J Biol Chem* **265**(28): 16807-13.
- Nakato H, K Kimata (2002). "Heparan sulfate fine structure and specificity of proteoglycan functions." *Biochim Biophys Acta*. **1573**(3):312-8.
- Nandini, C. D., T. Mikami, et al. (2004). "Structural and functional characterization of oversulfated chondroitin sulfate/dermatan sulfate hybrid chains from the notochord of hagfish. Neuritogenic and binding activities for growth factors and neurotrophic factors." *J Biol Chem* **279**(49): 50799-809.
- Nash, M. A., M. T. Deavers, et al. (2002). "The expression of decorin in human ovarian tumors." *Clin Cancer Res* **8**(6): 1754-60.

Bibliográficas

- Nilsson, B., S. De Luca, et al. (1982). "Structures of N-linked and O-linked oligosaccharides on proteoglycan monomer isolated from the Swarm rat chondrosarcoma." *J Biol Chem* **257**(18): 10920-7.
- Noble NA, JR Harper et al. (1992). "In vivo interactions of TGF-beta and extracellular matrix." *Prog Growth Factor Res.* **4**(4):369-82.
- Obrink, B., H. Lindstrom, et al. (1976). "Calcium-requirement for a reversible binding of membrane proteins to rat liver plasma membranes." *FEBS Lett* **70**(1): 28-32.
- Oh, E. S., Woods, A. and Couchman, J. R. (1997). Syndecan-4 proteoglycan regulates the distribution and activity of protein kinase C. *J Biol Chem.* **272**(13):8133-6.
- Oldberg, A., P. Antonsson, et al. (1989). "A collagen-binding 59-kd protein (fibromodulin) is structurally related to the small interstitial proteoglycans PG-S1 and PG-S2 (decorin)." *EMBO J* **8**(9): 2601-4.
- Orimo, A., P. B. Gupta, et al. (2005). "Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion." *Cell* **121**(3): 335-48.
- Orosco A, O Fromigué et al. (2007). "Syndecan-2 affects the basal and chemotherapy-induced apoptosis in osteosarcoma." *Cancer Res.* **67**(8):3708-15.
- Pardali, K. and A. Moustakas (2007). "Actions of TGF-beta as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer." *Biochim Biophys Acta* **1775**(1): 21-62.
- Park, P. W., O. Reizes, et al. (2000). "Cell surface heparan sulfate proteoglycans: selective regulators of ligand-receptor encounters." *J Biol Chem* **275**(39): 29923-6.
- Park H, Y Kim et al. (2002). "Syndecan-2 mediates adhesion and proliferation of colon carcinoma cells." *J Biol Chem.* **16**:277(33):29730-6.
- Passerotti, C. C., Bonfim, A., Martins, J. R., Dall'Oglio, M. F., Sampaio, L. O., Mendes, A., Ortiz, V., Srougi, M., Dietrich, C. P. and Nader, H. B. (2006). Urinary hyaluronan as a marker for the presence of residual transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Eur Urol.* **49**(1):71-5.
- Patthy, L. (1987). "Detecting homology of distantly related proteins with consensus sequences." *J Mol Biol* **198**(4): 567-77.
- Paulus, W., I. Baur, et al. (1996). "Differential expression of versican isoforms in brain tumors." *J Neuropathol Exp Neurol* **55**(5): 528-33.
- Pavão, M. S., Mourão, P. A., Mulloy, B. and Tollefsen, D. M. (1995). A unique dermatan sulfate-like glycosaminoglycan from ascidian. Its structure and the effect of its unusual sulfation pattern on anticoagulant activity. *J Biol Chem.* **270**(52):31027-36.
- Pejler, G., Abrink, M. and Wernersson, S. (2009). Serglycin proteoglycan: regulating the storage and activities of hematopoietic proteases. *Biofactors.* **35**(1):61-8.
- Pejler, G., G. Backstrom, et al. (1987). "Structure and affinity for antithrombin of heparan sulfate chains derived from basement membrane proteoglycans." *J Biol Chem* **262**(11): 5036-43.
- Pejler, G. and G. David (1987). "Basement-membrane heparan sulphate with high affinity for antithrombin synthesized by normal and transformed mouse mammary epithelial cells." *Biochem J* **248**(1): 69-77.
- Peretti, T., Waisberg, J., Mader, A. M., de Matos, L. L., da Costa, R. B., Conceição, G. M., Lopes, A. C., Nader, H. B. and Pinhal, M. A. (2008). Heparanase-2, syndecan-1, and extracellular matrix remodeling in colorectal carcinoma. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* **20**(8):716-8.
- Piek, E., C. H. Heldin, et al. (1999). "Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling." *FASEB J* **13**(15): 2105-24.

Bibliográficas

- Pierce, A., M. Lyon, et al. (1992). "Molecular cloning of the major cell surface heparan sulfate proteoglycan from rat liver." *J Biol Chem* **267**(6): 3894-900.
- Poblacion, C. A. and Y. M. Michelacci (1986). "Structural differences of dermatan sulfates from different origins." *Carbohydr Res* **147**(1): 87-100.
- Poole, A. R., C. Webber, et al. (1986). "Localization of a dermatan sulfate proteoglycan (DS-PGII) in cartilage and the presence of an immunologically related species in other tissues." *J Histochem Cytochem* **34**(5): 619-25.
- Porcionatto, M. A., C. R. Moreira, et al. (1998). "Stimulation of heparan sulfate proteoglycan synthesis and secretion during G1 phase induced by growth factors and PMA." *J Cell Biochem* **70**(4): 563-72.
- Porcionatto, M. A., H. B. Nader, et al. (1999). "Heparan sulfate and cell division." *Braz J Med Biol Res* **32**(5): 539-44.
- Porcionatto, M. A., C. R. Pinto, et al. (1994). "Heparan sulfate proteoglycan and control of cell proliferation: enhanced synthesis induced by phorbol ester (PMA) during G(1)-phase." *Braz J Med Biol Res* **27**(9): 2185-90.
- Pukkila, M. J., A. S. Kosunen, et al. (2004). "Versican expression in pharyngeal squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study." *J Clin Pathol* **57**(7): 735-9.
- Raines, E. W. and R. Ross (1992). "Compartmentalization of PDGF on extracellular binding sites dependent on exon-6-encoded sequences." *J Cell Biol* **116**(2): 533-43.
- Rapraeger, A. and M. Bernfield (1985). "Cell surface proteoglycan of mammary epithelial cells. Protease releases a heparan sulfate-rich ectodomain from a putative membrane-anchored domain." *J Biol Chem* **260**(7): 4103-9.
- Rapraeger, A. C. (1995). "In the clutches of proteoglycans: how does heparan sulfate regulate FGF binding?" *Chem Biol* **2**(10): 645-9.
- Razi, N. and U. Lindahl (1995). "Biosynthesis of heparin/heparan sulfate. The D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase reaction: target and inhibitor saccharides." *J Biol Chem* **270**(19): 11267-75.
- Reizes, O., J. Lincecum, et al. (2001). "Transgenic expression of syndecan-1 uncovers a physiological control of feeding behavior by syndecan-3." *Cell* **106**(1): 105-16.
- Ricciardelli C, DI Quinn (1999). "Elevated levels of peritumoral chondroitin sulfate are predictive of poor prognosis in patients treated by radical prostatectomy for early-stage prostate cancer."
- Ricciardelli, C., J. H. Brooks, et al. (2002). "Regulation of stromal versican expression by breast cancer cells and importance to relapse-free survival in patients with node-negative primary breast cancer." *Clin Cancer Res* **8**(4): 1054-60.
- Ricciardelli C, K Mayne et al. (1997) Elevated stromal chondroitin sulfate glycosaminoglycan predicts progression in early-stage prostate cancer. *Clin Cancer Res.* **3**(6):983-92.
- Ricciardelli, C., K. Mayne, et al. (1998). "Elevated levels of versican but not decorin predict disease progression in early-stage prostate cancer." *Clin Cancer Res* **4**(4): 963-71.
- Roberts AB, MB Sporn (1993). "Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor-beta (TGF-beta)." *Growth Factors.* **8**(1):1-9.
- Ruoslahti, E. (1988). "Structure and biology of proteoglycans." *Annu Rev Cell Biol* **4**: 229-55.
- Ruoslahti, E. (1989). "Proteoglycans in cell regulation." *J Biol Chem* **264**(23): 13369-72.
- Ruoslahti, E. and Y. Yamaguchi (1991). "Proteoglycans as modulators of growth factor activities." *Cell* **64**(5): 867-9.

Bibliográficas

- Safaiyan F, U Lindahl et al. (1998). "Selective reduction of 6-O-sulfation in heparan sulfate from transformed mammary epithelial cells." Eur J Biochem. 252(3):576-82.
- Sakashita, S., E. Engvall, et al. (1980). "Basement membrane glycoprotein laminin binds to heparin." FEBS Lett 116(2): 243-6.
- Sakko, A. J., C. Ricciardelli, et al. (2003). "Modulation of prostate cancer cell attachment to matrix by versican." Cancer Res 63(16): 4786-91.
- Sakko, A. J., C. Ricciardelli, et al. (2001). "Versican accumulation in human prostatic fibroblast cultures is enhanced by prostate cancer cell-derived transforming growth factor beta1." Cancer Res 61(3): 926-30.
- Saksela, O., D. Moscatelli, et al. (1988). "Endothelial cell-derived heparan sulfate binds basic fibroblast growth factor and protects it from proteolytic degradation." J Cell Biol 107(2): 743-51.
- Sampaio, L. de O., Bayliss, M. T., Hardingham, T. E. and Muir, H. (1988). Dermatan sulphate proteoglycan from human articular cartilage. Variation in its content with age and its structural comparison with a small chondroitin sulphate proteoglycan from pig laryngeal cartilage. Biochem J. 254(3):757-64.
- Sampaio, L. O. and C. P. Dietrich (1981). "Changes of sulfated mucopolysaccharides and mucopolysaccharidases during fetal development." J Biol Chem 256(17): 9205-10.
- Sampaio, L. O., C. P. Dietrich, et al. (1977). "Changes in sulfated mucopolysaccharide composition of mammalian tissues during growth and in cancer tissues." Biochim Biophys Acta 498(1): 123-31.
- Santra, M., D. M. Mann, et al. (1997). "Ectopic expression of decorin protein core causes a generalized growth suppression in neoplastic cells of various histogenetic origin and requires endogenous p21, an inhibitor of cyclin-dependent kinases." J Clin Invest 100(1): 149-57.
- Sasisekharan, R., Z. Shriver, et al. (2002). "Roles of heparan-sulphate glycosaminoglycans in cancer." Nat Rev Cancer 2(7): 521-8.
- Saunders, S., M. Jalkanen, et al. (1989). "Molecular cloning of syndecan, an integral membrane proteoglycan." J Cell Biol 108(4): 1547-56.
- Schedin, P. and A. Elias (2004). "Multistep tumorigenesis and the microenvironment." Breast Cancer Res 6(2): 93-101.
- Schwartz, N. B. and L. Roden (1975). "Biosynthesis of chondroitin sulfate. Solubilization of chondroitin sulfate glycosyltransferases and partial purification of uridine diphosphate-D-galactose:D-xylose galactosyltrans." J Biol Chem 250(13): 5200-7.
- Scott, J. E. and C. R. Orford (1981). "Dermatan sulphate-rich proteoglycan associates with rat tail-tendon collagen at the d band in the gap region." Biochem J 197(1): 213-6.
- Segarini, P. R. and S. M. Seyedin (1988). "The high molecular weight receptor to transforming growth factor-beta contains glycosaminoglycan chains." J Biol Chem 263(17): 8366-70.
- Shatton, J. and M. Schubert (1954). "Isolation of a mucoprotein from cartilage." J Biol Chem 211(2): 565-73.
- Sher, I., S. Zisman-Rozen, et al. (2006). "Targeting perlecan in human keratinocytes reveals novel roles for perlecan in epidermal formation." J Biol Chem 281(8): 5178-87.
- Shworak, N. W., M. Shirakawa, et al. (1994). "Characterization of ryudocan glycosaminoglycan acceptor sites." J Biol Chem 269(33): 21204-14.
- Silva, M., C. P. Dietrich, et al. (1976). "On the structure of heparitin sulfates. Analyses of the products formed from heparitin sulfates by two heparitinases

Bibliográficas

- and a heparinase from *Flavobacterium heparinum*." Biochim Biophys Acta **437**(1): 129-41.
- Silva, M. E. and C. P. Dietrich (1974). "Isolation and partial characterization of three induced enzymes from *Flavobacterium heparinum* involved in the degradation of heparin and heparitin sulfates." Biochem Biophys Res Commun **56**(4): 965-72.
- Simpson, M. A., C. M. Wilson, et al. (2002). "Manipulation of hyaluronan synthase expression in prostate adenocarcinoma cells alters pericellular matrix retention and adhesion to bone marrow endothelial cells." J Biol Chem **277**(12): 10050-7.
- Smetsers TF, EM van de Westerlo et al. (2003) "Localization and characterization of melanoma-associated glycosaminoglycans: differential expression of chondroitin and heparan sulfate epitopes in melanoma." Cancer Res. **63**(11):2965-70.
- Spillmann, D., J. E. Thomas-Oates, et al. (1995). "Characterization of a novel sulfated carbohydrate unit implicated in the carbohydrate-carbohydrate-mediated cell aggregation of the marine sponge *Microciona prolifera*." J Biol Chem **270**(10): 5089-97.
- Sporn, M. B. and G. J. Todaro (1980). "Autocrine secretion and malignant transformation of cells." N Engl J Med **303**(15): 878-80.
- Stamatoglou, S. C. and J. M. Keller (1982). "Interactions of cellular glycosaminoglycans with plasma fibronectin and collagen." Biochim Biophys Acta **719**(1): 90-7.
- Staquicini, F. I., Moreira, C. R., Nascimento, F. D., Tersariol, I. L., Nader, H. B., Dietrich, C. P. and Lopes, J. D. (2003). Enzyme and integrin expression by high and low metastatic melanoma cell lines. Melanoma Res. **13** (1):11-8.
- Stapp, M. A., H. E. Gibson, et al. (2002). "Defects in keratinocyte activation during wound healing in the syndecan-1-deficient mouse." J Cell Sci **115**(Pt 23): 4517-31.
- Stickens, D., B. M. Zak, et al. (2005). "Mice deficient in Ext2 lack heparan sulfate and develop exostoses." Development **132**(22): 5055-68.
- Strader, A. D., O. Reizes, et al. (2004). "Mice lacking the syndecan-3 gene are resistant to diet-induced obesity." J Clin Invest **114**(9): 1354-60.
- Straus, A. H., Nader, H. B. and Dietrich, C. P. (1982). Absence of heparin or heparin-like compounds in mast-cell-free tissues and animals. Biochim Biophys Acta. **717**(3):478-85.
- Sugahara K., T. Mikami, et al.(2003). Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. Curr Opin Struct Biol. **13**(5):612-20.
- Sugahara K, T.Mikami (2007). Chondroitin/dermatan sulfate in the central nervous system. Curr Opin Struct Biol.**17**(5):536-45.
- Sweet, M. B., E. J. Thonar, et al. (1977). "Regional distribution of water and glycosaminoglycan in immature articular cartilage." Biochim Biophys Acta **500**(1): 173-86.
- ten Dam GB, EM van de Westerlo et al. (2007). "Antibody GD3G7 selected against embryonic glycosaminoglycans defines chondroitin sulfate-E domains highly up-regulated in ovarian cancer and involved in vascular endothelial growth factor binding." Am J Pathol. **171**(4):1324-33.
- Tersariol, I. L., T. M. Ferreira, et al. (1994). "Sequencing of heparan sulfate proteoglycans: identification of variable and constant oligosaccharide regions in eight heparan sulfate proteoglycans of different origins." Braz J Med Biol Res **27**(9): 2097-102.

Bibliográficas

- Theocharis, A. D. (2002). "Human colon adenocarcinoma is associated with specific post-translational modifications of versican and decorin." *Biochim Biophys Acta* **1588**(2): 165-72.
- Theocharis, A. D. and D. A. Theocharis (2002). "High-performance capillary electrophoretic analysis of hyaluronan and galactosaminoglycan-disaccharides in gastrointestinal carcinomas. Differential disaccharide composition as a possible tool-indicator for malignancies." *Biomed Chromatogr* **16**(2): 157-61.
- Theocharis, A. D., M. E. Tsara, et al. (2000). "Pancreatic carcinoma is characterized by elevated content of hyaluronan and chondroitin sulfate with altered disaccharide composition." *Biochim Biophys Acta* **1502**(2): 201-6.
- Theocharis, A. D., D. H. Vynios, et al. (2003). "Altered content composition and structure of glycosaminoglycans and proteoglycans in gastric carcinoma." *Int J Biochem Cell Biol* **35**(3): 376-90.
- Theodoro, T. R., de Matos, L. L., Sant Anna, A. V., Fonseca, F. L., Semedo, P., Martins, L. C., Nader, H. B., Del Giglio, A. and da Silva Pinhal, M. A. (2007). Heparanase expression in circulating lymphocytes of breast cancer patients depends on the presence of the primary tumor and/or systemic metastasis. *Neoplasia*. **9**(6):504-10.
- Thiery, J. P. (2003). "Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies." *Curr Opin Cell Biol* **15**(6): 740-6.
- Tkachenko, E., J. M. Rhodes, et al. (2005). "Syndecans: new kids on the signaling block." *Circ Res* **96**(5): 488-500.
- Toledo, O. M. and C. P. Dietrich (1977). "Tissue specific distribution of sulfated mucopolysaccharides in mammals." *Biochim Biophys Acta* **498**(1): 114-22.
- Toma, L., P. Berninzone, et al. (1998). "The putative heparin-specific N-acetylglucosaminyl N-Deacetylase/N-sulfotransferase also occurs in non-heparin-producing cells." *J Biol Chem* **273**(35): 22458-65.
- Touab, M., J. Villena, et al. (2002). "Versican is differentially expressed in human melanoma and may play a role in tumor development." *Am J Pathol* **160**(2): 549-57.
- Turnbull, J., A. Powell, et al. (2001). "Heparan sulfate: decoding a dynamic multifunctional cell regulator." *Trends Cell Biol* **11**(2): 75-82.
- Turnbull, J. E. and J. T. Gallagher (1990). "Molecular organization of heparan sulphate from human skin fibroblasts." *Biochem J* **265**(3): 715-24.
- Ueno, M., S. Yamada, et al. (2001). "Structural characterization of heparan sulfate and chondroitin sulfate of syndecan-1 purified from normal murine mammary gland epithelial cells. Common phosphorylation of xylose and differential sulfation of galactose in the protein linkage region tetrasaccharide sequence." *J Biol Chem* **276**(31): 29134-40.
- Valcourt, U., M. Kowanz, et al. (2005). "TGF-beta and the Smad signaling pathway support transcriptomic reprogramming during epithelial-mesenchymal cell transition." *Mol Biol Cell* **16**(4): 1987-2002.
- Voutilainen, K., M. Anttila, et al. (2003). "Versican in epithelial ovarian cancer: relation to hyaluronan, clinicopathologic factors and prognosis." *Int J Cancer* **107**(3): 359-64.
- Walz A, S McFarlane et al. (1997). "Essential role of heparan sulfates in axon navigation and targeting in the developing visual system." *Development*. **124**(12):2421-30.
- Wang, L., M. Fuster, et al. (2005). "Endothelial heparan sulfate deficiency impairs L-selectin- and chemokine-mediated neutrophil trafficking during inflammatory responses." *Nat Immunol* **6**(9): 902-10.
- Wight, T.N. (2002). "Versican: a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology". *Curr Opin Cell Biol* **14**: 617-623.

Bibliográficas

- Woods, A. and J. R. Couchman (1994). "Syndecan 4 heparan sulfate proteoglycan is a selectively enriched and widespread focal adhesion component." Mol Biol Cell 5(2): 183-92.
- Woods, A. and J. R. Couchman (1996). "Signaling from the matrix to the cytoskeleton: role of cell surface proteoglycans in matrix assembly." Kidney Int Suppl 54: S64-7.
- Woods, A. and J. R. Couchman (1998). "Syndecans: synergistic activators of cell adhesion." Trends Cell Biol 8(5): 189-92.
- Yamori T, DM Ota et al. (1988) Increased content of chondroitin sulfate proteoglycan in human colorectal carcinoma metastases compared with the primary tumor as determined by an anti-chondroitin-sulfate monoclonal antibody. J Cell Biochem. 36(4):405-16.
- Yamaguchi, Y., D. M. Mann, et al. (1990). "Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin." Nature 346(6281): 281-4.
- Yanagishita, M. and V. C. Hascall (1992). "Cell surface heparan sulfate proteoglycans." J Biol Chem 267(14): 9451-4.
- Yang, B. L., Y. Zhang, et al. (1999). "Cell adhesion and proliferation mediated through the G1 domain of versican." J Cell Biochem 72(2): 210-20.
- Yokoyama H, T Deckert (1996). "Central role of TGF-beta in the pathogenesis of diabetic nephropathy and macrovascular complications: a hypothesis." Diabet Med. 13(4):313-20.
- Yue X, TM Schultheiss et al. (2004). "Role of heparan sulfate in dextral heart looping in chick." Glycobiology. 14(8):745-55.
- Zavadil, J., M. Bitzer, et al. (2001). "Genetic programs of epithelial cell plasticity directed by transforming growth factor-beta." Proc Natl Acad Sci U S A 98(12): 6686-91.
- Zcharia, E., S. Metzger, et al. (2004). "Transgenic expression of mammalian heparanase uncovers physiological functions of heparan sulfate in tissue morphogenesis, vascularization, and feeding behavior." FASEB J 18(2): 252-63.
- Zeisberg, M. and R. Kalluri (2004). "The role of epithelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis." J Mol Med 82(3): 175-81.
- Zernichow, L., M. Abrink, et al. (2006). "Serglycin is the major secreted proteoglycan in macrophages and has a role in the regulation of macrophage tumor necrosis factor-alpha secretion in response to lipopolysaccharide." J Biol Chem 281(37): 26792-801.
- Zhang, L. and J. D. Esko (1994). "Amino acid determinants that drive heparan sulfate assembly in a proteoglycan." J Biol Chem 269(30): 19295-9.
- Zhang, Y., L. Cao, et al. (1998). "The G3 domain of versican enhances cell proliferation via epidermal growth factor-like motifs." J Biol Chem 273(33): 21342-51.
- Zhou, Z., J. Wang, et al. (2004). "Impaired angiogenesis, delayed wound healing and retarded tumor growth in perlecan heparan sulfate-deficient mice." Cancer Res 64(14): 4699-702.
- Zimmermann, D. R. and E. Ruoslahti (1989). "Multiple domains of the large fibroblast proteoglycan, versican." EMBO J 8(10): 2975-81.
- Zimmermann, R., P. Sartipy, et al. (2000). "Endogenously produced glycosaminoglycans affecting the release of lipoprotein lipase from macrophages and the interaction with lipoproteins." Biochim Biophys Acta 1484(2-3): 316-24.

Parecer do Comitê de Ética



São Paulo, 24 de fevereiro de 2006.
CEP 1595/05

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) RITCHELLI RICCI
Co-Investigadores: Maria Aparecida da Silva Pinhal; Jacques Waisberg; thais Peretti; Leny Toma
Disciplina/Departamento: Clínica Médica/Medicina da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo
Patrocinador: CAPES.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: "**Expressão do sindecam-1 e das enzimas envolvidas na sulfatação do heparam sulfato em soro e sangue de pacientes com câncer**".

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: estudo clínico de alteração de proteoglicanos em pacientes com câncer.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: sem risco, desconforto leve com coletas de sangue.

OBJETIVOS: Investigar a expressão do sindecam-1 e das enzimas envolvidas na sulfatação do heparam sulfato em soro e sangue de pacientes com câncer.

RESUMO: Trabalhos anteriores relataram a alteração na sulfatação do heparam sulfato em pacientes com câncer e com base nestes dados será realizado neste estudo: dosagem de sindecam-1 no soro; extração de RNA total do sangue normal e de pacientes, com posterior análise dessa expressão por RT-PCR das enzimas de sulfatação do heparam sulfato : 2-O-sulfotransferase e 6-O-sulfotransferase; RT-PCR da Heparanase do sangue normal e de pacientes com câncer.

FUNDAMENTOS E RACIONAL: desenvolvimento ou aprimoramento de nova forma diagnóstica.

MATERIAL E MÉTODO: descritos os procedimentos.

TCLE: adequado.

DETALHAMENTO FINANCEIRO: CAPES R\$ 24 059,34.

CRONOGRAMA: 40 meses.

OBJETIVO ACADÊMICO: doutorado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: 19/02/2007 e 14/02/2008.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

Curriculum Vitae Resumido



Curriculum Vitae Resumido

Formação Acadêmica/ Titulação

- 2004-2009 Doutorado em Ciências (Clínica Médica).
Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, Brasil.
Título: Estudo das alterações de proteoglicanos e glicosaminoglicanos em linhagens celulares de câncer colorretal humano.
Orientadora: Profa. Dra. Leny Toma.
Bolsista da: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- 2001-2003 Mestrado em Engenharia Biomédica
Universidade do Vale do Paraíba, UNIVAP, Brasil/ Instituto do coração, INCOR, Brasil.
Título: Estudo *in vitro* da biomodulação de células endoteliais em resposta a diferentes dosimetrias do laser de semicondutor fosfeto de índio-gálio-alumínio.
Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina Chavantes
Bolsista da: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)
- 1994-1997 Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Braz Cubas, UBC, Brasil.
Título: Proliferação de fungos em baixas temperaturas.
Orientadora: Profa. Vanda Trettel.

Artigos publicados ou submetidos

1. RICCI, R. ; PAZOS, M.C. ; CORDEIRO, N. ; SHOJI, N. ; CHAVANTES, M. C. Estudo sobre o Efeito da Radiação com Laser de Baixa Intensidade (685 nm) na Proliferação de Células Endoteliais *in vitro*. (*aceito para publicação*). Jornal Brasileiro de Laser, 2009.
2. ARAUJO, A.P.B.; RIBEIRO, M.E.B.; RICCI, R.; TORQUATO, R.J.S.; PORCIONATTO, M. Syndecans, glypicans, heparan sulfate sulfotransferases and extracellular sulfatases expression by cerebellar granule cell precursors during early postnatal development Journal of Neurochemistry, (*em preparação*), 2009.
3. RICCI, R.; PAZOS, M.C.; BORGES, R; PACHECO-SOARES, C. Biomodulation with low-level laser radiation induces changes in endothelial cell actin filaments. Journal of Photochemistry and Photobiology. B: Biology, p. 6-8, 2008.
4. PAZOS, M.C.; RICCI, R.; SIMIONI, A.; LOPES, C.; TEDESCO, A. C.; NADER, H.B. Putative role of heparan sulfate proteoglycan expression and shedding on the proliferation and survival of cells after photodynamic therapy. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, v. 39, p. 1130-1141, 2007.

2. Capítulo de livro publicado

RICCI, R. Laser de Baixa Intensidade em Cultura de Células. In: Laser em Bio-Medicina - Princípios e Prática. Maria Cristina Chavantes (Org.) Editora: Atheneu, São Paulo - SP, v. 1, p. 101-109, 2009.

3. Revisor de periódico

2008 - Atual - Periódico: Jornal Brasileiro de Laser (JBL)

4. Comunicações em Congressos

1. RICCI, R., VICENTE, C.M., PINHAL, M.A.S., WAISBERG, J., NADER, H., TOMA, L. Modulation of Extracellular Matrix Production by Tumor and Stromal Cells in Culture In: *XIV Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular*, São Paulo-SP, 2008.
2. VICENTE, C.M., RICCI, R., HAAPALAINEN, E., NADER, H.B., TOMA, L. Influence of fibroblasts and their matrix on glycosaminoglycans synthesis of human colonic carcinoma cells. In: *XXVII Annual Meeting of the Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society (SBBq) and XI Congress of the Pan-American Association for Biochemistry and Molecular Biology (PABMB)*, Águas de Lindóia. Livro de Resumos, p. 112-112, 2008.
3. VICENTE, C.M., RICCI, R., HAAPALAINEN, E., NADER, H.B., TOMA, L. Effects of fixed fibroblasts on glycosaminoglycans synthesis of human colonic carcinoma cells. In: *5th International Conference on Proteoglycans*, ClubMed Rio das Pedras - RJ. Livro de Resumos, v.1, p.63 - 63, 2007.
4. ARAUJO, A. P. B., RICCI, R., TORQUATO, R.J.S., PORCIONATTO, M. Expression of heparan sulfate proteoglycans during early postnatal cerebellar development In: *5th International Conference on Proteoglycans*, ClubMed Rio das Pedras - RJ. Livro de Resumos, v.1, p.42- 42, 2007.
5. RICCI, R., VICENTE, C.M., PERETTI, T., WAISBERG, J., PINHAL, M.A.S., NADER, H., TOMA, L. Stromal cells stimulate glycosaminoglycans synthesis on human colonic carcinoma cells. In: *5th International Conference on Proteoglycans*, ClubMed Rio das Pedras - RJ. Livro de Resumos, v.1, p.41 - 41, 2007.
6. VICENTE, C.M., COULSON-THOMAS, V. J., RICCI, R., ALBANO, L.M., KIM, C.A., TOMA, L. Biochemical and structural analysis of keratan sulphate and chondroitin sulphate from urine of patients with mucopolysaccharidosis In: *XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular*, Águas de Lindóia, XXXV SBBq, 2006.

7. PERETTI, T., MAROLLA, A.P., RICCI, R., NADER, H.B., WAISBERG, J., PINHAL, M.A.S. Heparanase and Syndecan-1 Expression in Colorectal Cancer In: *XIII SBBC SIMEC - Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular, IX Simpósio Brasileiro de Matriz Extracelular e III International Symposium on Extracellular Matrix*, Búzios-RJ , 2006.
8. PAZOS, M.C., RICCI, R., SIMIONI, A., LOPES, C., TEDESCO, A. C., NADER, H.B., DIETRICH, C. P. V Induced Changes in Surviving Cells After Photodynamic Therapy In Vitro. In: *XIII SBBC SIMEC - Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular, IX Simpósio Brasileiro de Matriz Extracelular e III International Symposium on Extracellular Matrix*, Búzios - RJ , 2006.
9. PAZOS, M.C., RICCI, R., SIMIONI, A., LOPES, C., TEDESCO, A. C., NADER, H.B., DIETRICH, C. P. Surviving cells after photodynamic therapy: glycosaminoglycan expression, cell cycle and morphology In: *II International Workshop in IMRT/IGRT - III International Workshop in PD/PDT*, Rio de Janeiro - RJ, 2006.
10. BORGES, R.E., RICCI, R., SOARES, N.S., SOARES, C. P. Estudo da Bioestimulação com Laser de Baixa Potencia em Células Endoteliais. In: *V Encontro Latino Americano de Pós-Graduação, IX Encontro Latino Americano de Iniciação Científica - UNIVAP*, São José dos Campos - SP, 2005.
11. BORGES, R.E., RICCI, R., SOARES, C. P. Evaluation *in vitro* of neoangiogenesis through As-Ga laser bioestimulation in endothelial cells. In: *Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, - SBMM*, Águas de Lindóia, 2005.
12. MAROLLA, A.P., PERETTI, T., RICCI, R., WAISBERG, J., PINHAL, M.A.S. Glycosaminoglycans and Heparanase: Markers for Colorectal Cancer In: *5 th International Congress of Pharmaceutical Sciences. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, Ribeirão Preto, v.41, 2005.
13. PERETTI, T., RICCI, R., MAROLLA, A.P., WAISBERG, J., NADER, H., PINHAL, M.A.S. Heparanase Can Be Used as a Marker for Colorectal Câncer. In: *Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Celular - SBBq*, Águas de Lindóia, 2005.
14. PERETTI, T., MAROLLA, A.P., RICCI, R., NADER, H., DIETRICH, C. P., PINHAL, M.A.S. Immunohistochemical Quantification of Heparanase in Colorectal Cancer. In: *IV São Paulo Research Conference - Cancer Today from Molecular Biology to Treatment. Applied Cancer Research Supplement*, v.2. São Paulo - SP, 2005.
15. BORGES, R.E., RICCI, R., SOARES, N. S., SOARES, C. P. Resultados Preliminares do Estudo de Células Endoteliais em Resposta a Bioestimulação com Laser de Baixa Potência In: *IX INIC - Encontro Latino Americano de Iniciação Científica - UNIVAP*, São José dos Campos - SP, 2005.

16. BORGES, R.E., RICCI, R., SOARES, N.S., SOARES, C. P. Subcellular localization of octal-bromide zinc phthalocyanine in CHO-K1 cells culture. In: Brazilian Journal of Morphological Sciences, Águas de Lindóia. *Brazilian Journal of Morphological Sciences*, v.1, p.103 -103, 2005.
17. BORGES, R.E., RICCI, R., SOARES, N.S., SOARES, C.P. Preliminaries Results of the study of endothelial cells in reply to bioestimulation of low power laser therapy (LPL) In: *5 th Congress of the World Association for Laser Therapy - WALT. Photomedicine and Laser Surgery. Londres : Mary Ann Liebert, Inc., Guarujá - SP, 2004.*
18. RICCI, R., SOARES, C. P., PAZOS, M.C., PACHECO, M. T. T., CHAVANTES, M. C. Analysis *in vitro* of Low Power Laser Effects on the Treated Zone During Surgeries Transmyocardial Laser Revascularization. In: *5th Congress of the World Association for Laser Therapy - WALT. Photomedicine and Laser Surgery - Londres: Mary Ann Liebert, Inc., v.23. p.135 - 136, Guarujá - SP, 2004.*
19. SOARES, C.P., BORGES, R.E., RICCI, R., SOARES, N.S. Study of endothelial cells proliferation in response to stimulation to the Laser AsGa *in vitro*. In: *5th Congress of the World Association for Laser Therapy - WALT. Photomedicine and Laser Surgery - Londres: Mary Ann Liebert, Inc., Guarujá - SP, v.23, p.143 - 143, 2004.*

Abstract

ABSTRACT

Proteoglycans (PG) are complex macromolecules composed of linear polysaccharide chains, the glycosaminoglycans (GAGs), covalently attached to a core protein. These GAG chains contain sulphate groups at various positions, giving rise to specific domains, which allows them to interact with extracellular matrix molecules, including various growth factors. In this study, we have used a transwell coculture system to analyse the interaction between human fibroblasts stromal cells and human colonic carcinoma cell line (Caco-2) and investigate the effects of this interaction on cell proliferation and glycosaminoglycans synthesis. Soluble components exchanged between the cell lines in Transwell system caused a marked increase of Caco-2 cell proliferation, not observed on fibroblasts. An increase of GAGs biosynthesis was observed in both cell lines, whereas a prominent increase of CS was observed mainly in stromal cells, as determined by incorporation of $^{35}\text{S-Na}_2\text{SO}_4$. Confocal microscopy showed significant increase of versican production by fibroblasts cells. TGF- β was also tested exhibiting a significant increase on GAG synthesis mainly in fibroblasts cells, producing a strong CS-stimulating response. These results suggest that this growth factor may be responsible for the CS increase observed in stromal cells.

Caco-2 cells previously analyzed in this work were used to compare with a cell line with increased metastatic potential, HCT116. A normal rat intestinal epithelium cell line, IEC-6 was used as control. Labeling of cells with $^{35}\text{S-Na}_2\text{SO}_4$ and investigation of GAGs with specific enzymes showed an increased 6-O-sulfation of HS and CS. GAGs structural data were confirmed by Real Time PCR with elevation of specific heparan-6-O-sulfotransferase mRNA expression on Caco-2 and HCT116 cells, compared to IEC-6. The most extensively studied aspect of relationship between HS fine structure and growth factor signaling to date is the possible involvement of 6-O-sulfation in the activation of FGF signaling.

High levels of chondroitin-4,6-O-sulfotransferase expression was found only in HCT116 cells, whose CS structure contained GalNAc,4,6-sulfate, present on tetrasaccharides and disulfated disaccharides. The participation of the oversulfated structure on CS has been shown to promote tumoral cell motility. Whether these structural data obtained in this work correlate to the mentioned biological functions, remains to be elucidated.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)