



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

ALEXIA NATHÁLIA BRÍGIDO ASSEF

MEIO CONDICIONADO DE MACRÓFAGOS ATIVADOS POR POLISSACARÍDEOS
SULFATADOS DA ALGA PARDA *Dictyota caribaea* INIBE A PROLIFERAÇÃO DE
MELANOMA METASTÁTICO *in vitro*

FORTALEZA - CE

2017

ALEXIA NATHÁLIA BRÍGIDO ASSEF

MEIO CONDICIONADO DE MACRÓFAGOS ATIVADOS POR POLISSACARÍDEOS
SULFATADOS DA ALGA PARDA *Dictyota caribaea* INIBE A PROLIFERAÇÃO DE
MELANOMA METASTÁTICO *in vitro*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Diego Veras Wilke

FORTALEZA - CE

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A863m Assef, Alexia Nathália Brígido.
MEIO CONDICIONADO DE MACRÓFAGOS ATIVADOS POR POLISSACARÍDEOS
SULFATADOS DA ALGA PARDA *Dictyota caribaea* INIBE A PROLIFERAÇÃO DE MELANOMA
METASTÁTICO *in vitro* / Alexia Nathália Brígido Assef. – 2017.
86 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2017.

Orientação: Prof. Dr. Diego Veras Wilke.

1. *Dictyota caribaea*. 2. Polissacarídeos sulfatados. 3. Imunoestimulante. 4. ativação de macrófagos. 5. antiproliferativo. I. Título.

CDD 615.1

MEIO CONDICIONADO DE MACRÓFAGOS ATIVADOS POR POLISSACARÍDEOS
SULFATADOS DA ALGA PARDA *Dictyota caribaea* INIBE A PROLIFERAÇÃO DE
MELANOMA METASTÁTICO *in vitro*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Aprovada em: 24/07/2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Diego Veras Wilke (Orientador)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. André Luiz dos Reis Barbosa
Universidade Federal do Piauí - UFPI

*Aos meus avós, Neide e José Maria, por todo amor e
ensinamento de vida que me dão desde sempre.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter me dado forças para realizar esse trabalho.

Ao meu orientador, Dr. Diego Veras Wilke, por todo ensinamento e orientação dados durante essa jornada, pelo entusiasmo constante, mesmo quando as coisas não davam certo, me incentivando sempre a não desistir e por estar disposto a ajudar em todos os momentos que preciso.

Ao professor Leonardo Cinelli, por ter cedido parte do material necessário para a realização desse trabalho e pela disponibilidade em discutir os métodos utilizados.

Ao professor Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior, por toda disponibilidade em ajudar sempre e por mais uma vez fazer parte da minha banca.

Aos grandes amigos do LaBBMar: Katharine Gurgel, Erlânia Alves, Thaís Brito, Kayanny Ferreira e os ICs Larissa Belizário, Clara Nogueira, Danilo Maciel e Rhaynan Andrade pela forte amizade construída durante esse tempo; pelas brincadeiras, alegrias compartilhadas durante todos os dias no lab e pelo apoio torcida incessantes;

À Camila Roque, em especial, por sempre estar disposta a aprender e ajudar em todos os experimentos, pela amizade e companheirismo firmados durante esses dois anos.

À Adelânia, pela amizade e por toda ajuda nos meus momentos de desespero e quando eu mais precisava.

À Giovanna Riello, pela amizade construída tão logo nos conhecemos, pelos diversos momentos de descontração e risadas e por sempre me socorrer com os experimentos de citometria. Obrigada, queridinha!!

Ao meu companheiro de vida e de ciência, Felipe Barros, por sempre se fazer presente durante os momentos mais felizes e os mais difíceis também; pelas conversas e discussões produtivas que se prolongaram madrugadas e madrugadas e por partilhar do mesmo amor que eu pela ciência. Pelo apoio, ajuda, consolo durante os momentos de desespero e carinho incondicionais. Nossa caminhada está apenas começando.

Aos meus avós/pais, Neide e José Maria, por terem me permitido chegar até aqui com seus ensinamentos, amor e cuidado; sempre desejando o melhor para mim e me mostrando que o caminho certo é o da dedicação naquilo que faz. Sem vocês eu não seria nada!!

À minha prima querida, Saskia Natália (*in memmorian*), por ter sido essa pessoa tão iluminada que eu tive a honra de conviver. Obrigada pelas risadas e conversas, sempre

orgulhosa do caminho que eu escolhi trilhar na ciência e confiante que meu trabalho é para um bem maior. Este trabalho é em sua homenagem, prima. Saudades!

Aos meus pais, Elianne e Eirton, pelo amor, imenso carinho e por acreditarem sempre no meu potencial, torcendo pelo meu sucesso.

Aos demais familiares e amigos que me apoiaram e torceram pelas minhas conquistas em todas as etapas da minha vida, principalmente na acadêmica.

À FUNCAP pelo apoio financeiro.

MEIO CONDICIONADO DE MACRÓFAGOS ATIVADOS POR POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DA ALGA PARDA *Dictyota caribaea* INIBE A PROLIFERAÇÃO DE MELANOMA METASTÁTICO *in vitro*. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará. 2017. Aluna: Alexia Nathália Brígido Assef. Orientador: Prof. Dr. Diego Veras Wilke.

RESUMO

O câncer se refere a um conjunto de doenças relacionadas à proliferação descontrolada e invasão células neoplásicas para tecidos distantes. O câncer faz parte de um sistema complexo, constituído por diversas células não tumorais que contribuem, junto com as células tumorais, para a formação do microambiente tumoral (MIT). Por sua vez, o MIT favorece o crescimento e desenvolvimento do tumor e aumento da agressividade da doença. Dentre as células não-tumorais presentes no MIT, os macrófagos (MΦ) possuem papel destacado. Os MΦ possuem alta plasticidade fenotípica, podendo exibir ação anti-tumoral quando ativados classicamente (fenótipo M1) ou pró-tumoral, quando sofrem ativação alternativa (fenótipo M2). Os MΦ associados ao tumor (TAM) apresentam fenótipo M2 peculiar e a sua presença está frequentemente relacionada a um pior prognóstico para o paciente. A modulação de MΦ M0 (não estimulados) para M1 ou reeducação de TAM para M1 são estratégias que visam auxiliar no tratamento de tumores malignos. Polissacarídeos sulfatados (PS) de algas podem atuar como modificadores da resposta biológica regulando a ativação de MΦ e potencializar a resposta destes últimos contra células tumorais. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antitumoral *in vitro* de macrófagos ativados por PS extraídos da alga parda *Dictyota caribaea* (DCA). DCA e o meio condicionado de macrófagos estimulados (MC) pela DCA foram avaliadas inicialmente quanto sua citotoxicidade em melanoma metastático (linhagem murina B16-F10) *in vitro* pelo ensaio do SRB. Para avaliação do efeito imunoestimulante de macrófagos (linhagem murina RAW264.7) ativados pela DCA foi realizado ensaio de Griess. Embora nenhum PS, incluindo extrato bruto e frações, tenha sido citotóxico, todos ativaram MΦ. Os MC com DCA (MC DCA) 100 e 250 µg/mL foram capazes de inibir aproximadamente 25% do crescimento tumoral *in vitro*. A fração DCA F9 foi escolhida para estudos adicionais com MC DCA F9 devido ao seu alto rendimento (~40%) e destacado efeito antiproliferativo em relação as demais. Além de aumentar a produção de óxido nítrico, o tratamento de macrófagos com DCA F9 também provocou aumento da liberação das citocinas TNF-α e IL-10 medidas por ELISA. O tratamento de melanoma com MC DCA F9 nas concentrações de 100 e 250 µg/mL causou redução da contagem de células e alterações na morfologia, mas a membrana plasmática permaneceu íntegra. Em relação à morfologia, observou-se aumento das populações de células com tamanho reduzido (~10%) e com granulosidade aumentada (~15%). Além disso, MC DCA F9 alterou o perfil do ciclo celular da B16-F10. Observou-se diminuição de células em G2/M. Uma vez que o nitrito não inibiu o crescimento da B16-F10, os efeitos antiproliferativos observados se devem a outras substâncias citotóxicas produzidas pela RAW264.7, como p.ex. TNF-α. Quando associados com o quimioterápico doxorrubicina (DOX), DCA F9, mas não MC DCA F9, foi capaz de potencializar a inibição tumoral da DOX *in vitro*. Desta forma, concluímos que os PS de *D. caribaea* ativaram MΦ para perfil antitumoral. Mais estudos são necessários para complementar a caracterização fenotípica de MΦ, bem como do efeito antitumoral e respectivas vias relacionadas a estes efeitos.

Palavras-chave: *Dictyota caribaea*, Polissacarídeos sulfatados, Imunoestimulante, ativação de macrófagos, anti-câncer, antiproliferativo.

CONDITIONED MEDIUM OF MACROPHAGES ACTIVATED BY SULFATED POLYSACCHARIDES FROM BROWN ALGAE *Dictyota caribaea* INHIBITS PROLIFERATION OF METASTASTIC MELANOMA *in vitro*

Master's Thesis of the Pharmacology Postgraduate Program of UFC

ABSTRACT

Cancer refers to a set of diseases related to uncontrolled proliferation and invasion of neoplastic cells into distant tissues. The tumoral tissue is complex and consists of several non-tumor cells that contribute, together with the tumor cells, to the formation of the tumor microenvironment (MIT). MIT favors the growth and development of the tumor and increase the aggressiveness of the disease. Among the non-tumor cells present in MIT, macrophages (M Φ) have prominent role. M Φ have high phenotypic plasticity, and may show anti-tumor action when activated classically (M1 phenotype) or pro-tumor, when tumor-associated M Φ undergo alternative activation (M2-like phenotype). TAMs are often related to a worse prognosis for the patient. Modulation from M0 M Φ (unstimulated) to M1 or re-education from TAM to M1 are strategies aimed at assisting in the treatment of malignant tumors. Sulfated polysaccharides (SP) from algae can act as modifiers of the biological response by regulating the activation of M Φ and potentiate the immune response against tumor cells. The objective of this work was to evaluate the immunostimulatory and antitumor potential of sulfated polysaccharides extracted from brown algae *Dictyota caribaea* (DCA) *in vitro*. Samples of DCA and conditioned medium of macrophage stimulated with DCA (CM) were initially evaluated for cytotoxicity in murine metastatic melanoma (B16-F10 cell line) by the SRB assay and activation of murine macrophages (RAW264.7 cell line) by the Griess assay. Although samples, including crude extract and fractions, were not cytotoxic, all of them activated the M Φ . Additionally, the supernatants of macrophages treated with DCA (CM DCA) were able to inhibit B16-F10 cells growth approximately 25%. The DCA F9 fraction was chosen for additional studies using CM DCA F9 due to their high yield (~40%) and better antiproliferative effect among the other fractions. In addition to increasing nitric oxide production, treatment of macrophages with DCA F9 also increased the release of TNF- α and IL-10 cytokines as measured by ELISA. Treatment of melanoma with CM DCA F9 caused a reduction on cell counting and induced morphological changes without compromising membrane integrity. In relation to the morphology, it was observed an increasing of the population percentage of shrink cells (~10%) and granularity cells (~15%). CM DCA F9 treatment also changed B16-F10 cell cycle profile. It decreased the G2/M phase. Since nitrite did not inhibit the growth of B16 F10, the antiproliferative effects observed are due to other cytotoxic substances produced by RAW264.7, e.g. TNF- α . When associated with the chemotherapeutic doxorubicin (DOX), DCA F9 but not CM DCA F9, potentiated tumor cell inhibition *in vitro*. In conclusion PS of *D. caribaea* activated M Φ for anti-tumor phenotype. Further studies are needed to improve phenotypic characterization of M Φ , as well as the antitumor effect and respective pathways related to these effects.

Keywords: *Dictyota caribaea*, Sulfated polysaccharides, immunostimulant

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição proporcional dos 10 tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo no Brail, exceto pele não-melanoma.....	15
Figura 2. Características adquiridas por células neoplásicas, necessárias ao desenvolvimento de tumores malignos.	17
Figura 3. Polarização de macrófagos para M1 e M2.....	23
Figura 4. Número de publicações sobre polissacarídeos sulfatados com atividade antitumoral desde a década de 1970 até 2017.....	30
Figura 5. Número de publicações sobre macrófagos associados ao tumor como alvos na terapêutica antitumoral desde a década de 1980 até 2017.	31
Figura 6. Planejamento experimental do presente trabalho.	33
Figura 7. Praia Vermelha, Paraty - Rio de Janeiro.....	34
Figura 8. Imagem da alga Dictyota caribaea.	35
Figura 9. Fluxograma da extração dos polissacarídeos sulfatados da Dictyota caribaea	36
Figura 10. Reação de Griess	38
Figura 11. Estrutura da Sulforrodamina B	39

Figura 12. Estratégia de seleção das populações utilizadas para A) contagem de células, análise de alterações morfológicas, integridade de membrana e B) ciclo celular nos experimentos de citometria	44
Figura 13. Detecção da produção de nitrito no MC de macrófagos murinos (RAW264.7) estimulados in vitro com salina (C-), 100 ng/mL de LPS ou 10, 100 e 250 µg/mL dos PS da <i>Dictyota caribaea</i> após 24h de incubação.	47
Figura 14. Efeito antiproliferativo em células de melanoma B16-F10 após 48h de tratamento com meio condicionado de macrófagos murinos (RAW264.7) estimulados in vitro com salina (C-), 100 ng/mL de LPS ou 10, 100 e 250 µg/mL dos PS da <i>Dictyota caribaea</i>..	48
Figura 15. Produção de citocinas por macrófagos murinos (RAW264.7) estimulados in vitro com salina (C-), 100 ng/mL de LPS ou 100 e 250 µg/mL da fração polissacarídica sulfatada de <i>Dictyota caribaea</i> (DCA F9) após 24h de tratamento	50
Figura 16. Contagem de células de melanoma metastático murino B16-F10 tratadas por 48h com meio condicionado de macrófagos murinos estimulados com salina (C-), 100 ng/mL de LPS ou 10, 100 e 250 µg/mL de DCA F9.....	51
Figura 17. Integridade de membrana das células de melanoma metastático murino B16-F10 tratadas por 48h com meio condicionado de macrófagos murinos estimulados com salina (C-), 100 ng/mL de LPS ou 10, 100 e 250 µg/mL de DCA F9.	51
Figura 18. Percentual de células de melanoma metastático murino B16-F10 com morfologia normal ou alterada, tratadas por 48h com meio condicionado de macrófagos murinos estimulados com salina (C-), 100 ng/mL de LPS ou 10, 100 e 250 µg/mL de DCA F9.	52

Figura 19. Alterações no ciclo celular de células de melanoma metastático murino B16-F10 tratados por 48h com meio condicionado de macrófagos murinos estimulados com salina (C-), 100 ng/mL de LPS ou 10, 100 e 250 µg/mL de DCA F9. 55

Figura 20. Efeito antiproliferativo em melanoma metastático murino B16-F10 da associação do quimioterápico doxorrubicina 0,2 µM 0,4 µM com DCA F9 (A e C) e com meio condicionado de macrófagos murinos estimulados in vitro com DCA F9 (B e D). 56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito da fucoidana no crescimento tumoral em camundongos portadores de tumores.....	27
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
B16-F10	Linhagem Melanoma Murino
DCA	Polissacarídeo sulfatado da <i>Dictyota caribaea</i>
DCA F9	Fração polissacarídica sulfatada da <i>Dictyota caribaea</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DOX	doxorubicina
EB DCA	Extrato Bruto da <i>Dictyota caribaea</i>
FSC	Desvio frontal, do inglês <i>Forward scatter</i>
INCA	Instituto Nacional de Câncer
LPS	Lipopolissacarídeo de <i>Escherichia coli</i>
M1	Macrófagos ativados pela via clássica
M2	Macrófagos ativados pela via alternativa
NO	Óxido Nítrico, do inglês Nitric Oxide
PBS	Solução tampão salina, do inglês <i>Phosphate Buffer Solution</i>
PI	Iodeto de propídeo, do inglês <i>Propidium Iodide</i>
PS	Polissacarídeo sulfatado
RAW 264.7	Linhagem macrófagos murinos
MC	Meio condicionado de Macrófagos estimulados
SRB	Sulforrodamina B
SSC	Desvio lateral, do inglês <i>Side Scatter</i>
FSC	Desvio frontal, do inglês <i>Foward Scatter</i>
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
TNF- α	Fator de necrose tumoral
NK	Células assassinas naturais
INF- γ	Interferon γ
TAM	Macrófagos associados ao tumor, do inglês <i>Tumor associated macrophages</i>
TGF- β	Fator de transformação o crescimento
M Φ	Macrófagos

VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
TEM	Transição epitélio-mesênquima
TH1	Linfócito T auxiliar tipo 1
TH2	Linfócito T auxiliar tipo 2

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Câncer	15
1.1.1 O Microambiente Tumoral e os Macrófagos Associados ao Tumor.....	19
1.2 Produtos Naturais Marinhos.....	24
1.2 Algas marinhas.....	24
1.3.2 Polissacarídeos Sulfatados	25
1.4 Justificativa	29
2 OBJETIVOS	32
2.1 Objetivo Geral.....	32
2.2 Objetivos Específicos	32
3 MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1 Planejamento Experimental	33
3.2 Coleta e processamento da alga	34
3.3 Avaliação do efeito imunoestimulante e antiproliferativo.....	37
3.3.1 Linhagens celulares	37
3.3.2. Avaliação do efeito imunoestimulante através da ativação de macrófagos	37
3.3.2.1 Procedimentos	38
3.3.3 Avaliação do efeito antiproliferativo dos PS da alga <i>Dictyota caribaea</i>	39
3.3.3.1 Procedimentos.....	39
3.3.4 Análise Estatística	40
3.4 Avaliação dos mecanismos do efeito antiproliferativo de macrófagos	41
3.4.1 ELISA.....	41
3.4.1.1 Procedimentos.....	41
3.4.1.2 Análise Estatística	42
3.4.2 Avaliação do efeito antiproliferativo de MC de macrófagos ativados com DCA F9	42
3.4.2.1 Procedimentos.....	42
3.4.3 Avaliação dos efeitos do meio condicionado por DCA F9 em células de melanoma B16-F10 por meio de citometria de fluxo	42
3.4.3.1 Procedimentos.....	43
3.4.3.2 Análise Estatística	45

3.4.4 Avaliação do efeito antiproliferativo da associação de quimioterápico com diferentes DCA e meio condicionado com DCA.....	46
3.4.4.1 Procedimentos	46
4 RESULTADOS	46
4.1 Avaliação do efeito imunoestimulante.....	46
4.2 Avaliação do efeito antiproliferativo dos polissacarídeos sulfatados da <i>Dictyota caribaea</i> e do meio condicionado de macrófagos ativados	47
4.3 Avaliação dos mecanismos do efeito antiproliferativo de macrófagos	49
4.3.1 Avaliação da produção de citocinas por macrófagos murinos RAW 264.7	49
4.3.2 Avaliação dos efeitos do meio condicionado de macrófagos ativados por DCA F9 em células de melanoma B16-F10.....	50
4.3.2.1 Contagem de Células e Integridade de Membrana celular	50
4.3.2.2 Alterações na morfologia celular	52
4.3.2.3 Avaliação do Ciclo Celular	54
5 DISCUSSÃO	57
6 CONCLUSÕES.....	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67


1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

O câncer foi responsável por 8,8 milhões de óbitos em 2015. Embora as maiores taxas de incidência de câncer sejam encontradas em países desenvolvidos, dos dez milhões de casos novos anuais de câncer, cinco milhões e meio são diagnosticados nos países em desenvolvimento (WHO, 2016). No Brasil, a estimativa é de mais de 600 mil novos casos de câncer no biênio 2016-2017 (Ministério da Saúde; INCA, 2016).

Em 2035, a incidência global será maior que 24 milhões de novos casos de câncer e aproximadamente 14,6 milhões de mortes por câncer, devido ao envelhecimento da população, a redução da taxa de mortalidade infantil e de mortes por doenças infecciosas em países em desenvolvimento (International Agency for Research on Cancer – IARC, 2016). Além disso, estima-se uma maior incidência de câncer de próstata, pulmão, cólon e reto, estômago e cavidade oral em homens e de mama, cólon e reto, colo do útero, pulmão e glândula tireóide em mulheres (Figura 1), reforçando a magnitude do problema do câncer no país (INCA, 2016).

Figura 1. Distribuição proporcional dos 10 tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo no Brasil, exceto pele não-melanoma.

Localização primária	casos novos	%			Localização primária	casos novos	%	
Próstata	61.200	28,6%		Homens	Mama Feminina	57.960	28,1%	
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%			Mulheres	Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%				Colo do Útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%				Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%				Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%				Corpo do Útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%				Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%				Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%				Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%				Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

Fonte: Instituto Nacional de Câncer, 2016.

O câncer é na realidade o nome dado a um grupo de doenças caracterizado por um crescimento e propagação descontrolados das células (American Cancer Society, 2016). As habilidades de invadir outros tecidos e formar metástases são características que distinguem o câncer de tumores benignos. Após a transformação de células normais em células malignas, por mutações genéticas, as células cancerosas podem proliferar rapidamente, invadir tecidos adjacentes e migram através da corrente sanguínea ou dos vasos linfáticos, estabelecendo tumores secundários em órgãos distantes do tumor primário (FIDLER,2003).

Além disso, as células cancerígenas são uma manifestação de 10 alterações essenciais na fisiologia da célula que resultam em defeitos nos circuitos regulatórios que são responsáveis pela proliferação celular normal e homeostase (Figura 2): auto-suficiência em fatores de crescimento; insensibilidade a fatores antiproliferativos; evasão da morte celular programada (apoptose); potencial replicativo ilimitado; formação de novos vasos (neo-angiogênese); invasão tecidual e metástase, desregulação energética, evasão da destruição pelo sistema imune, inflamação e instabilidade genômica.. Todas essas alterações conferem capacidade às células cancerígenas para burlar o sistema imune e conseguir se estabelecer nos diversos órgãos e tecidos do corpo. Em adição, as células tumorais, há uma outra dimensão de complexidade: os tumores contêm um repertório de células recrutadas, aparentemente normais que contribuem para a aquisição de traços característicos, criando o microambiente tumoral. (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

Figura 2. Características adquiridas por células neoplásicas, necessárias ao desenvolvimento de tumores malignos.



Adaptado de Hanahan e Weinberg (2011).

Dentre os diferentes tipos de câncer, destacam-se os de pele, devido, principalmente, a sua alta incidência na população; no Brasil, o câncer de pele representa 30% de todos os cânceres. O melanoma cutâneo é um tipo de câncer de pele que tem origem nos melanócitos (células responsáveis pela produção de melanina, substância que determina a cor da pele) e tem predominância em indivíduos adultos brancos. Embora o câncer de pele seja o mais frequente no Brasil, o melanoma representa apenas 3% das neoplasias malignas do órgão, contudo é considerado um dos mais agressivos devido à sua alta probabilidade de formação de metástases (INCA, 2016).

Estudos indicam que há uma incidência crescente de melanoma em todo mundo (ROMANO et al., 2011). A Sociedade Americana de Câncer estima cerca de 92.800 mil novos diagnósticos de melanomas na população norte-americana em 2016, em torno de 50.169 mil em homens e 34.105 mil em mulheres. Além disso, estima que 9.730 mil pessoas morram pela doença neste mesmo ano (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017). Segundo as estimativas do Globocan 2012 em todo o mundo aproximadamente 232.000 novos casos de melanoma seriam diagnosticados. Ainda

segundo esta estimativa a incidência e prevalência mundial de melanoma não diferem entre os gêneros, mas é maior nos países desenvolvidos.

Embora a incidência de melanoma na população brasileira seja baixa, este tipo de câncer é considerado o tumor cutâneo de maior importância, pois quando diagnosticado de forma tardia pode chegar a 80% de todas as mortes causadas por câncer de pele (GRUPO BRASILEIRO DE MELANOMA, 2017). As estimativas para o biênio 2016/2017 são 3.000 novos casos de melanoma em homens e 2.670 em mulheres. A cidade de Porto Alegre possui a maior estimativa de incidência de melanoma do país, sendo 9.41 a cada 100.000 homens e 7.45 a cada 100.00 mulheres. Essa baixa incidência quando comparada ao panorama mundial, muito provavelmente, é em virtude da subnotificação (INCA, 2016)

O principal tratamento do melanoma nas fases iniciais é cirúrgico e o prognóstico é favorável, enquanto que para estágios avançados, a literatura demonstra benefícios na sobrevida global em pacientes submetidos a ressecção completa, embora muitos pacientes não são elegíveis a cirurgia, quer pelo estado geral e/ou por comorbidades associadas (HOUGHTON & POLSKY, 2002; BELFORT & WAINSTEIN, 2010). Juntamente com o avanço de inibidores de alterações específicas relacionadas à carcinogênese do melanoma, houve grande avanço na imunoterapia para este tipo de câncer. Ipilimumabe é um anticorpo monoclonal de imunoglobulina humana (IgG1) que bloqueia totalmente CTLA-4 (linfócito citotóxico associado a antígeno-4) e promove imunidade antitumoral (HODI et al., 2010). Foi o primeiro agente a demonstrar uma melhoria na sobrevida global em um estudo randomizado de fase III em pacientes com melanoma avançado (SINGH & SALAMA, 2016). O PD-1 (proteína de morte celular programada 1) está envolvido na regulação imune, mediada pela ligação de PD-1 e os seus ligantes PD-L1/PD-L2. O desenvolvimento de anticorpos PD-1 já mostrou benefício clínico em pacientes com melanoma, bem como uma ampla variedade de tipos de tumores (TOPALIAN et al., 2012).

A estratégia de tratamento do câncer que promove a estimulação do sistema imunológico do indivíduo por meio do uso de substâncias modificadoras da resposta biológica é denominada imunoterapia. De acordo com as substâncias utilizadas e os seus mecanismos de ação, a imunoterapia pode ser classificada em: ativa e passiva. A imunoterapia ativa pode ser subdividida em dois tipos: I) inespecífica, quando são utilizadas substâncias estimulantes e restauradoras da função imunológica como as citocinas IL-2 e interferon alfa (IFN-alfa). II) específica, quando vacinas contendo células tumorais são

administradas com a finalidade de intensificar a resistência ao crescimento tumoral. Até agora, nos Estados Unidos, Sipuleucel-T (Provenge®) é a única vacina relacionada à imunoterapia aprovada. Seu uso é indicado para tratar câncer de próstata avançado que já não esteja respondendo à terapia hormonal. A imunoterapia passiva, por sua vez, utiliza anticorpos antitumorais (anticorpos monoclonais, como Alemtuzumab - Campath® e inibidores de pontos de checagem como, Pembrolizumab e Atezolizumab) ou células mononucleares exógenas com o objetivo de proporcionar capacidade imunológica de combate à doença (INCA, 2015; American Cancer Society 2016).

Assim, os tratamentos direcionados e novos avanços na imunoterapia vêm se mostrando eficientes em melhorar a sobrevida e são agora uma parte do atendimento clínico de rotina dos pacientes com melanoma em diversos países e devem ser incorporados ao arsenal terapêutico brasileiro muito em breve (SINGH & SALAMA, 2016). A relação entre competência imunológica e evolução do câncer, no que diz respeito a redução da atividade das células supressoras, tem sido demonstrada em pacientes com câncer de ovário, neuroblastoma e carcinoma hepatocelular. Nesse contexto, os monócitos e os macrófagos, células do sistema imune, facilitam a atividade dos linfócitos T e de moléculas modificadores da resposta biológica, como as interleucinas, podendo ser classificados como fatores auxiliares, supressores, reguladores do crescimento e citotóxicos (SCHMERLING & BUZAID, 2013)

1.1.1 O Microambiente Tumoral e os Macrófagos Associados ao Tumor

O microambiente tumoral, é composto por células neoplásicas e normais, além de uma variedade de citocinas que desempenham um papel importante na malignidade. As populações não malignas incluem: células do estroma, vasos sanguíneos em expansão e um infiltrado leucocitário (QUATROMONI & ERUSLANOV, 2012). As células tumorais e do microambiente tumoral co-evoluem dinamicamente através das interações celulares diretas e indiretas, provocando efeitos em muitos programas biológicos, como na imunidade inata e adaptativa, na proliferação celular, crescimento e metabolismo, bem como angiogênese e hipóxia (KENNY et al. 2007; KERKAR & RESTIFO, 2012; CASEY et al. 2014). Com relação as demais células do microambiente tumoral, estudos vêm demonstrando uma importância crescente da atuação de células do sistema imune e seus produtos no tecido neoplásico. Dentre as células da imunidade inata

e adaptativa recrutadas para o sítio tumoral, macrófagos associados ao tumor (TAMs) são abundantes e estão presentes em todos os estágios da progressão do tumor (ONUCHIC & CHAMMAS, 2010; MANTOVANI & ALLAVENA, 2012; GAJEWSKI et al. 2013; QUAIL & JOYCE, 2013; CHEN et al, 2017)

Macrófagos são células com alta plasticidade e que podem realizar diferentes funções, tem um papel principal na inflamação, resposta imune e manutenção da homeostase do tecido (MOSSER & EDWARDS, 2008; LUCAS et al. 2010; NOVAK & KOH, 2013). Dependendo de diferentes condições ou estímulos no microambiente há uma notável polarização para dois fenótipos distintos (Figura 3): M1 "ativado classicamente" e M2 "ativado alternativamente". Os macrófagos polarizados tipo M1 promovem a resposta imune do tipo I contra infecções bacterianas, protozoárias e virais e também contra células tumorais. Em contraste, os macrófagos polarizados tipo M2 apresentam função antiinflamatória e regulam a remodelação tecidual, angiogênese e cicatrização de feridas (TARIQ, M. et al., 2017).

Vários estudos têm revelado que TAMs em microambientes tumorais são, na realidade, macrófagos polarizados tipo M2 e desenvolvem um papel importante na conexão entre o câncer e a inflamação. Os TAMs podem promover a proliferação, invasão e metástase de células tumorais, estimular a angiogênese e inibir a resposta antitumoral mediada por células T, acarretando numa progressão do tumor (TARIQ, M. et al., 2017; VAN OVERMEIRE et al, 2014). As funções pró-inflamatória e anti-inflamatória respectivamente de macrófagos M1 e M2 têm sido intensamente estudadas, porém os determinantes da sua diferenciação não são totalmente compreendidos (MILLS, 2012; NOVAK & KOH, 2013; SOCKOLOSKY et al, 2016; YANG & ZANG, 2017). Macrófagos polarizados integralmente para os fenótipos M1 e M2 são os extremos de estados funcionais, eles se diferenciam entre si quanto a expressão de receptores, funções efetoras e produção de citocinas e quimiocinas (MILLS et al. 2000).

A manipulação do microambiente tumoral pode ser vista como alvo de novas terapias para o tratamento do câncer. A modulação ou inibição de alvos pode incluir a síntese e o metabolismo de colesterol, espécies reativas de oxigênio (ROS) e hipóxia, fibrose, angiogênese, inflamação, mecanismos inatos envolvidos na ativação da imunidade adaptativa como a ativação de macrófagos associados ao tumor (TAMs) e indução da maturação de células dendríticas, entre outros (PALUCKA & BANCHEREAU 2013; CASEY et al. 2015)

Macrófagos M1 são estimulados por citocinas TH1 como IFN- γ ou lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), por outro lado macrófagos M2 são ativados por citocinas TH2, como IL-4 ou IL-13 (MANTOVANI et al. 2002; GORDON, 2006; GORDON & TAYLOR, 2005; MOSSER & EDWARDS, 2008). Além disso, macrófagos polarizados para M1 promovem inflamação por produzirem grande quantidade de óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias como interleucina-12 (IL-12), interleucina-23 (IL-23), interleucina-1 β (IL-1 β) e TNF- α e baixa expressão de IL-10 e TGF- β ; Ainda produzem altos níveis de espécies reativas de oxigênio e intermediários do nitrogênio (MANTOVANI et al. 2005; MARTINEZ et al. 2006; DALE et al. 2008). Os macrófagos polarizados para M2 produzem citocinas anti-inflamatórias como IL-10, TGF- β , podendo também expressar arginase I e metaloproteases (MANTOVANI et al. 2007; HUNTER et al. 2010). Eles também demonstram níveis aumentados de fibronectina, relacionada com a migração e adesão celular, coagulação sanguínea e metástase (MARTINEZ et al. 2006; BISWAS & MANTOVANI 2010)

As metaloproteases (MMP) auxiliam na progressão tumoral através da angiogênese. MMPs degradam proteínas responsáveis pela turgidez da matriz extracelular de vasos endoteliais existentes. Esta proteólise permite que as células endoteliais se infiltrem no estroma do tumor e combinadas com fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF) formem novos capilares. Uma vez que os TAMs facilitam a expressão de MMPs, especialmente MMP-1, MMP-7 e MMP-9, seu papel fundamental no desenvolvimento de angiogênese e crescimento tumoral torna-se extremamente aparente (SINGH et al, 2017).

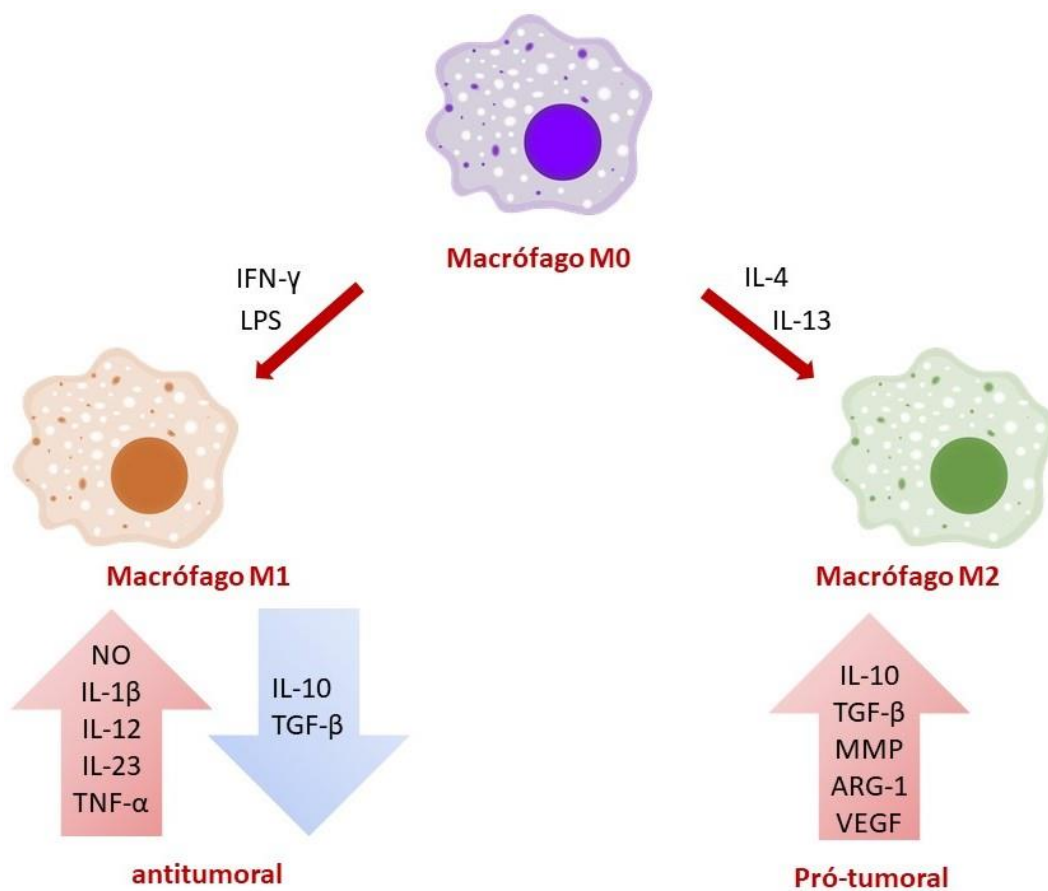
Outro fator importante para a progressão do tumor é a transição epitélio-mesênquima (TEM) que é um importante resultado da interação entre as células tumorais e os TAMs. A TEM é um processo biológico que permite a uma célula epitelial sofrer modificações bioquímicas, moleculares e morfológicas, resultando na aquisição de um fenótipo de célula mesenquimal, que apresenta maior capacidade de migração, invasão, resistência a apoptose (KALLURI e WEINBERG 2009). A TEM requer mudanças complexas na arquitetura tecidual e no comportamento celular (SCHOCK e PERRIMON 2002; ACKLAND et al. 2003; RADISKY 2005). Durante a embriogênese, a TEM é um processo de grande importância. Nesse caso, o epitélio é bastante plástico e é capaz de se modificar de epitélio para mesênquima, e vice-versa (processo reverso à TEM, denominado mesenquimal epithelial transition, ou MET) (THIERY 2002). Várias

evidências já sugerem que os TAMs e os fatores derivados destes desempenham papel imprescindível na regulação e progressão da TEM em cânceres (DENG et al, 2016).

O fator de crescimento transformante β (TGF- β) pode provocar uma infinidade de respostas celulares altamente dependentes do contexto, ainda que sejam contraditórias. No câncer, o TGF- β pode atuar como um supressor ou promotor da tumorigênese através, por exemplo, da indução da TEM, em que células epiteliais adquirem fenótipo mesenquimal, levando a maior mobilidade e invasão. Estudos recentes têm destacado os papéis fundamentais da TEM induzida por TGF- β em múltiplos aspectos da progressão tumoral (STRZYZ, 2017).

Enquanto os TAMs desempenham importante papel na progressão tumoral, o nível destes macrófagos infiltrados no microambiente tumoral pode ser utilizado como fator de prognóstico de câncer. Mais de 80% dos estudos imunohistoquímicos usando diversos tecidos tumorais humanos têm mostrado que altos níveis de TAMs no microambiente tumoral está relacionado a um pior prognóstico do paciente (YANG, L.et al, 2015; SHIGEOKA et al, 2013; KIM et al, 2015)

Figura 3. Polarização de macrófagos para M1 e M2.



Fonte: Arquivo pessoal da autora. Legenda: INF- γ – Interferon γ ; LPS – Lipopolissacarídeo de *E. coli*; IL- Interleucina; TNF- α – Fator de necrose tumoral α ; NO – óxido nítrico; MMP – metaloproteases; ARG-1 – Arginase 1; VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular; TGF- β – Fator de transformação do crescimento β ; M0 – Macrófago não estimulado

Intervenções terapêuticas com estímulos externos, são investigadas para a polarização diferencial de TAMs, na tentativa de modulação de macrófagos para que eles possam agir eliminando diretamente células tumorais, removendo o suporte vital como a inibição da angiogênese e na ativação do sistema imune (QIAN & POLLARD 2010; COUSSENS et al. 2013; PYONTECK et al. 2013; SU et al. 2014.).

1. 2 Produtos Naturais Marinhos

Os produtos naturais representam a fonte mais importante de diversidade química para a descoberta de novos produtos candidatos à fármacos para a terapêutica de diversas doenças (KINGSTON, 2011; NEWMAN, CRAGG, 2012; CRAGG, NEWMAN, 2013). De todas as fontes naturais de fármacos, o ambiente marinho é certamente a última grande fronteira. Até a década de 50 do século XX, a complexidade do acesso ao ambiente marinho dificultava ou impedia que determinadas espécies fossem pesquisadas, mas a partir das décadas de 70 e 80 com acesso a novas tecnologias de mergulho, muitas algas e invertebrados foram descobertos e passaram a fazer parte das bancadas de laboratório dos cientistas de todo o mundo (COSTA-LOTUFO et al., 2009).

O ambiente marinho cobre 70% da superfície da terra e 95% da sua biosfera tropical representa 34 dos 36 filos existentes e fornece uma variedade fascinante de biodiversidade, sendo superior a do ambiente terrestre (KONIG et al., 1994). Com um litoral contínuo que ultrapassa 8.500 km de extensão, o Brasil é um dos países com maior potencial para a descoberta de novas substâncias bioativas. Entretanto as pesquisas em bioprospecção e biotecnologia marinha ainda são incipientes em nosso país quando comparadas a outros países como, por exemplo, a Espanha, Estados Unidos e Japão, que contém companhias dedicadas à pesquisa de fármacos de origem marinha como PharmaMar, Nereus Pharmaceuticals, Seattle Genetics e Eisai, respectivamente (BERLINCK et al., 2004; COSTA-LOTUFO; WILKE; JIMENEZ, 2009; JOLY et al., 2011; MARTINS et al., 2014). Atualmente, mais de 100 novos produtos estão em desenvolvimento clínico, particularmente como agente anticâncer e anti-infecciosos. 13 novos fármacos que têm sua origem ou derivam de produtos naturais foram aprovados entre os anos de 2005 e 2007, cinco deles representam novas classes de fármacos , incluindo os produtos marinhos Dolastatina (Adcetris®), trabectedina (Yondelis®) e ziconotídeo (Prialt®) (HARVEY, 2008; NEWMAN & CRAGG, 2016).

1.2 Algas marinhas

As algas marinhas representam a base da cadeia alimentar nos oceanos e são responsáveis por uma boa parte da atividade fotossintética global. Sua distribuição depende da temperatura e salinidade da água, da disponibilidade de luz solar, das

correntes oceânicas e das condições físicas e químicas afins (EL GAMAL, 2010). Em muitos países, as algas são bastante utilizadas na indústria alimentícia e servem como fonte de fibras, minerais, vitaminas e diferentes antioxidantes.

1.3.1 Dictyotaceae

A família Dictyotaceae, uma das três famílias da Ordem Dictyotales, (BITTNER 2008) é composta por aproximadamente 18 gêneros (WYSOR; DE CLERCK, 2003) e subdividida em dois grupos, Dictyoteae e Zonarieae, com base em análises moleculares (CLERCK et al, 2006). Devido à dificuldade de estabelecer limites de separação entre espécies, tem havido um aumento significativo nos últimos anos de novos epítetos específicos de macroalgas marinhas bentônicas ao redor do mundo (WYNNE, 2011). Esse problema é verificado, particularmente, na tribo Dictyoteae devido ao alto grau de pleomorfismo das espécies e pela interpretação diferenciada dos caracteres diagnósticos, o que tem levado a confusões taxonômicas em casos reportados como coespecificidade (TEIXEIRA; KELECOM 1987, 1988; BULA-MEYER, 1994; SOLÉ; FOLDATS 2003; WYSOR; DE CLERCK 2003). De modo geral, a taxonomia das algas pardas possui ainda alguns pontos controversos. O gênero Dictyota, que pertence ao grupo Dictyoteae, por exemplo, apresenta dificuldades no correto estabelecimento dos limites de separação entre várias de suas espécies, sendo utilizado, muitas vezes, metabólitos secundários denominados diterpenos como importantes marcadores taxonômicos e biogeográficos. (TEIXEIRA; ALMEIDA; KELECOM, 1990).

1.3.2 Polissacarídeos Sulfatados

Polissacarídeos sulfatados são polímeros complexos e heterogêneos formados de unidades repetitivas de açúcares carregados negativamente devido, principalmente, à presença de radicais sulfatados. A biossíntese desses compostos está amplamente distribuída no reino animal, vegetal e no reino protista, no qual se incluem as algas marinhas (PERCIVAL & McDOWELL, 1967; MATHEWS, 1975; AQUINO et al., 2005). Podem ocorrer nos invertebrados marinhos como polissacarídeos simples, de estrutura linear, formada por unidades oligossacarídicas repetitivas ou como um grupo de

compostos de estrutura similar aos glicosaminoglicanos de tecidos de mamíferos, mas com diferenças em relação a presença de ramificações e ao padrão de sulfatação (ALVES et al., 1997).

A complexidade e a heterogeneidade, assim como o rendimento dos PS varia entre diferentes espécies de algas, com o período de coleta, localização e com as condições climáticas e ambientais (PERCIVAL; McDOWELL, 1967; FRIEDLANDER; ZELIKOVITCH, 1984; FARIAS et al., 2000; VASCONCELOS, et al., 2011). Os polissacarídeos das algas vermelhas são as galactanas, comercialmente conhecidas como ágar e carragenana; das algas pardas são as fucoïdanas; das algas verdes são heteropolissacarídeos que contém galactose, xilose, arabinose, manose, ácido glicurônico ou glucose, predominando as arabino-galactanas (GUPTA, 2011; JIAO, 2011).

Diversos grupos já investigaram compostos dessa classe, tanto na elucidação da sua estrutura química, quanto na sua atividade biológica (PEREIRA et al., 2005; FARIAS et al., 2000). Estão presentes como estruturas complexas, altamente heterogêneas e muitas vezes ramificadas (MULLOY et al., 1994), com diversas atividades biológicas importantes como antioxidante (SOUZA et al, 2012; BARAHONA et al, 2011; ZHANG et al, 2012), anticoagulante (MULLOY et al, 2000; CIANCIA et al, 2010), imunoestimulante, antiviral (BOUHLAL et al, 2011; WJSEKARA et al, 2011; RABANAL et al, 2014) , antialérgicas, antiinflamatórias (VO et al, 2012) e principalmente antitumoral (LINS et al, 2009; SITHRANGA BOOPATHY & KATHIRESAN, 2010; OLESYA et al, 2011; SHAO et al, 2014; ROZA et al, 2015), sendo esta última uma área de estudo de grande relevância.

As fucoïdanas são polissacarídeos formados por resíduos de fucose sulfatadas. A maior fonte de fucoïdanas são os organismos marinhos, incluindo as algas pardas (POMIN & MOURÃO, 2008). A fucoïdana possui características interessantes como baixa toxicidade, biodisponibilidade oral e múltiplos mecanismos de ação. Afetam muitos processos fisiopatológicos, incluindo inflamação, fisiologia vascular, carcinogênese e estresse oxidativo (FITTON, 2011; POMIN, 2012). Assim, os suplementos alimentares ou bebidas contendo fucoïdana foram tradicionalmente administrados a pacientes com câncer na Coreia, Japão, China e outros países. Além de efeitos antitumorais, algumas fucoïdana são citotóxicas e induzem apoptose em células cancerosas. Além disso, também podem funcionar como agente antiangiogênico (SENTHILKUMAR et al, 2013), imunoestimulante sobre células dendríticas , células assassinas naturais (NK), macrófagos e portanto podem aumentar

a imunidade anticancerígena através da ativação dessas células do sistema imune, estimulando a produção de citocinas antitumorais (KIM et al, 2008; YANG et al, 2008; JIN et al, 2009; HU et al, 2010; ALE et al, 2011; AZUMA et al, 2012). As Fucoïdanas têm demonstrado efeitos de inibição de crescimento tumoral *in vivo* por via oral, intraperitoneal ou intravenosa que estão contidos na tabela 1 (KWAK, 2014)

Tabela 1. Efeito da fucoïdana na inibição do crescimento tumoral em camundongos portadores de tumores.

Fucoïdana	Via/Dose	Tumor	Mecanismo de ação	Referências
<i>Cladosiphon okamuranus</i>	v.o. 5 g/kg	Câncer de cólon	Mediada por células NK	[AZUMA et al, 2012]
<i>Fucus vesiculosus</i> (Sigma, St. Louis, MO, USA)	i.p. 5 mg/kg	Carcinoma mamário 4T1	Inibição de angiogênese e indução de apoptose	[XUE et al, 2012; THINH et al, 2013]
<i>Fucus evanescence</i>	10 mg/kg	Carcinoma pulmonar de Lewis	Desconhecido	[Alekseyenk o et al, 2007]
From Ze Lang Nanjing Med. Tech Co.	i.p. 200 mg/kg	Carcinoma hepatocelular Bel-7402	Inibição da proliferação	[ZHU et al, 2013]
<i>Fucus vesiculosus</i> (Sigma, St. Louis, MO, USA)	intradérmica 0.25 mg/animal	Carcinoma mamário murino 4T1	Prevenção de metástases	[HSU et al, 2013]
<i>Sargassum plagiophyllum</i>	v.o. 75 mg/kg	Carcinoma hepatocelular induzido por DEN	Inibição do metabolismo carcinogênico	[Suresh et al, 2013]

Fucoidana	Via/Dose	Tumor	Mecanismo de ação	Referências
<i>Cladosiphon okamuranus</i> Tokida	v.o. 100 mg/kg	Sarcoma 180	Retardar Óxido nítrico produzido por MΦ	[Takeda et al, 2012]
<i>Undaria pinnatifida</i>	Dieta contendo 1% Mekabu (34 mg/dia)	A20 leukemia cells	Atividade citotóxica pela ativação de células NK	[Maruyama et al, 2006]
<i>Fucus vesiculosus</i> (Sigma, St. Louis, MO, USA)	i.v. 5 mg/kg	Carcinoma pulmonar de Lewis; melanoma B16	Efeito Antiangiogênico	[Koyanagi et al, 2003]
<i>Ascophyllum nodosum</i>	1 mg/animal	Plasmocitoma MOPC-315	Prevenção de angiogênese em tecidos tumorais	[Narazaki et al, 2008]

Adaptada de KWAK, 2014. Legenda: MΦ – Macrófagos; DEN - dietilnitrosamina;
NK – células assassinas naturais

Além de apresentar efeitos antitumorais, trabalhos já demonstraram que os polissacarídeos podem aumentar o potencial antitumoral de quimioterápicos ou até reduzir os efeitos colaterais e toxicidade deste tipo de tratamento quando associados a eles (MELCHART et al., 2002; OHWADA et al., 2003; IKEGUCHI et al., 2011). Os cogumelos medicinais têm uma longa história de uso como aditivo na terapia do câncer na Ásia. O polissacarídeo K (também conhecido como PSK ou Krestin), é um proteoglicano oriundo do fungo *Coriolus versicolor* que tem sido utilizado no Japão há mais de 30 anos como imunoterapia adjuvante para uma variedade de tipos de câncer (SUN et al, 2012; ASAI et al, 2008; TANAKA et al, 2012). O PSK foi primeiro isolado em 1971 e desde então tem sido estudado no Japão por seus efeitos em associação com a cirurgia padrão, quimioterapia e radioterapia. Ensaios controlados com seres humanos têm documentado um prolongamento do tempo de sobrevivência relacionado ao uso de

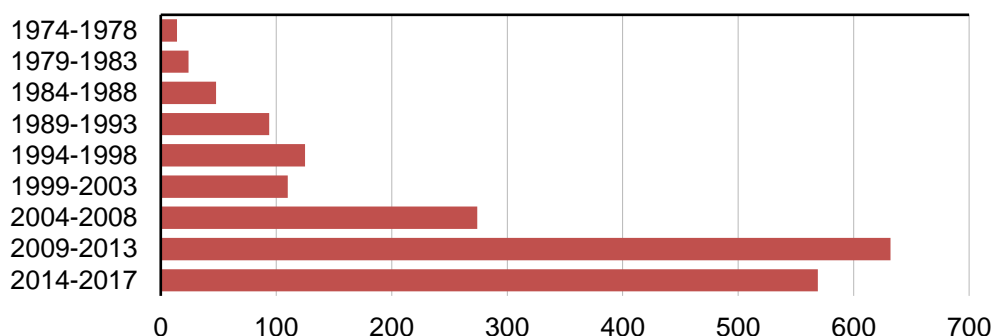
PSK em vários tipos de câncer, incluindo câncer de mama, pulmão, colorretal, e gástrico avançado (FRITZ et al, 2015; NAMIKAWA et al, 2015)

1.4 Justificativa

A complexidade do câncer e o difícil tratamento tornou essa doença alvo de intensa pesquisa para a descoberta e o desenvolvimento de novos fármacos (KUMAR et al., 2010). O tratamento quimioterápico utiliza drogas citotóxicas de modo a eliminar as células neoplásicas e esses medicamentos podem ser administrados sozinhos ou em combinação (poliquimioterapia) (VAN BEEK et al, 2015). Esta terapêutica continua a apresentar grandes desvantagens, pois os quimioterápicos convencionais são muito inespecíficos, com alta toxicidade frequentemente para células normais que estão em proliferação como da mucosa e da medula óssea, resultando numa dose sub-terapêutica. Devido a isso, a quimioterapia pode ser utilizada em combinação com a imunoterapia com intuito de melhorar a resposta objetiva e reduzir os efeitos colaterais (GOYDOS et al, 2005).

A busca por polissacarídeos como agentes antitumorais intensificou-se nas últimas décadas (Figura 2) devido à descoberta de suas propriedades terapêuticas e sua baixa toxicidade (TZIANABOS, 2000; PAULSEN, 2001; SCHEPETKIN & QUINN 2006). Embora muito promissores, ainda não há exemplos de PS obtidos de fonte marinha em estudos avançados para tratamento do câncer. Porém, com o aumento do interesse no potencial antitumoral dos PS, é possível que esse cenário mude nos próximos anos. De fato, a associação de polissacarídeos nos tratamentos pode minimizar os efeitos tóxicos provocados pela quimioterapia como mostrado experimentalmente em modelos *in vivo* (SOUSA et al., 2007; SILVA et al., 2012).

Figura 4. Número de publicações sobre polissacarídeos sulfatados com atividade antitumoral desde a década de 1970 até 2017. Resultados da busca no ScienceDirect utilizando as palavras-chave: "sulfated polysaccharides antitumor" no dia 23/04/2017.

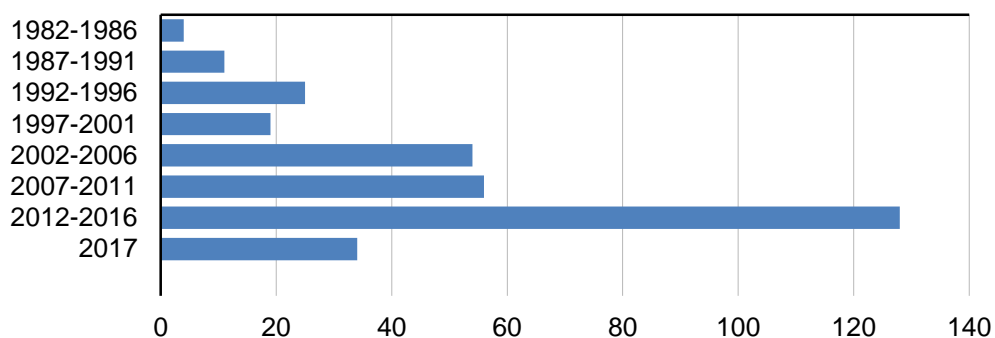


Atualmente existem 3 polissacarídeos, PSK ou Krestina, lentinana e esquizofilana, obtidos de fungos terrestres aprovados para uso no tratamento de neoplasias em associações com quimioterápicos já usados na clínica na Ásia (LEMIESZEK & RZESKI, 2012; SUN et al., 2012; FRITZ et al, 2015; NAMIKAWA et al, 2015), o que mostra que esses compostos podem ajudar a minimizar toxicidade e efeitos colaterais e até melhorar a eficácia de quimioterápicos. Apesar disso, os estudos pré-clínicos e clínicos utilizando polissacarídeos como adjuvantes ainda são bastante escassos.

Muitas drogas potencialmente antitumorais apresentam consideráveis efeitos colaterais. A toxicidade dessas substâncias contra células normais limita o seu uso clínico. Assim, a descoberta de novas drogas ativas contra tumores com baixa toxicidade associada para células não tumorais e poucos efeitos colaterais se tornou um importante alvo da ciência biomédica (OOI; LIU, 2000; OLANO, MENDEZ & SALAS, 2009). Nesse contexto, os polissacarídeos são fortes candidatos a fármacos com ação imunoestimulante e antitumoral (SCHEPETKIN; QUINN, 2006; NA et al 2010; KARNJANAPRATUM; YOU, 2011).

Além disso, o interesse por estudos em que os macrófagos associados ao tumor são utilizados como alvos para terapêutica antitumoral também se intensificou bastante nos últimos anos. Isso se deve ao melhor conhecimento e reconhecimento da importância do microambiente tumoral para entendimento e descoberta de novas estratégias contra o câncer.

Figura 5. Número de publicações sobre macrófagos associados ao tumor como alvos na terapêutica antitumoral desde a década de 1980 até 2017. Resultados da busca no ScienceDirect utilizando as palavras-chave: "TAM antitumoral target" no dia 13/06/2017.



A imunoterapia para o tratamento do câncer tem apresentado diversas vantagens sobre os tratamentos clássicos, como cirurgia, radioterapia e quimioterapia por apresentar uma menor toxicidade para o organismo, porém os mecanismos envolvidos nessa nova estratégia de tratamento ainda não são bem esclarecidos ou conhecidos. Para ampliar o conhecimento sobre esse tipo de tratamento, se faz necessário uma pesquisa mais aprofundada entre sistema imunológico e o câncer.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliação do potencial antitumoral *in vitro* de macrófagos ativados por polissacarídeos sulfatados extraídos da alga *Dictyota caribaea*

2.2 Objetivos Específicos

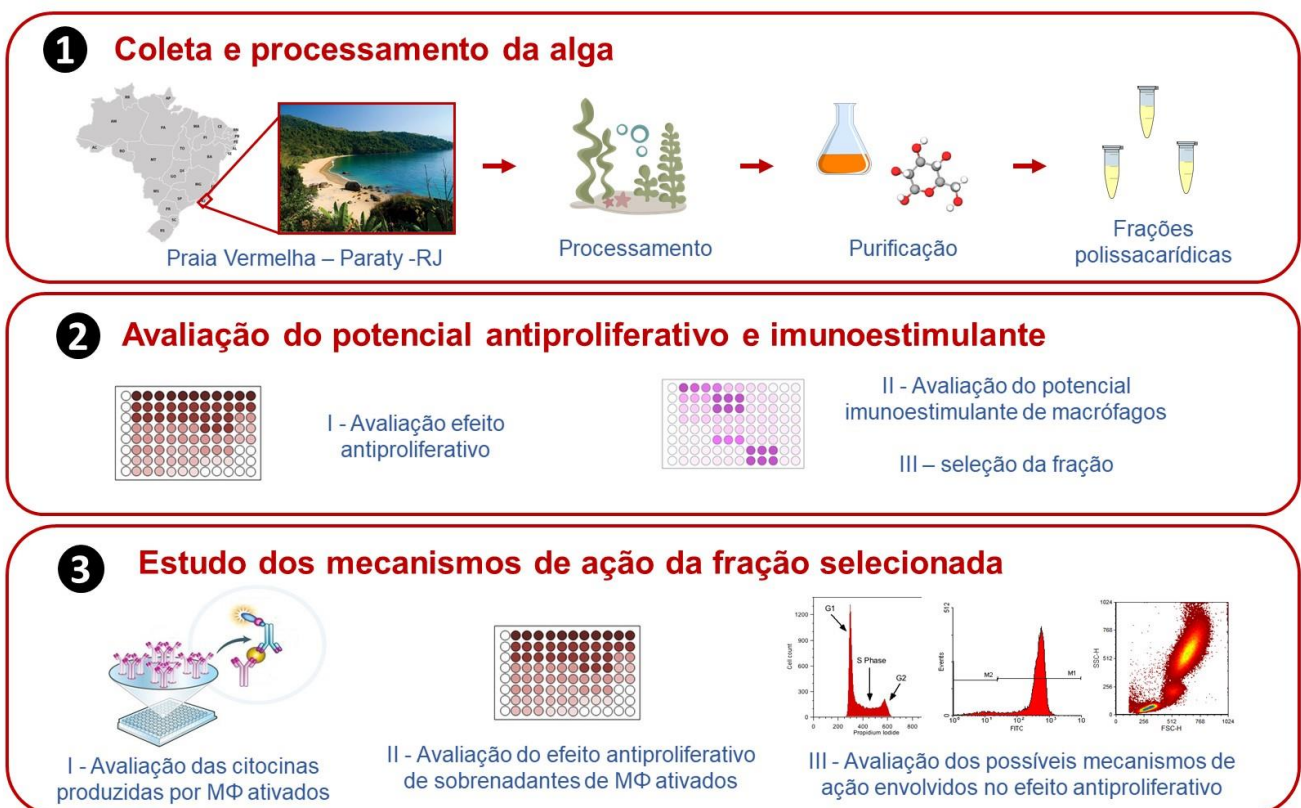
- Avaliar a ativação de macrófagos murino (RAW 264.7) *in vitro* utilizando polissacarídeos de *D. caribaea* (DCA);
- Avaliar o potencial citotóxico por DCA sobre a linhagem de melanoma murino B16-F10;
- Avaliar o potencial citotóxico do meio condicionado de macrófagos ativados por DCA (MC DCA) em B16-F10 em cultura;
- Caracterizar o fenótipo dos macrófagos ativados por DCA;
- Avaliar os mecanismos da citotoxicidade dos macrófagos ativados por DCA em B16-F10.
- Avaliar a influência na citotoxicidade em B16-F10 da associação de quimioterápico com DCA, bem como com MC DCA.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Planejamento Experimental

Espécimes da alga *Dictyota caribaea* foram coletados na Praia Vermelha (Paraty, RJ) para obtenção do extrato bruto e das frações de polissacarídeos sulfatados através de precipitação de solução aquosa com gradiente crescente de concentrações de etanol. Todos os polissacarídeos sulfatados obtidos da *D. caribaea* (DCA) foram utilizados nos ensaios de avaliação de atividades biológicas *in vitro*. Inicialmente, foram avaliadas as atividades imunoestimulante, utilizando macrófagos murino, e antiproliferativa, contra células de melanoma murino, de DCA. Em seguida, foram realizados ensaios para caracterização dos macrófagos ativados por DCA, bem como a avaliação dos efeitos do MC nas células de melanoma *in vitro*. A figura 6 resume esquematicamente o planejamento experimental adotado neste trabalho.

Figura 6. Planejamento experimental do presente trabalho.



Legenda: MΦ - Macrófagos

3.2 Coleta e processamento da alga

Amostras da espécie *D. caribaea* (Figura 8) foram coletadas na Praia Vermelha, município de Macaé, Rio de Janeiro (23° 11' 46" S e 44° 38' 38" O) (Figura 7). O material coletado foi levado para o Laboratório Integrado de Prospecção em Produtos Bioativos da Universidade Federal do Rio de Janeiro e o processamento e identificação realizados sob orientação do Prof. Dr. Leonardo Paes Cinelli.

Figura 7. Praia Vermelha, Paraty - Rio de Janeiro



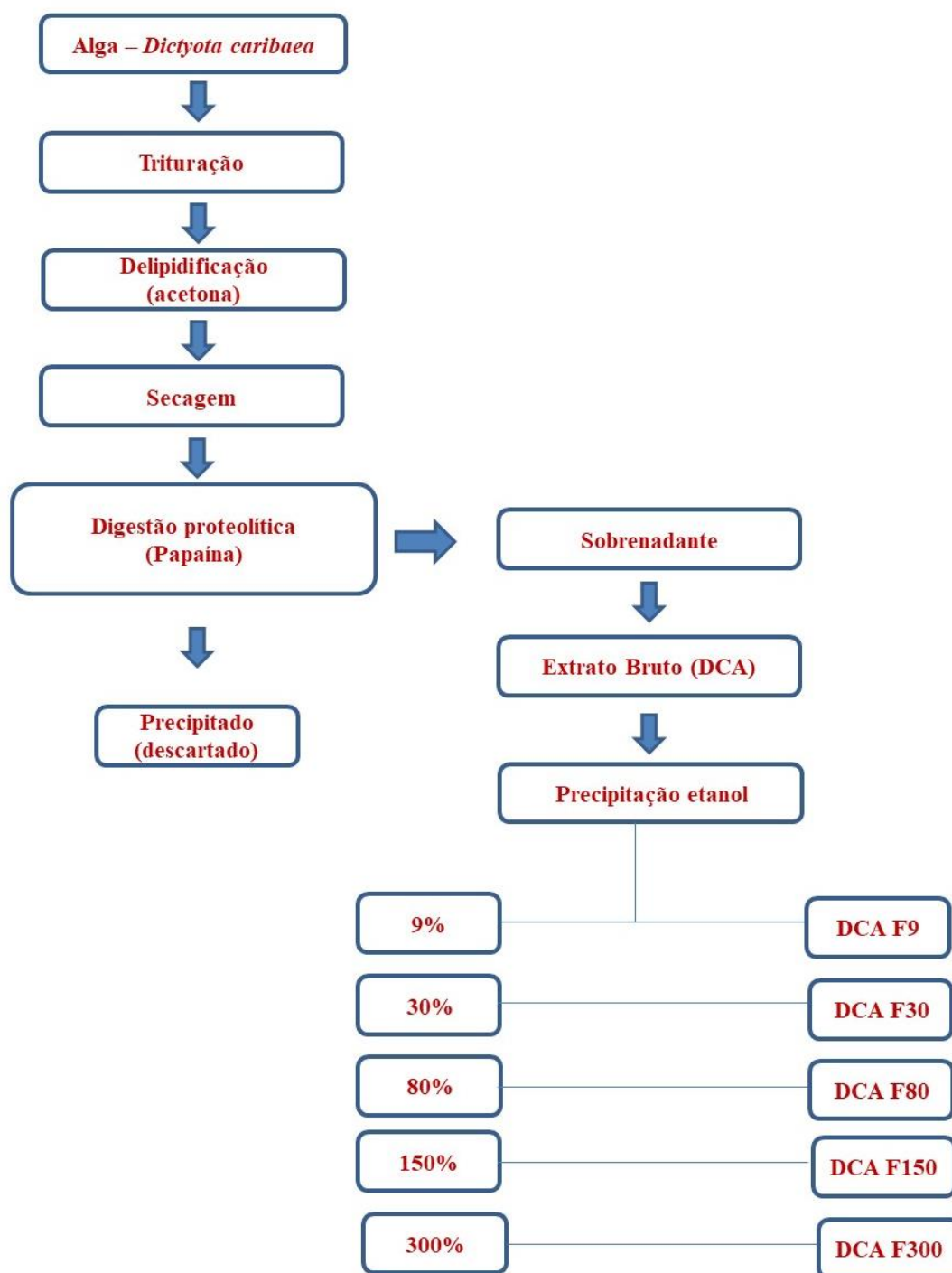
(Fonte: <http://paratynautica.com.br/>)

Figura 8. Imagem da alga *Dictyota caribaea*.



(Fonte: <http://www.taxateca.com/ordendictyotales.html>)

Após a limpeza da alga, foi realizada uma extração enzimática, originando o extrato bruto (EB DCA) e, em seguida, o produto foi precipitado em crescentes concentrações de etanol (%) originando as frações DCA F9, DCA F30, DCA F80, DCA F150, DCA F300 Figura . Os polissacarídeos totais e respectivas frações utilizadas foram enviados para o Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia Marinha do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará.

Figura 9. Fluxograma da extração dos polissacarídeos sulfatados da *Dictyota caribaea*

Fonte: Arquivo pessoal da autora

3.3 Avaliação do efeito imunoestimulante e antiproliferativo

3.3.1 Linhagens celulares

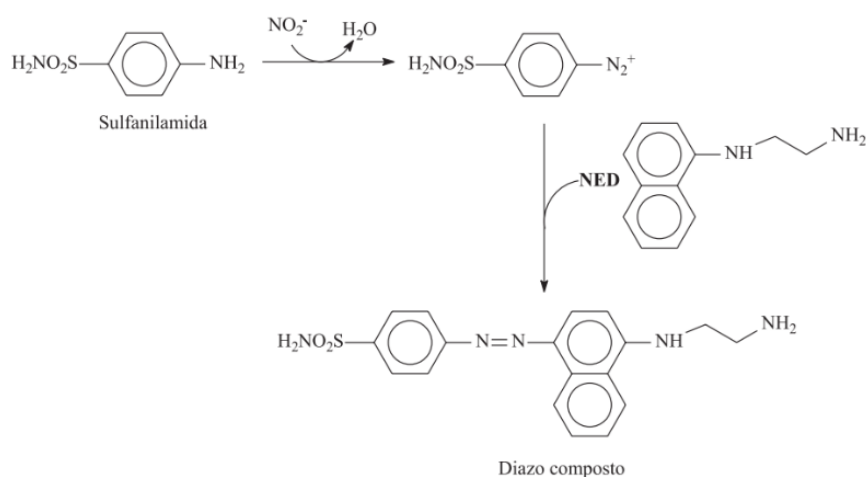
As linhagens celulares utilizadas nos experimentos in vitro foram melanoma metastático murino B16-F10 e macrófagos murinos RAW 264.7.

As células foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (Corning, 25 cm², volume de 50 mL ou 75 cm², volume de 250 mL) utilizando o meio de cultura DMEM (Lonza) complementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (100 U/mL penicillina e 100 µg/mL estreptomicina).

As culturas foram manuseadas em câmaras de fluxo laminar vertical (ESCO, modelo Airstream classe II-B2; VECO, modelo Biosafe 12 classe II) e mantidas em incubadoras de CO₂ a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂ (SAYNO, modelo MCO-19AIC). O crescimento das culturas foi acompanhado diariamente com auxílio de microscópio óptico invertido (LABOMED, modelo TCM 400) e o repique para meio de cultura novo foi feito quando necessário. Para o desprendimento das células tumorais utilizou-se uma solução de tripsina-EDTA 0,025% (Gibco) em PBS (FRESHNEY, 2005) e para os macrófagos murinos utilizou-se raspador de células (SPL life Science)

3.3.2. Avaliação do efeito imunoestimulante através da ativação de macrófagos

O teste de Griess é um método colorimétrico que permite a quantificação indireta de óxido nítrico (NO) a partir da detecção de nitrito em solução descrito por Green e colaboradores (1981). Na reação o íon nitrito reage com a sulfanilamida em meio ácido formando um sal de diazônio que reage por acoplamento com cloridrato de N-(1-naftil) etilenodiamina (NED) formando um diazo composto, conforme apresentado na Figura 9, de coloração vermelha que apresenta um máximo de absorção em torno de 540nm (RAMOS, 2006).

Figura 10. Reação de Griess

Fonte: RAMOS, 2006

3.3.2.1 Procedimentos

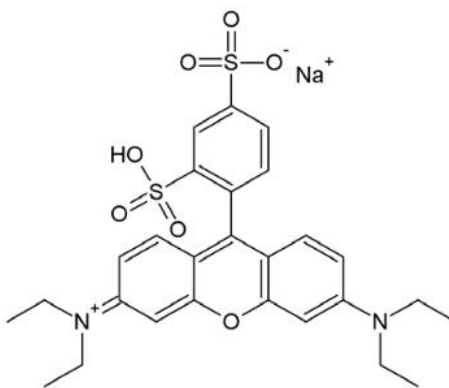
Para a realização desse ensaio, os macrófagos murinos RAW 264.7 foram plaqueados 24 horas antes da adição da amostra teste em placas de 48 poços na densidade de $1,5 \times 10^5$ células/mL.

As amostras de DCA foram testadas nas concentrações de 10, 100 e 250 $\mu\text{g/mL}$ e o LPS (100 ng/mL) foi utilizado como controle positivo deste experimento. A salina foi utilizada como veículo e todas as amostras foram incubadas por 24h. Em seguida uma alíquota de 50 μl do MC foi adicionada a 50 μl do reagente de Griess [sulfanilamida 1% em ácido acético 30% / N-(1-nafitil)-etilenodiamina 0,1 % em ácido acético 60%] em ambiente escuro por um período de 5-10 minutos. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 560 nm. A concentração de nitrito (μM) foi determinada a partir de uma curva-padrão utilizando solução de NaNO_2 a uma concentração inicial de 200 μM seguida de diluições seriadas com fator de diluição igual a 2, com a menor concentração sendo 1,56 μM .

3.3.3 Avaliação do efeito antiproliferativo dos PS da alga *Dictyota caribaea*

O ensaio da sulforrodamina B (SRB) é utilizado para a determinação da densidade celular, com base na medição do teor de proteínas celulares totais e não depende do metabolismo celular, de acordo com Skehan e colaboradores (1990). O SRB é uma aminoxantina de cor rosa brilhante com dois grupos sulfônicos (Figura 10) que são capazes de se ligar às porções terminais dos aminoácidos das células fixadas com ácido tricloroacético (TCA) permitindo que o corante se ligue às proteínas totais localizadas no interior de células alterando a absorvância máxima de luz da solução para 565 nm. Este ensaio é simples, sensível, rápido, reprodutível, sendo, atualmente, um dos testes de citotoxicidade mais utilizados na rotina de triagem de drogas anticâncer pelo Instituto Nacional de Câncer (NCI) (FRESHNEY, 1994; RUBINSTEIN et al., 1990).

Figura 11. Estrutura da Sulforrodamina B



(Fonte: <https://www.gbiosciences.com/Bioassays/CytoScan-SRB-Cytotoxicity-Assay>)

3.3.3.1 Procedimentos

Para a realização desse ensaio, as células B16-F10 foram plaqueadas 24 horas antes da adição da amostra teste em placas de 96 poços na densidade de 4×10^4 células/mL.

A amostras de DCA (10, 100 e 250 $\mu\text{g/mL}$) e nitrito (1, 5, 10, 15 e 20 μM) foram incubadas durante 48h nas placas, em estufa a 5% de CO_2 a 37 °C. No momento

em que as células foram tratadas, a placa tempo zero (não tratada) foi fixada com ácido tricloroacético (TCA) a 10%, e a placa foi reservada a uma temperatura de 4 °C. Após o tempo de incubação de 48 h, o sobrenadante das células foi retirado e as mesmas foram também fixadas com TCA a 10%, sendo então guardadas a uma temperatura de 4°C por no mínimo 1 hora. Após o período de fixação, as placas foram lavadas 5 vezes com água destilada e em seguida esperou a secagem dos poços até que não houvesse umidade aparente. Em seguida adicionou-se 100 µL da solução de SRB a 0,4%, e as placas então foram mantidas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C por 30 minutos. Ao término do tempo de incubação, as placas foram lavadas 5 vezes usando ácido acético a 1% para remover o excesso de SRB que não ficou ligado aos aminoácidos celulares. Já as paredes dos poços foram limpas cuidadosamente para remover qualquer excesso de SRB que pudesse falsear o teste.

Para realizar a leitura das placas, o SRB que estava ligado aos aminoácidos fixados, foi solubilizado em 200 µL de tampão tris base 10 mM a 4°C, e homogeneizadas em mesa agitadora por pelo menos 10 minutos, em temperatura ambiente. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro de placa (Fisher Scientific, modelo Multiskan FC) no comprimento de onda 564 nm ou 570 nm.

3.3.4 Análise Estatística

A partir da curva-padrão do nitrito no ensaio de Griess foi utilizada regressão linear para determinar as concentrações de NO₂ em cada amostra. As concentrações de NO₂ encontradas foram analisadas por meio de interpolação dos valores e seguida de Análise de Variância (ANOVA) com pós teste de Dunnett utilizando o programa GraphPad Prism (*p<0,05).

Os valores de absorbância obtidos no ensaio do SRB foram normalizados e transformados em percentual de inibição de crescimento. Em seguida, foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste de Dunnett utilizando o programa GraphPad Prism (*p<0,05).

3.4 Avaliação dos mecanismos do efeito antiproliferativo de macrófagos

3.4.1 ELISA

Para detectar e quantificar as citocinas IL-10, e TNF- α no MC de macrófagos estimulados por DCA F9 (100 e 250 $\mu\text{g/mL}$), LPS (100 ng/mL) e salina foi utilizado o ensaio imunoenzimático ELISA. Nesse ensaio um anticorpo reconhece um antígeno para o qual é específico e a enzima covalentemente ligada ao anticorpo catalisa uma reação gerando um corante que pode ser detectado por espectrofotometria.

3.4.1.1 Procedimentos

A detecção das citocinas IL-10 e TNF- α foi realizada por meio do Kit DuoSet (R&D Systems, EUA). Resumidamente, as placas para ELISA de 96 poços foram incubadas com o anticorpo de captura para IL-10 ou TNF- α por 16h em temperatura ambiente com 100 μL de anticorpo para cada poço. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com 200 μL de tampão de lavagem e bloqueadas com 200 μL de BSA 1% por 1 h. Após o bloqueio, 100 μL das amostras ou da curva padrão foram adicionadas em cada poço e incubadas por 2 h em temperatura ambiente. As placas foram então lavadas três vezes com 200 μL de tampão de lavagem e depois incubadas com anticorpo de detecção para IL-10 ou TNF- α em temperatura ambiente por 2 horas. Na etapa seguinte, as placas foram lavadas novamente por três vezes com 200 μL de tampão de lavagem e incubadas com 100 μL de estreptavidina em temperatura ambiente por 20 minutos.

As placas foram lavadas três vezes com 200 μL de tampão de lavagem. Na etapa seguinte, 100 μL da solução substrato para revelação foram adicionadas em cada poço e incubadas por 20 min à temperatura ambiente protegidos da luz. A reação enzimática foi cessada, adicionando 50 μL solução de parada (H_2SO_4). Enfim, a absorbância foi medida à 450nm. O resultado foi expresso em pg/mL.

3.4.1.2 Análise Estatística

De posse da curva-padrão realizou-se uma regressão linear a fim de se obter a equação da reta que permitiu determinar a concentração de cada citocina em função da sua absorvância. Após essas etapas, os valores das concentrações de citocinas obtidos foram interpolados e analisados por meio da análise de variância (ANOVA) seguido de teste de Dunnett utilizando o programa GraphPad Prism (com $*p < 0,05$ indicando diferença significativa quando comparado com o controle negativo).

3.4.2 Avaliação do efeito antiproliferativo de MC de macrófagos ativados com DCA F9

Para avaliar o efeito antiproliferativo MC, foi realizado o ensaio do SRB. As amostras utilizadas foram 50% do MC previamente estimulados por salina, LPS (100 ng/mL), DCA F9, F30, F80, F150 e F300 nas concentrações de 10, 100 e 250 $\mu\text{g/mL}$, com concentração final de metade das testadas. O tratamento foi realizado por 48h.

3.4.2.1 Procedimentos

Os procedimentos para avaliação do efeito antiproliferativo pelo método do SRB foram descritos acima no item 3.3.3.

3.4.3 Avaliação dos efeitos do meio condicionado por DCA F9 em células de melanoma B16-F10 por meio de citometria de fluxo

O estudo preliminar do mecanismo de ação do MC DCA F9 (10, 100 e 250 $\mu\text{g/mL}$) contra a linhagem de melanoma murino B16-F10, foi realizado através de uma série de experimentos para avaliação de alterações nas células por citometria de fluxo. Foram realizadas avaliações da concentração de células, da integridade de membrana, de alterações morfológicas e do perfil de ciclo celular após tratamento de 48h.

A citometria de fluxo é uma ferramenta que permite investigar e classificar diferentes parâmetros celulares simultaneamente em milhares células. Desta forma é possível avaliar diversas alterações e características de eventos biológicos em células ou outras partículas microscópicas em estudos de caracterização de citotoxicidade. A detecção de um feixe de luz que passa pela partícula com um mínimo de desvio está relacionada com o tamanho celular, que se dá por dispersão linear (FSC, Forward Scatter), enquanto que a captação de um desvio ortogonal está relacionada com a complexidade da célula, em particular sua granulidade, que ocorre por dispersão lateral (SSC, Side Scatter). Além disso, é capaz de detectar a fluorescência emitida por marcadores utilizados, classificando cada célula com um evento (SHAPIRO, 1995).

3.4.3.1 Procedimentos

As células B16-F10 foram tratadas com o MC com salina (controle negativo), como controle positivo foi utilizado a doxorrubicina (0,4 μM) e o por lipopolissacarídeo (LPS). Para a análise do efeito da fração DCA F9, as células foram tratadas com 50% do MC com PS nas concentrações de 10, 100 e 250 $\mu\text{g/mL}$ por 48h de incubação. As células foram analisadas utilizando o citômetro FACSVerse (BD Biosciences).

Após soltura das células por tripsinização, uma parte das células foi marcada com 5 $\mu\text{g/mL}$ Iodeto de Propídeo (PI, do inglês, *Propidium Iodide*) para avaliação da integridade da membrana plasmática, de alterações morfológicas e contagem de células. Devido a sua natureza hidrofílica, o PI liga ao DNA das células cuja membrana plasmática esteja rompida, como nos casos de apoptose tardia e necrose, e emitindo alta fluorescência vermelha quando excitado pelo *laser* (azul, neste caso, excitando a 488 nm). As células cujas membranas estão íntegras não emitem fluorescência. Desta forma, é possível a diferenciação entre células viáveis e não viáveis. Além disso, como o PI não altera a morfologia celular, nem influencia na quantidade de células no curto tempo necessário para a realização do experimento, essas medidas também puderam ser realizadas com essas amostras aplicando-se apenas o fator de correção da diluição do volume utilizado da solução de PI (SHAPIRO, 1995).

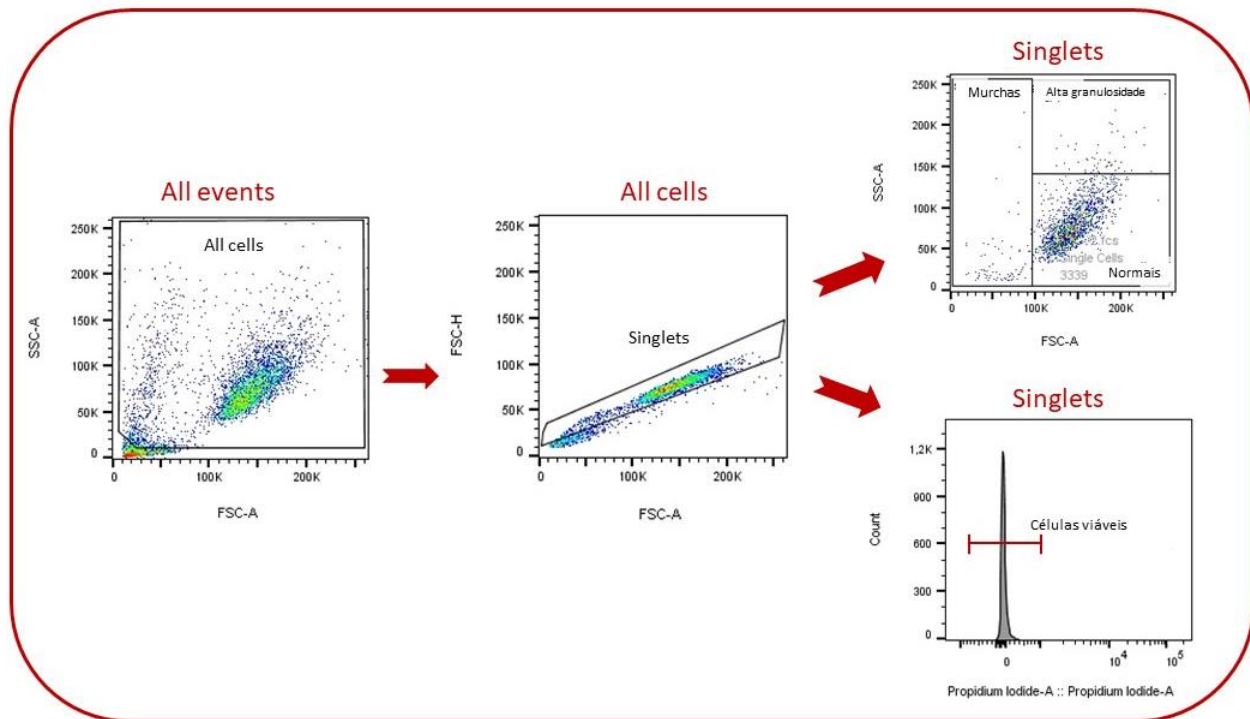
À outra parte das células foi adicionado 5 $\mu\text{g/mL}$ de PI com Triton X-100 1% para lisar as membranas plasmáticas e marcar o DNA de todas as células, permitindo a análise do ciclo celular. Neste ensaio, o PI se liga ao DNA após a membrana plasmática

das células ter sido permeabilizada por um detergente, permitindo que o iodeto de propídeo ligue-se ao DNA de todas as células. Células com o núcleo íntegro emitirão alta fluorescência, e aquelas que apresentam núcleos com condensação da cromatina e DNA fragmentado incorporam menos o iodeto de propídeo e por isso emitem menor fluorescência. Além disso, o PI se intercala proporcionalmente à quantidade de DNA da célula, permitindo mensurar as fases do ciclo celular por meio da quantidade de DNA presente em cada fase do ciclo.

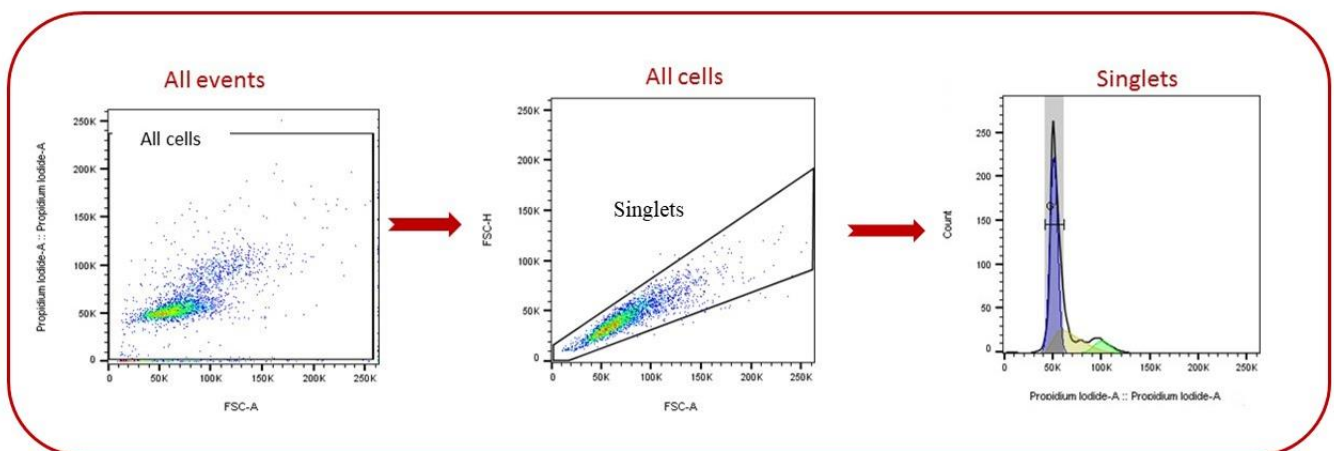
Após a marcação adequada, 10 mil eventos foram adquiridos no citômetro para avaliação de contagem, morfologia e ciclo celular. Foi realizada a estratégia de gates apropriada para a população de células desejada tendo sido excluídos os debris e agregados da análise (Figura 11). Inicialmente foi construído um gráfico de pontos (dot plot) com parâmetros de morfologia (FSC vs SSC) contendo todos os eventos adquiridos pelo citômetro (*all events*) onde foi criada uma região de seleção (gate) contendo todas as células adquiridas (*all cells*) de forma a excluir os debris e outliers. Em um novo gráfico contendo apenas a população de *all cells* criou-se um *gate* para selecionar os eventos simples (*singlets*) através da plotagem de 2 medidas do parâmetro FSC. Finalmente, foram criados gráficos contendo apenas *singlets* com gates apropriados para avaliar integridade de membrana e alterações morfológicas (Figura 11A) (redução do tamanho e aumento da granulosidade) ou ciclo celular (Figura 11B). A contagem de células foi realizada a partir de dados do *gate* de células com morfologia normal. Os resultados de contagem, morfologia e ciclo celular foram analisados utilizando o software FlowJo (Tree Star Inc)

Figura 12. Estratégia de seleção das populações utilizadas para A) contagem de células, análise de alterações morfológicas, integridade de membrana e B) ciclo celular nos experimentos de citometria

A



B



3.4.3.2 Análise Estatística

O experimento foi realizado em triplicata e a análise dos dados obtidos de

contagem de células, integridade de membrana, morfologia e porcentagem de células nas fases do ciclo celular foram comparados por meio da análise de variância (ANOVA) seguido de Dunnett utilizando o programa GraphPad Prism (com diferença significativa quando $*p < 0,05$ comparado com o controle negativo).

3.4.4 Avaliação do efeito antiproliferativo da associação de quimioterápico com diferentes DCA e meio condicionado com DCA

O ensaio de associação com quimioterápicos foi realizado como experimento complementar ao demais. O SRB (descrito no item 3.3.3) foi utilizado para determinar os possíveis efeitos antiproliferativos de DCA e MC DCA em associação com quimioterápico contra a linhagem de melanoma.

3.4.4.1 Procedimentos

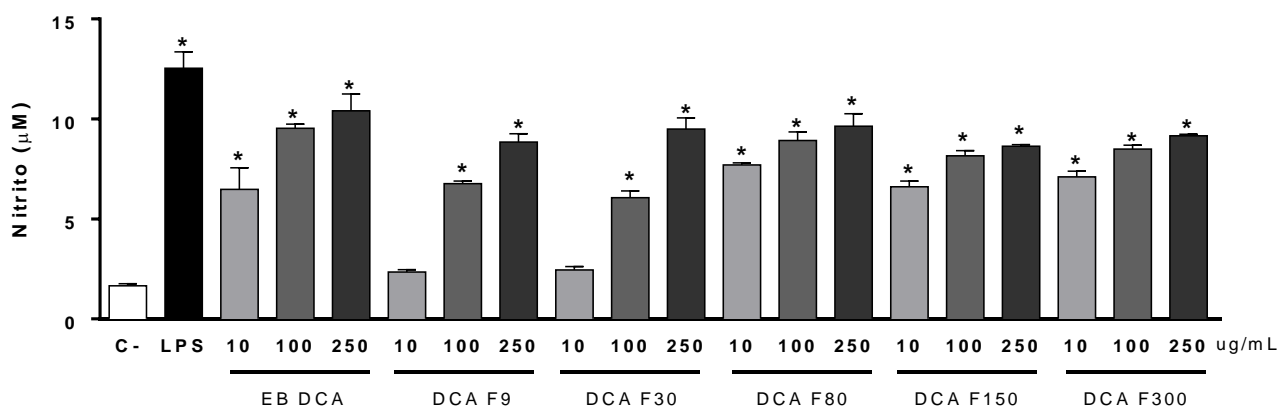
A doxorubicina (DOX) foi utilizada nas concentrações de 0,2 e 0,4 μM e as amostras analisadas foram DCA F9 na concentração de 125 $\mu\text{g/mL}$, MC com salina, LPS (100 ng/mL) e DCA F9 (125 $\mu\text{g/mL}$) e os mesmos associados com a DOX em ambas as concentrações.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação do efeito imunoestimulante

Todas as amostras foram avaliadas quanto ao seu potencial imunestimulante através ativação de macrófagos murinos RAW 264.7 (Figura 13) pelo ensaio do Griess. O lipopolissacarídeo de bactérias gram-negativas (LPS) foi utilizado como controle positivo desse experimento. A produção de NO foi avaliada indiretamente através da detecção de nitrato (NO_2^-), composto estável derivado do NO.

Figura 13. Detecção da produção de nitrato no MC de macrófagos murinos (RAW264.7) estimulados in vitro com salina (C-), 100 ng/mL de LPS ou 10, 100 e 250 $\mu\text{g/mL}$ dos PS da *Dictyota caribaea* após 24h de incubação. Os valores de absorbância obtidos foram transformados em concentração de nitrato por interpolação e analisados por análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste de Dunnett comparando as amostras com o C-. * $p < 0,05$.



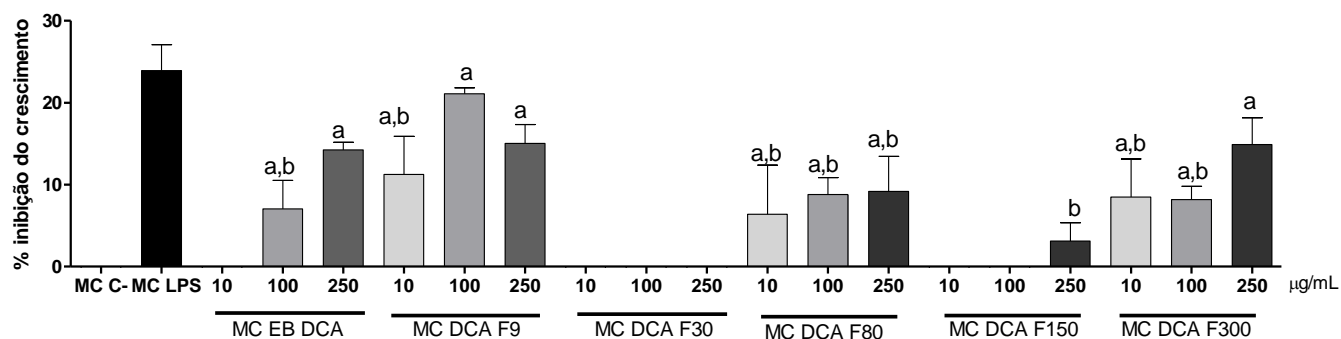
O extrato bruto e as frações de DCA foram capazes de aumentar os níveis de nitrato, indicando indiretamente uma maior produção de NO pelos macrófagos murinos. Nenhuma das amostras teve uma produção de NO tão elevada como a do LPS, porém tiveram valores diferentes ($p < 0,05$) do controle negativo, com exceção da DCA F9 que não apresentou diferença na sua menor concentração (10 $\mu\text{g/mL}$).

4.2 Avaliação do efeito antiproliferativo dos polissacarídeos sulfatados da *Dictyota caribaea* e do meio condicionado de macrófagos ativado

A avaliação do efeito antiproliferativo demonstrou que nenhum dos PS testados apresentou citotoxicidade contra a linhagem de melanoma murino B16-F10 (Dados não apresentados). No entanto, o MC de RAW 264.7 tratado previamente com PS apresentou uma inibição do crescimento tumoral (Figura 14), com exceção do MC DCA F30 e MC DCA F150, que apesar de terem sido capazes de ativar os macrófagos, não inibiram o crescimento tumoral. Apesar de o MC extrato bruto e o MC DCA F80, DCA F150 e DCA F300 terem inibido o crescimento tumoral nas maiores concentrações testadas, o MC DCA F9 nas concentrações 100 e 250 µg/mL foi o que apresentou maior efeito antiproliferativo quando comparado as demais amostras em cada concentração e não apresentou diferença ($p < 0,05$) quando comparado ao efeito do MC LPS (100 ng/mL). A fração DCA F9 foi a amostra selecionada para os estudos dos possíveis mecanismos de ação envolvidos na sua atividade antiproliferativa. Esta seleção se deu devido ao seu alto rendimento (acima de 40%), quantidade disponível mais favorável para os ensaios e por não ter apresentado citotoxicidade contra linhagem tumoral murina, além de também ter sido capaz de ativar macrófagos, aumentando a produção de NO e cujos sobrenadantes apresentaram inibição do crescimento tumoral parecida com a do controle positivo (MC LPS).

Figura 14. Efeito antiproliferativo em células de melanoma B16-F10 após 48h de tratamento com meio condicionado de macrófagos murinos (RAW264.7) estimulados in vitro com salina (C-), 100 ng/mL de LPS ou 10, 100 e 250 µg/mL dos PS da *Dictyota caribaea*. Os valores de absorbância obtidos de 1 a 4 experimentos, realizados em triplicata, foram transformados em percentual de inibição de crescimento e, em seguida, os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste de Tukey. (* $p < 0,05$)^a: quando comparados ao grupo

controle negativo (MC Salina); (* $p < 0,05$)^b: quando comparado ao grupo controle positivo (MC LPS).



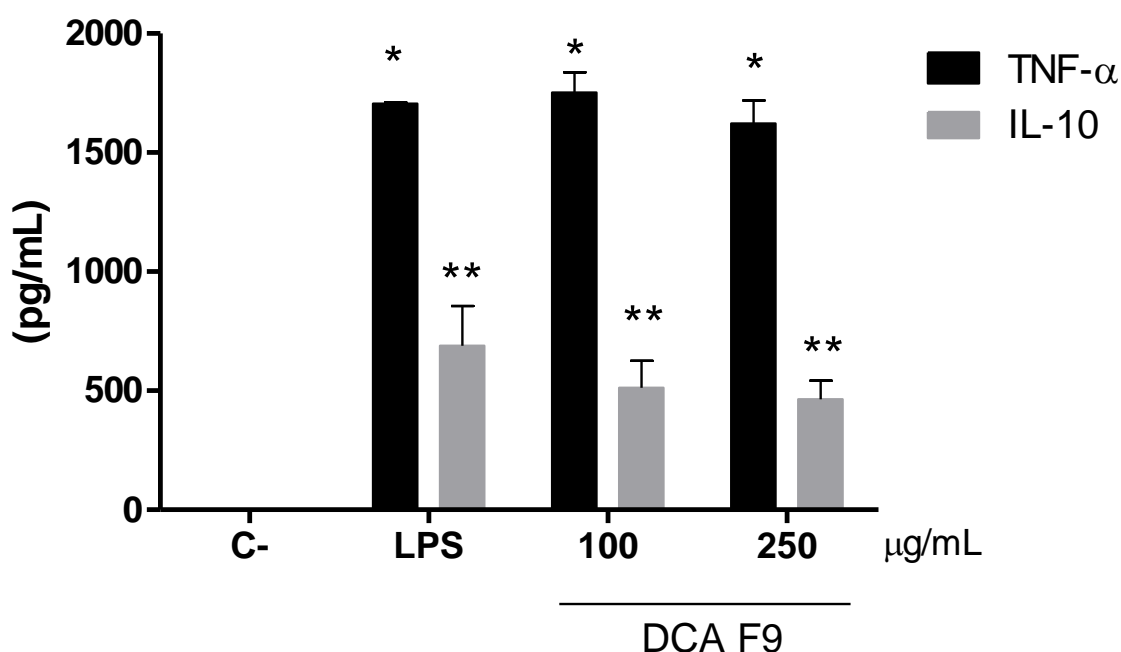
Além disso, o nitrito foi analisado quanto ao seu potencial citotóxico para avaliar se ele poderia estar inibindo o crescimento das células de melanoma murino B16-F10, contudo não apresentou qualquer inibição do crescimento tumoral após 48h de tratamento nas concentrações de 1, 5, 10, 15 e 20 uM (dados não apresentados), as mesmas concentrações encontradas nos ensaios de imunestimulação através do teste do Griess.

4.3 Avaliação dos mecanismos do efeito antiproliferativo de macrófagos

4.3.1 Avaliação da produção de citocinas por macrófagos murinos RAW 264.7

Conforme observado na figura 15, os MC DCA F9 e LPS aumentaram ($p < 0,05$) os níveis da citocina pró inflamatória TNF- α e anti-inflamatória IL-10, quando comparado ao grupo controle negativo (MC com salina).

Figura 15. Produção de citocinas por macrófagos murinos (RAW264.7) estimulados *in vitro* com salina (C-), 100 ng/mL de LPS ou 100 e 250 μ g/mL da fração polissacarídica sulfatada de *Dictyota caribaea* (DCA F9) após 24h de tratamento. Os valores de absorbância a partir da curva padrão das citocinas de 2 experimentos, em duplicata, foram interpolados e analisados por meio da análise de variância (ANOVA) seguido de Dunnett. * $p < 0,05$ indicando diferença quando comparado ao controle MC salina.



4.3.2 Avaliação dos efeitos do meio condicionado de macrófagos ativados por DCA F9 em células de melanoma B16-F10

4.3.2.1 Contagem de Células e Integridade de Membrana celular

Como apresentado na figura 16, pode-se observar uma diminuição do número de células nas concentrações de 100 e 250 $\mu\text{g/mL}$ do MC DCA F9 quando comparado com o controle (MC Salina), sugerindo que o MC DCA F9 favorece uma inibição da proliferação de melanoma murino B16-F10. A doxorubicina (DOX) a 0,4 μM também reduziu a contagem das células. Porém, como apresentado na Figura 17, não foram encontradas alterações na integridade da membrana das células tratadas com MC DCA F9, mostrando que a fração não causou danos na membrana das células. Apenas a (DOX) alterou a porcentagem de células com a membrana íntegra.

Figura 16. Contagem de células de melanoma metastático murino B16-F10 tratadas por 48h com meio condicionado de macrófagos murinos estimulados com salina (C-), 100 ng/mL de LPS ou 10, 100 e 250 $\mu\text{g/mL}$ de DCA F9. A doxorubicina (DOX) 0,4 μM e MC LPS 100 ng/mL foram utilizados como controles positivos deste experimento. Os dados estão apresentados como os valores da média \pm D.P.M., foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste de Dunnett utilizando o programa GraphPad Prism (* $p < 0,05$).

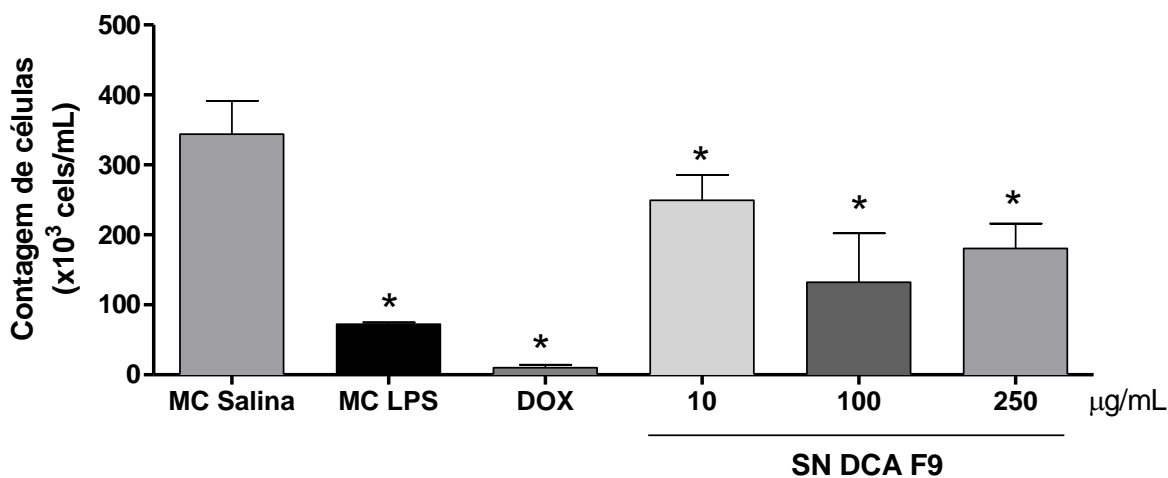
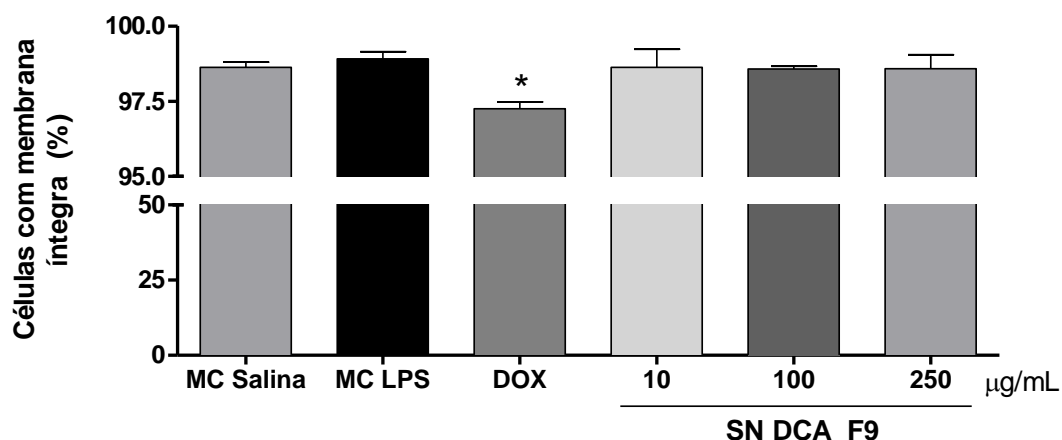


Figura 17. Integridade de membrana das células de melanoma metastático murino B16-F10 tratadas por 48h com meio condicionado de macrófagos murinos estimulados com salina (C-), 100 ng/mL de LPS ou 10, 100 e 250 $\mu\text{g/mL}$ de DCA F9. A doxorubicina (DOX) 0,4 μM e MC LPS 100 ng/mL foram utilizados como controles positivos deste experimento. Os dados

estão apresentados como os valores da média \pm D.P.M., foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste de Dunnett utilizando o programa GraphPad Prism (* $p < 0,05$).

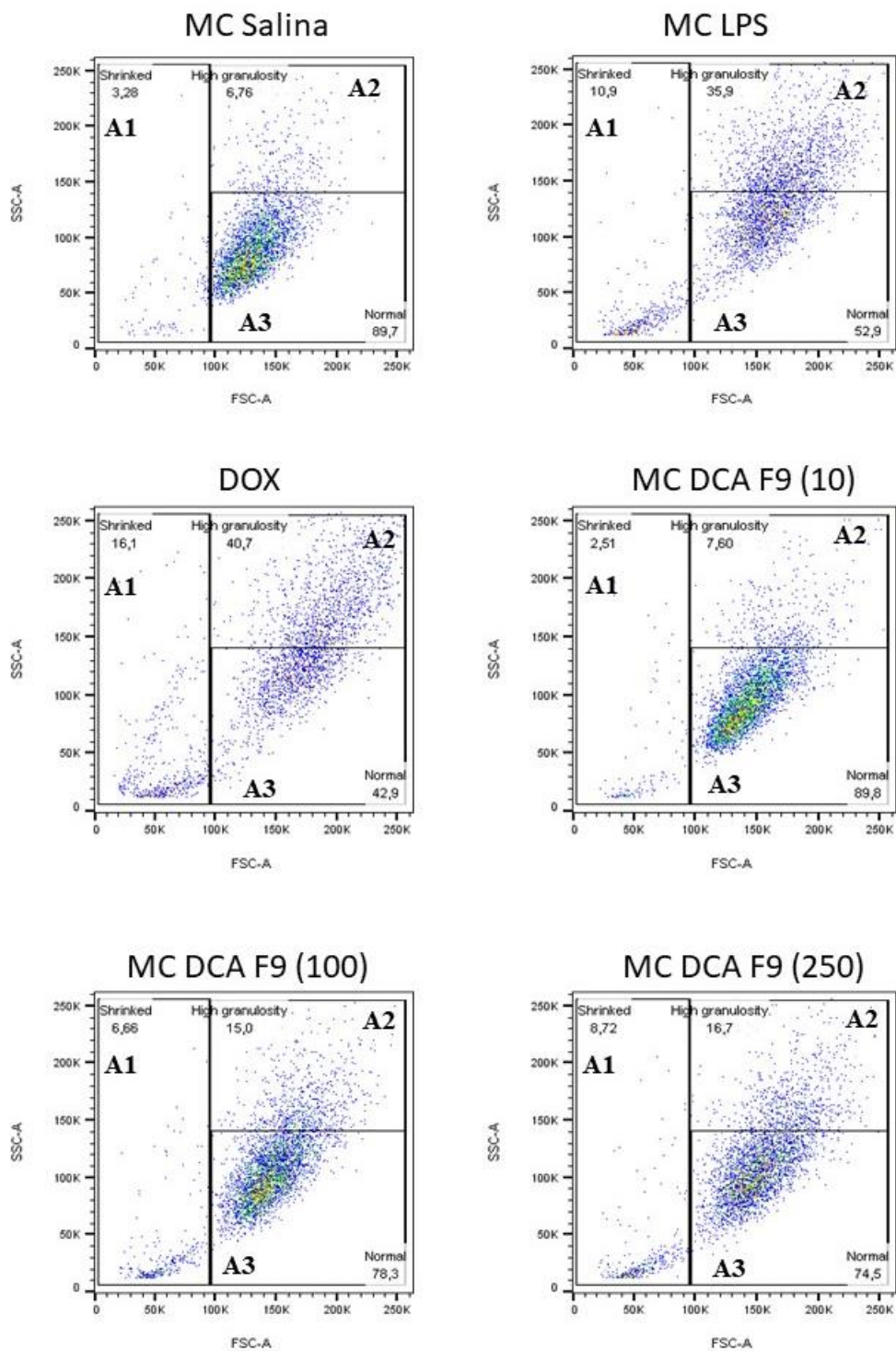


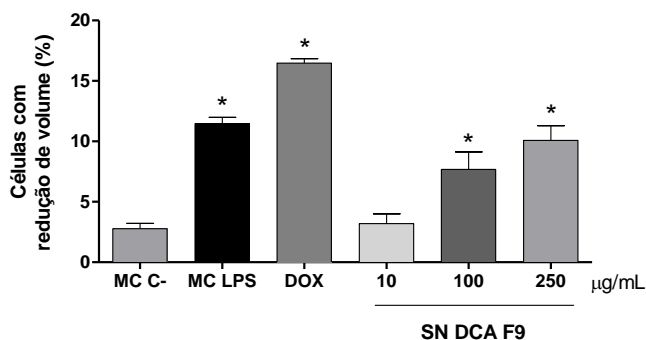
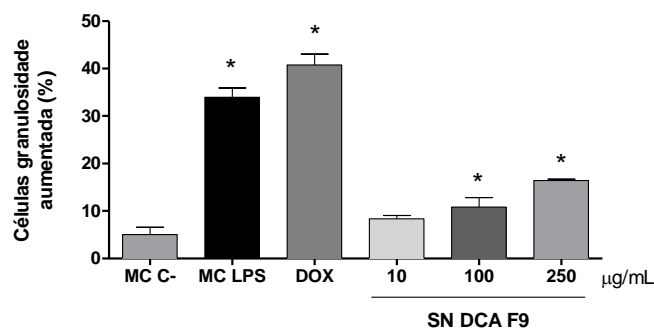
4.3.2.2 Alterações na morfologia celular

MC DCA F9 10, 100 e 250 $\mu\text{g/mL}$ também provocaram alterações morfológicas nas células de melanoma metastático murino B16-F10. Os tratamentos de 48h foram capazes de aumentar as características de espalhamento da luz na análise de citometria de fluxo (Figura 18 A), evidenciando as células com tamanho reduzido e com alta granulosidade na forma de gráfico de pontos. No tratamento com MC DCA F9 250 $\mu\text{g/mL}$ quase 9% das células apresentaram tamanho reduzido e quase 17% apresentaram aumento da granulosidade (Figura 18 B-C). O mesmo foi observado com os grupos tratados com sobrenadantes de macrófagos estimulados com 100 ng/mL de LPS e doxorrubicina (DOX) 0,4 μM , apresentando aproximadamente 35% e 40% das células com alta granulosidade e 10% e 16% de células com tamanho reduzido, respectivamente.

Figura 18. Percentual de células de melanoma metastático murino B16-F10 com morfologia normal ou alterada, tratadas por 48h com meio condicionado de macrófagos murinos estimulados com salina (C-), 100 ng/mL de LPS ou 10, 100 e 250 $\mu\text{g/mL}$ de DCA F9. A) A1, Área de células com tamanho reduzido; A2, Área de células com alta granulosidade; A3, Área de células com tamanho normal. B) Percentual de células com tamanho reduzido comparadas ao grupo controle negativo. C) Percentual de células com granulosidade aumentada comparadas ao grupo controle negativo. Os dados estão apresentados como os valores da média \pm D.P.M., foram

analisados por análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste de Dunnett. * $p < 0,05$ indicando diferença quando comparado ao controle negativo (MC salina).

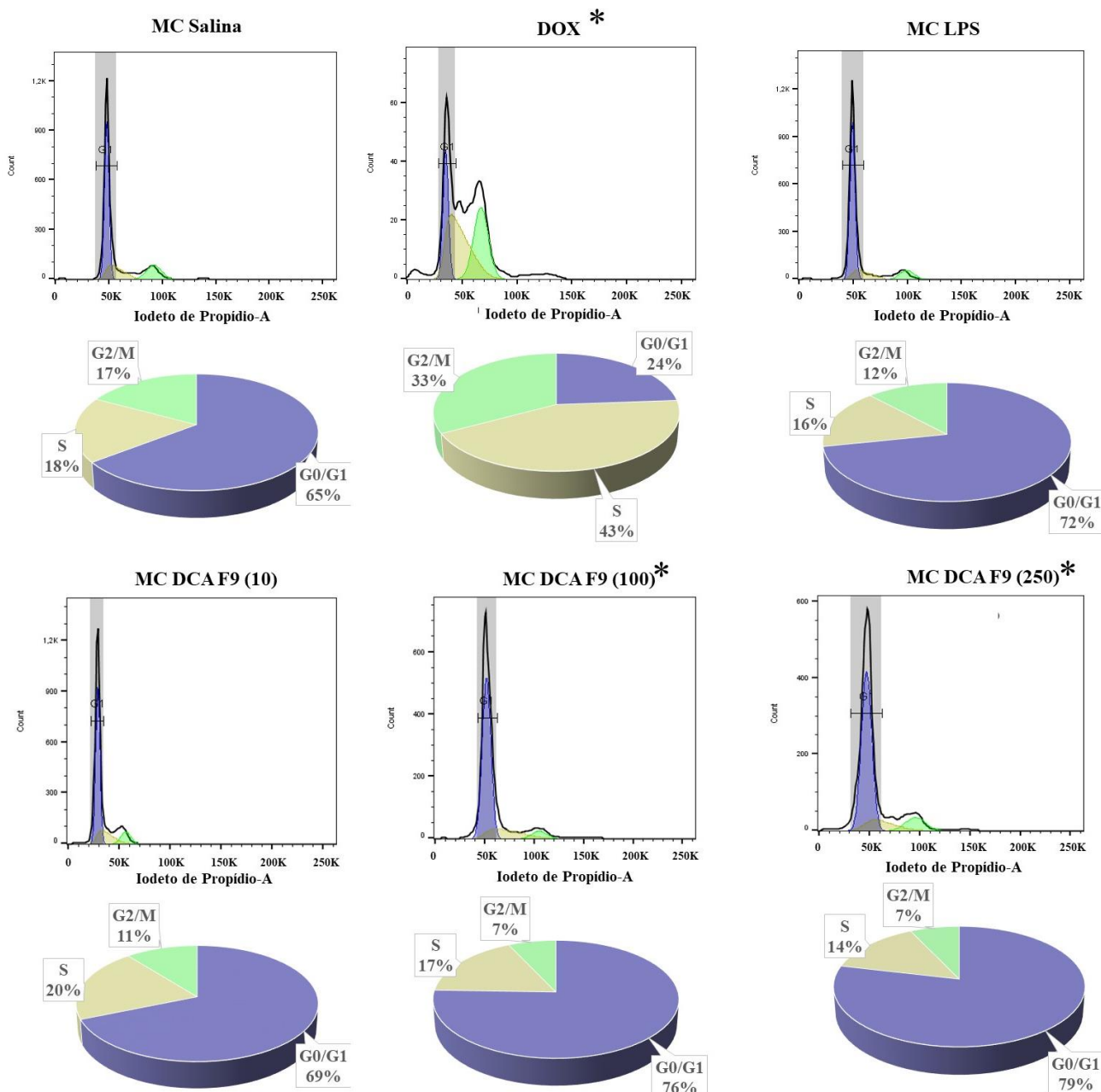
A

B**C**

4.3.2.3 Avaliação do Ciclo Celular

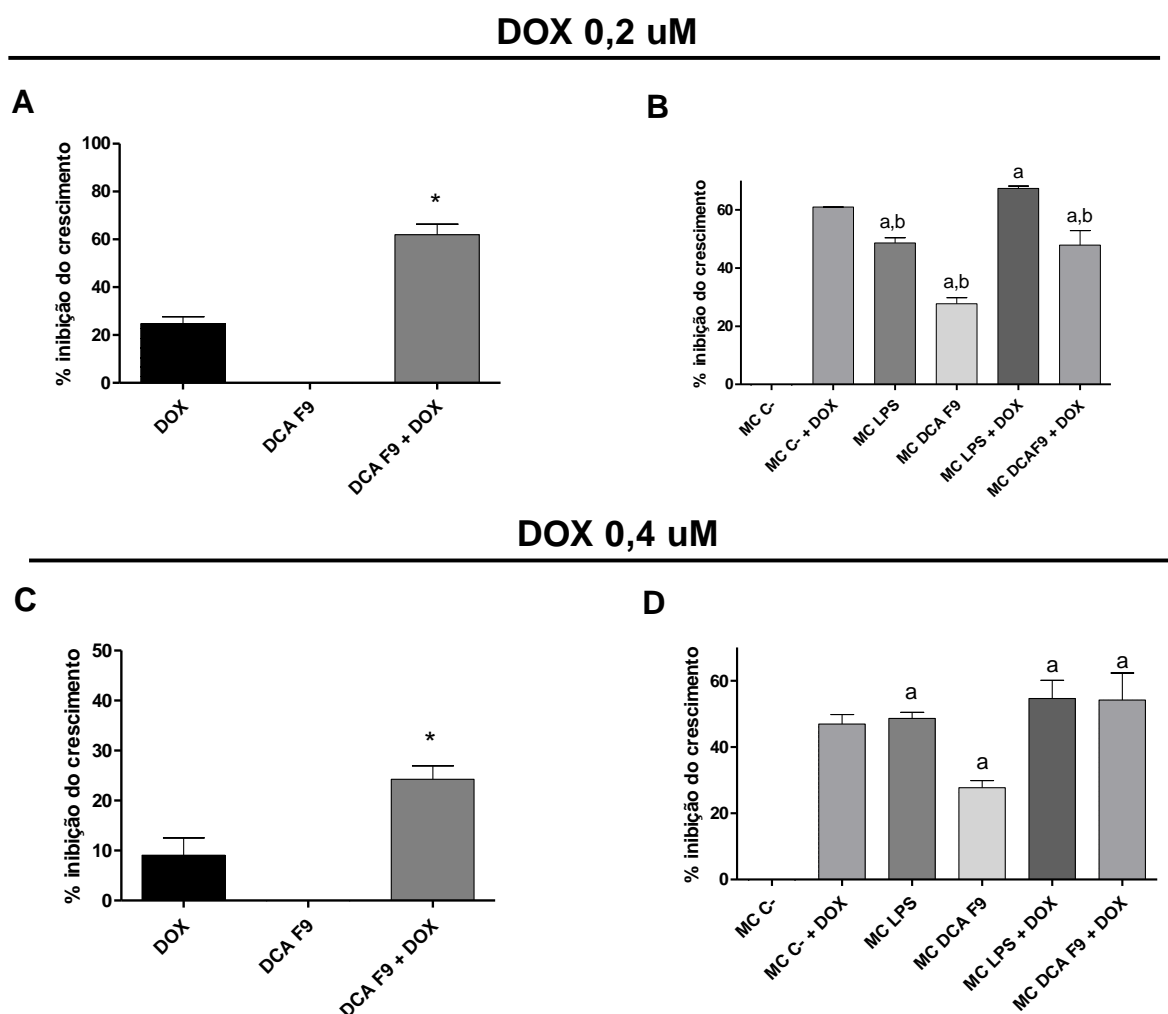
Na avaliação do perfil do ciclo celular das células de melanoma murino B16-F10 tratadas com MC DCA F9 10, 100 e 250 µg/mL por 48 horas, foi possível verificar que as amostras não interferiram nas fases G0/G1 e S das células tratadas, quando comparadas com o controle (MC Salina). Porém foi possível observar uma diminuição do percentual de células (~7%) na fase G2/M nas concentrações 100 e 250 µg/mL da amostra. De modo diferente, a doxorrubicina (DOX) 0,4 µM induziu a diminuição do percentual do número de células na fase G0/G1 (~24%) e aumento da fase S (~43%) e G2/M (~33%) quando comparado ao controle negativo (Figura 19).

Figura 19. Alterações no ciclo celular de células de melanoma metastático murino B16-F10 tratados por 48h com meio condicionado de macrófagos murinos estimulados com salina (C-), 100 ng/mL de LPS ou 10, 100 e 250 µg/mL de DCA F9. A doxorubicina (DOX) 0,4 uM foi utilizada como controle positivo deste experimento. Distribuição das fases do ciclo calculadas pelo programa seguida pela divisão das fases do ciclo celular em porcentagem. Os dados estão apresentados como os valores da média ± E.P.M., foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste de Dunnett. * $p < 0,05$ indicando diferença quando comparado com o grupo MC salina.



4.3.3 Avaliação da associação de quimioterápico com diferentes amostras dos experimentos

Figura 20. Efeito antiproliferativo em melanoma metastático murino B16-F10 da associação do quimioterápico doxorrubicina 0,2 μ M 0,4 μ M com DCA F9 (A e C) e com meio condicionado de macrófagos murinos estimulados *in vitro* com DCA F9 (B e D). Os valores de absorbância obtidos de um experimento em triplicata foram normalizados e transformados em percentual de inibição de crescimento. Em seguida os dados dos gráficos A e C foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguido de pós teste Dunnett, * $p < 0,05$ indicando diferença quando comparado com o controle positivo (DOX). Os dados do gráfico B e D foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguido de pós teste Tukey. $p < 0,05$ “a” MC salina vs amostras e “b” MC salina + DOX vs amostras.



O polissacarídeo sulfatado da fração DCA F9 (250 μ g/mL) não foi capaz de inibir o crescimento tumoral quando testado sozinho. Porém observou-se aumento do

efeito antiproliferativo do quimioterápico DOX em associação com DCA F9 em ambas as concentrações de DOX testadas (Figura 20 **A** e **C**). MC LPS e DCA F9, assim como o MC associado a DOX também foram capazes de inibir o crescimento tumoral comparados com controle (MC salina). Todavia, os MC DCA F9 e MC LPS, assim como as associações, apenas apresentaram diferença em relação ao controle positivo MC salina + DOX na concentração de 0,2 μ M (Figura 20 **B** e **D**)

5 DISCUSSÃO

O melanoma cutâneo é um tipo de câncer de fácil detecção por ser facilmente visualizado, porém após o processo de progressão tumoral, gerando metástases, ele se torna um tumor de difícil tratamento (FIDLER, 2003). Sendo assim, apesar da sua baixa taxa de incidência, sua letalidade é elevada (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2015). Atualmente, as fucoidanas estão disponíveis para uso como cosméticos, alimentos funcionais, suplementos dietéticos, dentre outras utilizações. Até o momento, não há usos aprovados para frações de fucoidana em aplicações biomédicas, quer nos biomateriais, quer através de administração direta (intravenosa, intraperitoneal, intramuscular ou subcutânea). No entanto, a pesquisa sobre o uso de fucoidanas na administração de fármacos, biomateriais, como agente tópico, como agente utilizado para uma variedade de patologias, incluindo o câncer, e como potencial agente imunostimulante ou modulador do microambiente tumoral, é promissor (FITTON et al., 2015).

Neste trabalho demonstramos que os PS da alga parda *Dictyota caribaea* (DCA F9) ativaram macrófagos *in vitro* para fenótipo anti-tumoral. Esse é o primeiro trabalho a demonstrar o potencial imunostimulante de PS da alga parda *Dictyota Caribaea*. Em relação ao contexto do tumor, os macrófagos são cada vez mais reconhecidos como reguladores fundamentais do microambiente tumoral. Ao exercer funções distintas, essas células podem afetar significativamente o curso do desenvolvimento do tumor (LEWIS & POLLARD, 2006; WEBER et al, 2016; YAMAGUCHI et al, 2015; LUNDHOLM et al, 2015; ALMATROODI et al, 2015). Em vários tipos de câncer, os maiores níveis de TAMs estão associados a um pior prognóstico do paciente (TAN et al, 2005; FORSELL, 2007; JUNG et a, 2015).

Os macrófagos infiltrados no tumor são imunorreguladores e suprimem as respostas imunes aos antígenos derivados de tumores. No entanto, em algumas circunstâncias particularmente com intervenções terapêuticas adequadas, os macrófagos podem ser antitumorais causando morte direta de células cancerígenas, remoção de suporte vital pela inibição da angiogênese ou pela ativação de células T. Esta polarização diferencial está sob o controle de muitos estímulos endógenos ou exógenos que alteram o estado diferenciado dos macrófagos (PYONTECK et al., 2013; SU et al., 2014). As intervenções terapêuticas podem re-educar essas células para se tornar macrófagos imunostimuladores que, por si só, podem causar regressão tumoral ou que melhoram a atividade de quimioterapia ou imunoterapias. Trabalhos já demonstraram a re-educação dos macrófagos M2 para um fenótipo semelhante a M1 (M1-like), podendo vir a se tornar

adjuvantes nos tratamentos antitumorais (DE PALMA E LEWIS, 2013, SICA E MANTOVANI, 2012; FUJIWARA et al., 2011).

Alguns estudos já mostram que algas pardas, incluindo a *Dictyota caribaea*, produzem diterpenos, metabólitos primários, com atividade citotóxica contra células tumorais (GEDARA et al., 2003; ABOU-EL-WAFA et al., 2013). Contudo, no presente estudo, os PS da alga *Dictyora caribaea* não apresentaram citotoxicidade nas concentrações até 250 µg/mL frente à linhagem de melanoma murino B16-F10 durante tratamento de 48h utilizando o ensaio do SRB (dados não apresentados). Isto demonstra que os metabólitos secundários produzidos pela *D. caribaea* não são responsáveis por tal atividade citotóxica encontrada em metabólitos primários da mesma espécie. A atividade antitumoral com ausência de citotoxicidade direta de PS contra células tumorais já é relatada, sugerindo que o efeito antitumoral se deve a modulação de células imunes do microambiente tumoral (LIU et al., 2007; SCHEPETKIN & QUINN, 2006).

Estudos anteriores do nosso grupo mostram redução de 50% no crescimento do Sarcoma 180 em camundongos tratados com DCA F9 acompanhado de aumento do baço (ASSEF, 2015). Ainda foi demonstrado que o tratamento com DCA F9 causou uma desorganização da arquitetura esplênica com hiperplasia das polpas branca e vermelha, havendo uma mistura entre as mesmas. As alterações observadas sugerem que a DCA F9 apresentou um efeito potencializador da resposta imune desses indivíduos. Além disso, não foi verificada citotoxicidade contra linhagem de câncer colorretal (HCT-116) *in vitro*. (ASSEF, 2015).

Resultados semelhantes já foram encontrados para alginato obtido da alga parda *Sargassum vulgare* (SOUSA et al., 2007) e para polissacarídeos extraídos de algas vermelhas e de plantas (ZHOU et al., 2004; LINS et al., 2009; SILVA et al., 2012). Por outro lado, polissacarídeos do fungo *Pleurotus ostreatus* também demonstraram inibição da proliferação celular *in vitro* e efeito antitumoral *in vivo* (CAO et al., 2015).

Nos últimos 50 anos, a triagem de drogas anticâncer têm-se baseado em ensaios de citotoxicidade usando linhagens de células tumorais as quais exibem um fenótipo de crescimento rápido e incessante (MOFFAT, 2014). Porém várias estratégias de imunoterapia vêm sendo investigadas, principalmente nos cânceres do tipo melanoma. Apesar de não terem apresentado citotoxicidade, os PS da alga *Dictyota caribaea* foram capazes de ativar macrófagos RAW 264.7 nas concentrações de 10 a 250 µg/mL. Este resultado foi evidenciado pela detecção indireta de NO através da mensuração de nitrito nos sobrenadantes pelo teste do Griess. Semelhantemente, Nakamura e colaboradores

demonstraram que uma fucoïdana comercial pode induzir a produção de NO por macrófagos murinos RAW 264.7 nas concentrações de 25 a 100 µg/mL e Teruya e colaboradores também reportaram que fucoïdanas obtidas da alga *Laminaria angustata* induzem a produção de NO por RAW 264.7 nas concentrações de 50 a 400 µg/mL (NAKAMURA et al., 2006; TERUYA et al., 2010).

A maioria dos ensaios para avaliar a produção de NO   por meio de métodos indiretos. Nitrito e nitrato podem ser medidos a partir de uma variedade de fluidos biológicos. Um ensaio colorimétrico relativamente simples e conhecido há muito tempo, baseado na reação de Griess, é um dos mais utilizados para mensuração de nitrito. Esse ensaio tem a vantagem de ser rápido e de baixo custo, além de possuir uma extensa literatura que corroboram os resultados (CSONKA et al, 2014). Alguns trabalhos já demonstraram que diversos polissacarídeos de algas têm efeito imunoestimulante, incluindo polissacarídeos sulfatados como as fucoïdanas encontradas em algas pardas que apresentam potente atividade estimuladora da produção de NO (MAEDA et al., 2012; YIN et al., 2014; NAKANO et al., 2012; CAO; LEE; YOU, 2014; UMAPOORANI et al., 2016).

A incubação de células B16-F10 foi feita com meio condicionado de macrófagos murinos RAW264.7 estimulados *in vitro* previamente com LPS ou PS da *Dictyota caribaea* (E.B DCA, DCA F9, DCA F80 e DCA F300). O tratamento por 48h resultou em inibição de aproximadamente 10 a 20% da proliferação das células de melanoma. O MC DCA F9 foi capaz de inibir o crescimento tumoral em todas as concentrações testadas e foi o que mais se assemelhou   inibição do MC LPS 100 ng/mL, não apresentando diferenç a ($p < 0,05$) nas concentrações de 100 e 250 µg/mL quando comparados ao MC LPS.

Outros estudos mostram que fucoïdanas podem mediar a liberação de NO por macrófagos estimulados no microambiente tumoral, causando assim apoptose das células, além de os sobrenadantes de macrófagos estimulados por fucoïdnas serem capazes de levar as células de Sarcoma 180   apoptose (TAKEDA et al., 2012). Semelhantemente, Maeda e colaboradores mostraram que PS da alga verde *Caulerpa lentillifera* aumentaram a produção de NO em macrófagos murinos RAW264.7 (MAEDA et al., 2012). Neste trabalho foi observada a produção de NO por macrófagos quando estimulados por LPS. A produção de NO por lipopolissacarídeos bacterianos já foi demonstrada como estado de ativação de macrófagos com fenótipo M1 (MANTOVANI et al., 2002). Apesar do LPS ser um potente ativador da resposta imunológica e servir

como excelente controle positivo dos experimentos, a sua alta toxicidade torna o seu uso clínico limitante. O choque séptico na sepse pode ser induzido pelas altas concentrações de LPS no sangue (COOPER et al, 1971; TAVEIRA et al., 1993; PINTO et al, 2003).

O NO é uma molécula altamente instável sendo convertido rapidamente em nitrito, seu produto estável. No presente trabalho, o nitrito encontrado no meio condicionado de macrófagos estimulados foi avaliado quanto sua possível ação antiproliferativa. No entanto, essa inibição não se deu por ação do nitrito, já que este não apresentou qualquer inibição até 20 μM , equivalente a aproximadamente o dobro concentração contida no teste com o MC DCA (dados não apresentados). Uma vez que o NO é tóxico em altas concentrações, não podemos descartar a possibilidade de inibição de crescimento ainda maior de células tumorais. Uma possibilidade para comprovar isso e avaliar os demais fatores envolvidos na resposta de macrófagos, seria a realização de um experimento *in vitro* de co-cultura de macrófagos e células tumorais.

A DCA F9 foi a fração que apresentou maior rendimento (~40%) dentre as demais frações, além de ser a mais abundante.. Também apresentou efeito imunoestimulante sobre macrófagos murinos que após estimulados por DCA F9 nas concentrações de 100 e 250 $\mu\text{g/mL}$, demonstrou o maior efeito antiproliferativo sobre células de melanoma murino B16-F10. Além disso, apresentou semelhante inibição àquela causada pelo MC LPS 100 ng/mL. Devido a esse conjunto de características, esta foi a fração selecionada para avaliarmos melhor os efeitos nas células tumorais *in vitro*.

Macrófagos ativados são capazes de produzir citocinas. As citocinas são moléculas de sinalização que controlam a homeostase no organismo através da diferenciação celular, proliferação e apoptose, além de regular as funções de defesa, incluindo a resposta imune (PARK et al., 2013). Para estudar a ativação de macrófagos murinos por DCA F9, foi avaliada a produção de uma citocina pró-inflamatória. No presente estudo, a DCA F9 nas concentrações de 100 e 250 $\mu\text{g/mL}$ induziu o aumento da produção do fator de necrose tumoral α (TNF- α) por macrófagos. O LPS 100 ng/mL foi utilizado como controle positivo e aumentou significativamente a produção de TNF- α ($p < 0,05$). O TNF- α é um citocina inflamatória liberada em grandes concentrações por macrófagos M1. Ele é conhecido por induzir a apoptose das células tumorais (VACULOVÁ et al, 2002; TAKEDA et al., 2012 SENTHILKUMAR et al, 2013).

Por isto, é possível sugerir que essa inibição causada pelo MC de macrófagos em células tumorais se dê, pelo menos em parte por esta citocina. A produção de NO e TNF- α em conjunto são responsáveis pela maioria das respostas contra

patógenos, incluindo células tumorais (KLIMP et al., 2002). De acordo com nossos resultados, que mostraram produção das citocinas pró-inflamatórias, outros grupos também mostraram que MC LPS apresentam polarização M1. Além dos altos níveis de citocinas pró-inflamatórias produzidas, como IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α , exibiram atividades inibitórias de crescimento em células de adenocarcinoma do cólon humano *in vitro* (DUMONT et al, 2008; POLLI et al, 2016). O polissacarídeo sulfatado da alga parda *Ascophyllum nodosum* tem capacidade de estimular a produção de TNF- α , NO e G-CFS em macrófagos murinos RAW264.7 *in vitro* (JIANG et al., 2013).

Embora os macrófagos murinos tenham produzido citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α em resposta à estimulação com DCA F9, essas células também produziram IL-10 quando estimuladas com DCA F9 100 e 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A citocina IL-10 é uma das citocinas produzidas por TAMs M2-like no microambiente tumoral capazes de promover a inibição da resposta imune antitumoral. Alguns trabalhos sugerem que a ativação da sinalização TLR4 em TAMs estimula uma maior liberação de IL-10. Além disso, a correlação positiva entre os níveis séricos de IL-10 e a progressão tumoral, bem como a localização da IL-10 em metástases avançadas propõem que essa citocina tem um papel crucial no microambiente do tumor (LIU et al., 2013). Contudo, alguns trabalhos já demonstram que sobrenadantes de macrófagos ativados foram capazes de produzir citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, como IL-10, porém mostram que o fenótipo adquirido pelos macrófagos após ativação era semelhante ao M1, conhecido como antitumoral (POLLI et al, 2016; LIU et al., 2017). Para as fucanas sulfatadas obtidas da alga *Agarum cribrosum*, Cho e colaboradores observaram um significativo aumento da produção de óxido nítrico, além da liberação de IL-10 em consequência da ativação do Fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κB) em culturas de células RAW 264.7 (CHO et al., 2014). No presente estudo é possível que os macrófagos murinos, apesar de terem aumentado a produção de IL-10, tenham sido estimulados para o fenótipo M1 clássico ou para um fenótipo intermediário próximo de M1. De fato, nos tumores humanos e experimentais, os macrófagos não apresentaram fenótipos únicos, expressando tanto marcadores M1 como M2 (LEWIS & POLLARD, 2006, VAN GINDERACHTER, 2006). Os macrófagos que expressam altos níveis de NO (marcador M1) e arginase-1 (marcador M2) foram descritos em modelos *in vivo* de carcinoma de cólon e sarcoma (KUSMARTSEV & GABRILOVICH, 2005). Portanto, a distinção entre macrófagos M1 e M2 representa extremos que não refletem o espectro total de fenótipos que os macrófagos podem adotar (SICA & MANTOVANI, 2012).

A manipulação do MIT vem surgindo como alvo de novas terapias anti-câncer. Dentre os diferentes tipos de estratégias que utilizam os TAMs como alvos terapêuticos podem ser citados a depleção de TAMs em tumores, a inibição do recrutamento de monócitos presentes na circulação (leucócitos precursores de macrófagos) e a ativação dos TAMs direcionando-os para fenótipos antitumorais (semelhantes a M1), estratégia de “reeducação” dos TAMs (ALLAVENA & MANTOVANI, 2012). Os macrófagos que têm seu fenótipo re-educado para o M1 podem potencializar a terapia do câncer, e, devido a isso, os TAMs têm sido cada vez mais evidenciados como alvo para a terapia antitumoral (SHIME et al, 2012; CAI et al, 2012; PYONTECK et al, 2013; HERMANO et al, 2014; LIU & CAO, 2015; YANG & ZANG, 2017).

O melanoma é muito resistente aos quimioterápicos atuais e, nos estágios avançados da doença, os índices apoptóticos são muito baixos (SOENGAS e LOWE, 2003). Dando continuidade ao estudo do mecanismo de ação da DCA F9 frente à linhagem de melanoma murino B16-F10, os resultados da análise por citometria de fluxo mostraram uma redução do número de células tratadas com o MC DCA F9 10, 100 e 250 µg/mL quando comparado com o controle negativo (MC Salina).

Além disso, o MC DCA F9 não causou danos à membrana celular em nenhuma das concentrações testadas. Porém foram observados aumentos das populações de células com tamanho reduzido e de células com alta granulosidade. A apoptose é um dos principais mecanismos pelo qual os agentes quimioterápicos do câncer matam as células. Marcadores de DNA hidrofílicos de elevado peso molecular, como iodeto de propídio, não são passíveis de penetrar na célula intacta em decorrência do seu tamanho, bem como não marcam células apoptóticas sem que estas apresentem alterações na permeabilidade da membrana plasmática, como ocorre nos estágios finais da apoptose (VAN ENGLAND et al., 1998; WILLINGHAM, 1999).

Análises precisas e quantificação confiável de células apoptóticas são possíveis através de abordagens citofluorimétricas, tirando vantagens das múltiplas alterações celulares que ocorrem durante a apoptose (NICOLETTI et al, 1991; PETIT et al, 1995). Por exemplo, a redução do volume celular e o aumento da granularidade celular de células apoptóticas modificam suas propriedades de dispersão de luz, isto é, os parâmetros de dispersão direta (FSC) e dispersão lateral (SSC), respectivamente (BROWN et al, 1993).

O encolhimento de células devido à desidratação pode ser detectado em estágios iniciais da apoptose como uma diminuição na intensidade do sinal de dispersão de luz direta (FSC) (ORMEROD et al., 1995, SWAT et al., 1981). Algumas fucanas exibem atividade anti-proliferativa através de vários mecanismos, tais como a indução de parada do ciclo celular, apoptose e ativação do sistema imune. Com relação a isso, atividades como a indução de inflamação através do sistema imunitário, o stress oxidativo e mobilização de células tronco foram relatados por estarem ligadas a essas propriedades anti-cancerosas (KWAK-KIM et al., 2014).

A autofagia é outro mecanismo de morte celular que pode ser induzido em células tumorais com intuito de eliminá-las. A autofagia é um processo importante para manutenção da homeostase de todas as células, pois remove proteínas e organelas defeituosas. Nas situações de insuficiência de nutrientes ou estresse metabólico, a autofagia pode ser acionada para degradar proteínas e organelas celulares, com o objetivo de manter a homeostase celular. O processo autofágico tem início com a formação de vesículas de membrana, denominadas autofagossomos, que englobam partículas citoplasmáticas. A presença dessas vesículas são características inerentes às células em processos autofágicos. Os autofagossomos fundem-se a lisossomos, formando os autofagolisossomos responsáveis pela degradação e reciclagem do material celular (OZPOLAT & BENBROOK, 2015; YANG et al, 2011). A autofagia pode estar relacionada a supressão de células tumorais pela inibição da proliferação celular, podendo levar à morte das células e, conseqüente, à inibição e regressão do crescimento tumoral caso seja superestimada (YANG et al., 2011). A degradação autofágica pode levar à morte celular associada apoptose (OZPOLAT & BENBROOK, 2015). Os resultados obtidos sugerem apoptose inicial e/ou autofagia após tratamento de 48h com a amostra, embora sejam necessários outros experimentos para elucidar o mecanismo de ação da DCA F9.

Neste trabalho, o MC DCA F9 também foi capaz de causar uma redução de células na fase G2/M do ciclo celular (Figura 18), assim como a doxorrubicina, que causa uma redução nas fases de síntese (S) e G2 e mitose (M). O mecanismo de citotoxicidade de muitos agentes anticâncer convencionais é baseado no dano de DNA e subsequente indução de apoptose. No entanto, as células tumorais também podem responder a agentes capazes de desacelerar o ciclo celular, sendo conhecidos como agentes citostáticos. Estes compostos não matam células cancerosas, mas impedem que essas células se proliferem (RIXE; FOJO, 2007).

A maioria dos agentes anticâncer convencionais tem potencial citostático e citotóxico. A citostaticidade pode ser o passo inicial para diferentes mecanismos de morte celular em que a duração da parada da mitose não está necessariamente correlacionada com a probabilidade de morte (WEISSENSTEIN et al., 2014). Estudos têm mostrado que polissacarídeos podem induzir arrasto do ciclo celular em diferentes fases (ALVES et al., 2012; DORE et al., 2012). A heterofucana denominada fucana B da alga *Spatoglossum schröderi* promoveu arrasto do ciclo celular em G1 (NOBRE et al., 2013). Segundo Rixe e Fojo, existem evidências de que agentes citostáticos puros talvez não existam. No entanto, agentes que causam uma resposta citostática podem apresentar um efeito citotóxico ou escape celular da parada. Como exemplos eles citam diversos agentes quimioterápicos que apresentam um misto de ações, como a daunorrubicina, um inibidor de topoisomerase II, que em baixas concentrações apresenta um efeito citostático, levando a célula a uma parada do ciclo em G2/M, e em altas concentrações demonstra um efeito citotóxico com parada em G1 e S (RIXE & FOJO, 2007). O paclitaxel (taxol) um agente mitótico com ação antagonista a despolimerização de microtúbulos capaz de inibir a formação do apropriado fuso mitótico, não é capaz, de forma direta, de causar citotoxicidade (ALMEIDA et al., 2005; BRANDÃO et al., 2010). Por meio da interferência na dinâmica dos microtúbulos, o taxol e outros agentes mitóticos levam a parada da célula na fase M (mitose). A parada em mitose é uma condição pouco tolerada pelas células que, conseqüentemente desviam para uma via de morte, gerando uma atividade citotóxica indireta do taxol (RIXE & FOJO, 2007).

Finalmente, foram avaliados os efeitos das associações de quimioterápico com DCA F9 ou MC DCA F9 na proliferação de B16-F10 (Figura 19). As associações de DOX nas concentrações da sua CI_{50} e $\frac{1}{2}$ da CI_{50} com DCA F9, mas não com MC DCA F9, aumentaram o efeito antiproliferativo desse quimioterápico quando comparados com o controle negativo (salina). Esse tipo de interação já foi demonstrada com polissacarídeos sulfatados de fungos (PSK) que já são utilizados na clínica no continente Asiático (SUN et al., 2012; FRITZ et al., 2015; NAMIKAWA et al., 2015). No contexto da busca por substâncias não citotóxicas e imunoestimulantes, os PS de algas podem ser fortes candidatos para associação com quimioterápicos para redução de efeitos colaterais e melhora da eficácia dos mesmos. As fucoidanas já são relatadas na literatura como adjuvantes orais utilizados durante ou após a quimioterapia convencional. Muitos estudos, utilizando modelos *in vitro*, têm demonstrado o efeito de sinergismo das fucoidanas com os quimioterápicos. Zhang e colaboradores mostraram o efeito de

sinergismo de uma fucoídiana de alga parda com três quimioterápicos (Cisplatina, Tamoxifeno e Paclitaxel) em duas linhagens de câncer de mama (MDA-MB-231 e MCF-7) (ZHANG et al., 2013). Em outro tipo de câncer, células linfoides malignas foram pré-tratadas com fucoídiana e em seguida foi realizado o tratamento com o quimioterápico etoposídeo, aumentando consideravelmente a eficácia deste (PHILCHENKOV et al., 2007). As fucoídanas são conhecidas por interferir a ligação de um receptor celular CXCR4 com uma quimiocina CXCL12 (SWEENEY et al., 2002; FERMAS et al., 2008). A ligação desses receptores pode ser crítica para o estabelecimento, crescimento e metastatase de tumores, de modo que a prevenção dessa ligação pode ajudar na inibição do câncer. Frações de fucoídanas podem ligar-se a CXCL12 e assim prevenir a ligação com CXCR4 e impedir a secreção de enzimas que degradam a matriz extracelular, responsáveis pela metastatização (SCHNEIDER et al., 2015). Nossos resultados sugerem que além de um efeito imunomodulador, a DCA F9 exibe um efeito de sinergismo com o quimioterápico utilizado (doxorubicina) no ensaio antiproliferativo *in vitro*. Esses efeitos são desejáveis e de alta relevância na utilização da fração polissacarídica sulfatada utilizada neste trabalho em outros modelos *in vivo*.

Estudos sobre a regulação das funções e dos fenótipos dos TAMs são indispensáveis para o desenvolvimento de estratégias antitumorais inovadoras, além da possibilidade de utilizar substâncias com baixa ou insignificante toxicidade como adjuvante nos tratamentos convencionais do câncer.

Os achados deste trabalho mostram o potencial imunoestimulante de polissacarídeos sulfatados obtidos da alga parda *D. caribaea* através da ativação de macrófagos *in vitro*. O efeito antitumoral *in vivo* da DCA F9 (Assef, 2015) pode ser, pelo menos em parte, devido a ativação dos macrófagos. Além disso, observamos de forma preliminar, o efeito sinérgico na citotoxicidade em células B16-F10 de quimioterápico antitumoral quando em associação com DCA F9. Este trabalho amplia as perspectivas de novos estudos afim de elucidar os mecanismos envolvidos nestas atividades.

6 CONCLUSÕES

- PS da alga *Dictyota caribaea* (DCA) não apresentaram citotoxicidade contra células de melanoma metastático murino B16-F10 *in vitro*;

- A fração polissacarídica DCA F9, assim como as demais frações e o extrato bruto, foram capazes de ativar macrófagos murinos RAW264.7 *in vitro*;
- Macrófagos murinos estimulados por DCA F9 nas concentrações 100 e 250 µg/mL produziram citocinas TNF- α e IL-10;
- MC DCA F9 foram capazes de inibir a proliferação de células de melanoma metastático murino B16-F10, bem como causar alterações morfológicas e lentificar o ciclo celular;
- DCA F9 em associação com o quimioterápico doxorrubicina aumenta a resposta antitumoral deste contra células de melanoma metastático murino B16-F10 *in vitro*.

Em conjunto, esses resultados evidenciam que a DCA F9 tem capacidade de ativar macrófagos para um fenótipo antitumoral, podendo modular o microambiente tumoral. Além disso, ainda não há trabalhos relatando o efeito imunoestimulante de polissacarídeos sulfatados da *Dictyota caribaea*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOU-EL-WAFA, G. S. E.; SHAABAN, M.; SHAABAN, K. A.; EL-NAGGAR, M. E.E.; MAIER, A.; FIEBIG, H.; LAATSCH H. Pachydictyols B and C: New Diterpenes from *Dictyota dichotoma* Hudson. *Mar Drugs*. v11(9), p 3109–3123, 2013

ACKLAND, M. L.; NEWGREEN, D. F.; FRIDMAN, M. et al. Epidermal growth factor stimulates epithelio-mesenchymal transition in the stable human breast carcinoma cell line variant PMC42-LA. *Lab Invest*. v83, p 435-48, 2003

ALVES, A. P.; MULLOY, B.; DINIZ, J. A.; MOURÃO, P. A. S. Sulfated polysaccharides from the egg jelly layer are species-specific inducers of acrossomal reaction in sperm of sea urchins. *J. Biol. Chem*. V. 272, p. 6965-6971, 1997.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Atlanta: American Cancer Society**, 2016.

ALEKSEYENKO, T.V.; ZHANAYEVA, S.Y.; VENEDIKTOVA, A.A.; ZVYAGINTSEVA, T.N.; KUZNETSOVA, T.A.; BESEDNOVA, N.N.; KOROLENKO, T.A. Antitumor and antimetastatic activity of fucoidan, a sulfated polysaccharide isolated from the Okhotsk Sea *Fucus evanescens* brown alga. *Bull. Exp. Biol. Med*. v143, 730–732, **2007**.

ALE, M.T.; MARUYAMA, H.; TAMAUCHI, H.; MIKKELSEN, J.D.; MEYER, A.S. Fucoidan from *Sargassum* sp. and *Fucus vesiculosus* reduces cell viability of lung carcinoma and melanoma cells *in vitro* and activates natural killer cells in mice *in vivo*. *Int. J. Biol. Macromol*. v49, p 331–336, 2011

ALMATROODI, S. A.; MCDONALD, C. F.; DARBY, I. A.; POUNIOTIS, D. S. Characterization of M1/M2 tumour-associated macrophages (TAMs) and Th1/Th2 cytokine profiles in patients with NSCLC. *Cancer Microenvironment*, v9, p 1-11, 2015.

ALMEIDA, V. L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclocelular não-específicos que interagem com o DNA: Uma Introdução. *Química Nova*, v28, n.1, p.118-129, 2005.

AQUINO, R. S. et al. Occurrence of sulfated galactans in marine angiosperms. Evolutionary implications. *Glycobiology*, v. 15, n. 1, p. 11-20, 2005.

ASSEF, A. N. B. Avaliação Do Potencial Anticâncer De Uma Fração Polissacarídica Sulfatada Extraída Da Alga Marinha Parda *Dictyota caribaea* Em Camundongos. Defesa de monografia em 04/07/2015; manuscrito em desenvolvimento.

AZUMA, K.; ISHIHARA, T.; NAKAMOTO, H.; AMAHA, T.; OSAKI, T.; TSUKA, T.; IMAGAWA, T.; MINAMI, S.; TAKASHIMA, O.; IFUKU, S.; MORIMOTO, M.; *et al*. Effects of oral administration of fucoidan extracted from *Cladosiphon okamuranus* on tumor growth and survival time in a tumor-bearing mouse model. *Mar. Drugs*. v10, p 2337–2348, 2012

BARAHONA, T.; CHANDÍA, N. P.; ENCINAS, M. V.; MATSUHIRO, B.; ZÚÑIGA E. A. Antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from seaweeds. A kinetic approach. *Food Hydrocoll.*, 25, pp. 529–535, 2011.

BERLINCK, R.G.S.; HAJDU, E.; ROCHA, R.M.; OLIVERIA, J.H.L.L.; HERNANDEZ, I.L.C.; SELEGHIM, M.H.R.; GRANATO, A.C.; ALMEIDA, E.V.R.; NUÑEZ, C.V.; MURICY, G.; PEIXINHO, 136 S.; PESSOA, C.; MORAES, M.O; CAVALCANTI, B.C.; NASCIMENTO, G.F.; THIEMANN, O.H.; SILVA, M. Challenges and rewards of research in marine natural products chemistry in Brazil. **Journal of Natural Products**, v.67, p. 510-522, 2004.

BERTEAU, O.; MULLOY, B. Sulfated fucans, fresh perspectives: Structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active towards this class of polysaccharide. **Glycobiology** v13, p 29–40, 2003

BISWAS, S. K.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. **Nat Immunol.** v11 (10), p 889-896, 2010.

BITTNER, L.; PAYRI, C.E.; COULOUX, A.; CRUAUD, C.; REVIERS, B.; ROUSSEAU, F. Molecular phylogeny of the Dictyotales and their position within the Phaeophyceae, based on nuclear, plastid and mitochondrial DNA sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 49, p.211–226, 2008.

BOUHLAL, R.; HASLIN, C.; CHERMANN, J.C.; COLLIEC-JOUAULT, S.; SINQUIN, C.; SIMON, G.; CERANTOLA, S.; RIADI, H.; BOURGOUGNON, N. Antiviral activities of sulfated polysaccharides isolated from *Sphaerococcus coronopifolius* (Rhodophyta, Gigartinales) and *Boergeseniella thuyoides* (Rhodophyta, Ceramiales) **Mar. Drugs**, v9, pp. 1187–1209, 2011

BRANDÃO, H. N. et al. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v33 (6), p 1359-1369, 2010.

BROWN, D. G.; SUN, X. M.; COHEN, G. M. Dexamethasone-induced apoptosis involves cleavage of DNA to large fragments prior to internucleosomal fragmentation. **J Biochem Chem**, v 268, p 3037-9, 1993.

BULA-MEYER, G. Notas sobre Dictyota pfaffiiy D. humifusa (Dictyotales, Phaeophyta). **Anales del Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras**, Punta Betin, v23, p 177-181, 1994.

CAI, X.; YIN, Y.; LI, N. et al. Re-polarization of tumor-associated macrophages to pro-inflammatory M1 macrophages by microRNA-155. **Journal of Molecular Cell Biology**, v4, no. 5, p 341–343, 2012.

CAO, R.; LEE, Y.; YOU, S. Water soluble sulfated-fucans with immune-enhancing properties from Ecklonia cava. **International Journal of Biological Macromolecules**. v67, p 303-311, 2014.

CAO, X-Y; LIU, J-L; YANG, W.; HOU, X.; LI, Q-J. Antitumor activity of polysaccharide extracted from Pleurotus ostreatus mycelia against gastric cancer in vitro e in vivo. **Molecular Medicine Reports**. v12(2), p 2383-2389, 2015.

CARDOZO, K. H. M.; GUARATINI, T.; BARROS, M. P.; FALCÃO V. R.; TONON, A. P. et al. Metabolites from algae with economical impact. **Comp Biochem Physiol**, Part C.; 146: 60-78, 2007.

CARVALHO, S.; LEVI-SCHAFFER, F.; SELA, M. et al. Immunotherapy of câncer: From monoclonal to oligoclonal cocktails of anticâncer antibodies: IUPHAR Review 18. **British Journal of Pharmacology**. V173 (9), p 1407-1424, 2016.

CASEY, S. C.; AMEDEI, A.; AQUILANO, K.; AZMI, A. S.; BENENCIA, F.; BHAKTA, D.; BILSLAND, A. E.; BOOSANI, C. S.; CHEN, S.; CIRIOLO, M. R.; CRAWFORD, S.; FUJII, H.; GEORGAKILAS, A. G.; et al. Cancer prevention and therapy through the modulation of the tumor microenvironment. **Semin Cancer Biol.** v10, p 1044-79, 2015

CASEY, S. C.; LI Y.; FAN, A. C.; FELSHER, D.W. Oncogene withdrawal engages the immune system to induce sustained cancer regression. **J Immunother Cancer**, v2, p 24, 2014.

CHAN, L.W.; LEE, H.Y.; HENG, P.W.S. Production of alginate microspheres by internal gelation using an emulsification method. **International Journal of Pharmaceutics**, 242 (1-2) 259-262, 2002.

CHEN, Y.; ZHANG, S.; WANG, Q.; ZHANG, X. Tumor-recruited M2 macrophages promote gastric and breast cancer metastasis via M2 macrophage-secreted CHI3L1 protein. **J Hematol Oncol.** v10, p 36, 2017

CHO, M.; LEE, D.; KIM, J.; YOU, S. Molecular characterization and immunomodulatory activity of sulfated fucans from *Agarum cribrosum*. **Carbohydrate Polymers**, v113, p 507-514, 2014.

CIANCIA, M.; QUINTANA, I.; CEREZO, A. S. Overview of anticoagulant activity of sulfated polysaccharides from seaweeds in relation to their structures, focusing on those of green seaweeds. **Curr. Med. Chem.**, 17, pp. 2503–2529, 2010

COOPER, J. F.; LEVIN, J.; WAGNER JR, H.N. Quantitative Comparison of in vitro and in vivo Methods for the Detection of Endotoxin. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 78, p. 138-145, 1971;

COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N., MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. Rev. **Virtual Quim.**, 2 (1), 47-58, 2010.

COSTA-LOTUFO, L.V.; WILKE, D.V.; JIMENEZ, P.C.; EPIFÂNIO, R.A. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos - histórico & perspectivas. **Química Nova**, v.32, p. 703-716, 2009.

COUSSENS, L. M.; ZITVOGEL, L.; PALUCKA, A. K. Neutralizing tumor-promoting chronic inflammation: a magic bullet? **Science**. v339(6117), p 286-91, 2013.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects**. v1830(6), p 3670-95, 2013

CSONKA, C.; PÁLI, T.; BENCSIK, P.; GÖRBE, A.; FERDINANDY, P.; CSONT, T. Measurement of NO in biological samples. **British Journal of Pharmacology**. v172, p 1620-1632, 2014.

DE CLERCK, O.; LELIAERT, F.; VERBRUGGEN, H.; LANE, C. E.; DE-PAULA, J. C.; PAYO, D. A.; COPPEJANS, E. A revised classification of the Dictyoteae (Dictyotales, Phaeophyceae) based on rbcL and 26s ribosomal DNA sequence analyses. **Journal of Phycology**, v42, p 127–1288, 2006.

DENG YR, LIU WB, LIAN ZX, Li X, HOU X. Sorafenib inhibits macrophage-mediated epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. **Oncotarget**.v7, p 38292–305, 2016

DE PALMA, M., and LEWIS, C.E. Macrophage regulation of tumor responses to anticancer therapies. **Cancer Cell**. v23, p 277–286. (2013).

DUMONT, P.; BERTON, A.; NAGY, N. et al. Expression of galectin-3 in the tumor immune response in colon cancer. **Laboratory Investigation**, v88, no. 8, p 896–906, 2008.

EL GAMAL, A. A. Biological importance of marine algae. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v.18, p. 1-25, 2010

FARIAS, W. R. L. et al. Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans. Isolation of a unique sulfated galactan from the red alga *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 38, p. 29299-29307, 2000.

FENICAL, W. Marine Pharmaceuticals: Past, Present, and Future. **Oceanography**, 19(2), 110119, 2006.

FERMAS, S.; GONNET, F.; SUTTON, A.; CHARNAUX, N.; MULLOY, B.; DU, Y.; BALEUX, F.; DANIEL, R. Sulfated oligosaccharides (heparin and fucoidan) binding and dimerization of stromal cell-derived factor-1 (sdf-1/cxcl 12) are coupled as evidenced by affinity ce-ms analysis. **Glycobiology**. v18, p 1054–1064, 2008

FIDLLER, I. J. The pathogenesis of cancer metastasis: The seed and soil' hypothesis revisited. **Nature Reviews Cancer**, 3, 453–458, 2003.

FITTON, J.H. Therapies from fucoidan; multifunctional marine polymers. **Mar. Drugs** , v9, p 1731–1760, 2011

FITTON, J. H.; STRINGER, D. N.; KARPINIEC, S. S. Therapies from Fucoidan: An Update. **Mar. Drugs**. v13, p 5920-5946, 2015.

FORSSELL, J.; ÖBERG, A.; HENRIKSSON, M. L.; STENLING, R.; JUNG, A.; PALMQVIST, R. High macrophage infiltration along the tumor front correlates with improved survival in colon cancer. **Clinical Cancer Research**, v13, no. 5, p 1472–1479, 2007.

FRIEDLANDER, M.; ZELEKOVICH, N. Growth rates, phycocolloid yield and quality of the red seaweeds, *Gracilaria* sp, *Pterocladia capillacea*, *Hypnea musciformis*, and *Hypnea cornuta*, in field studies in Israel. **Aquaculture**, Amsterdam, v.40, n.1, p.57-66, 1984.

GAJEWSKI, T. F.; SCHREIBER, H.; FU, Y. X. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nature Immunology* 14, 1014–1022, 2013.

GEDARA, R.; ZUBÍA, E.; ORTEGA, M.; EL-SHARKAVY, S.; SALAMA, O.; SHIER, T.; HALIM, A. Cytotoxic hydroazulene diterpenes from the brown alga *Dictyota dichotoma*. *Z. Naturforsch.* 58: 17–22, 2003.

GÓMEZ-ORDÓÑEZ, E.; JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; RUPÉREZ, P. Dietary fibre and physicochemical properties of several edible seaweeds from the northwestern Spanish coast. **Food Research International**, v. 43, p. 2289-2294, 2010.

GORDON, S.; TAYLOR, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* 5(12): 953-64, 2005. Gordon, S. Alternative activation of macrophages. **Nature Review Immunology**. v3 (1). p 23- 35, 2006.

GOYDOS, J. S.; MANN, B.; KI, H. J.; GABRIEL, E. M.; ALSINA, J.; GERMINO, F. J.; SHIH, W.; GORSKI, D. H. Detection of B-BRAF and N-RAS mutations in human melanoma. **J. AM Coll Surg** ., v. 200, n. 3, p. 362-370, 2005

GREEN, L. C.; TANNENBAUM, S. R.; GOLDMAN, P. Nitrate Synthesis in the Germfree and Conventional Rat. **Science**, 212, p. 56-58, 1981.

GUPTA, S.; ABU-GHANNAM, N. Recent developments in the application of seaweeds or seaweed extracts as a means for enhancing the safety and quality attributes of foods. **Innovat. Food Sci. Emerg. Tech.**, 12, pp. 600–609, 2011.

HSU, H.Y.; LIN, T.Y.; HWANG, P.A.; TSENG, L.M.; CHEN, R.H.; TSAO, S.M.; HSU, J. Fucoidan induces changes in the epithelial to mesenchymal transition and decreases metastasis by enhancing ubiquitin-dependent TGF β receptor degradation in breast cancer. **Carcinogenesis** , v34, p 874–884, 2013

HUNCHAREK M, CAUBET J. F, MCGARRY R. Single agent DTIC versus combination chemotherapy with or without immunotherapy in metastatic melanoma: a meta-analysis of 3273 patients from 20 randomized trials. **Melanoma Res.** 11:75-81, 2001.

HUNTER, M. M.; WANG, A.; PARHAR, K. S.; JOHNSTON, M. J.; ROOIJEN N.; BECK, P. L.; MCKAY, D.M. In vitro-derived alternatively activated macrophages reduce colonic inflammation in mice. **Gastroenterology**. v138 (4), p 1395-405, 2010.

HU, Y.; CHENG, S.C.; CHAN, K.T.; KE, Y.; XUE, B.; SIN, F.W.; ZENG, C.; XIE, Y. Fucoidin enhances dendritic cell-mediated T-cell cytotoxicity against NY-ESO-1 expressing human cancer cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v392, p 329–334, 2010

IKEGUCHI, M.; YAMAMOTO, M.; ARAI, Y.; MAETA, Y.; ASHIDA, K.; KATANO, K.; MIKI, Y.; KIMURA, T. Fucoidan reduces the toxicities of chemotherapy for patients with unresectable advanced or recurrent colorectal cancer. **Oncology letters**, v2. P. 319-322, 2011.

INCA – **Instituto Nacional do Câncer**, 2016

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER – **IARC**, 2016

JIANG, Z.; UENO, M.; NISHIGUCHI, T.; ABU, R.; ISAKA, S.; OKIMURA, T.; YAMAGUCHI, K.; ODA, T. Importance of sulfate groups for the macrophage-stimulating activities of ascophyllan isolated from the brown algae *Ascophyllum nodosum*. **Carbohydr Res.** v18 (380), p 124-129, 2013.

JIAO, G.; YU, G.; ZHANG, J.; EWART, H. S. Chemical Structures and Bioactivities of Sulfated Polysaccharides from Marine Algae. **Mar. Drugs**, v9, pp. 196–223, 2011

JIN, J.O.; PARK, H.Y.; XU, Q.; PARK, J.I.; ZVYAGINTSEVA, T.; STONIK, V.A.; KWAK, J.Y. Ligand of scavenger receptor class A indirectly induces maturation of human blood dendritic cells via production of tumor necrosis factor- α . **Blood**, v113, p 5839–5847, 2009

JOLY, C.A.; HADDAD, C.F.B.; VERDADE, L.M.; OLIVERIA, M.C.; BOLZANI, V.S.; BERLINCK, R.G.S. Diagnóstico da pesquisa em biodiversidade no Brasil. **Revista USP**, v.89, p. 114-133, 2011.

JUNG, K. Y.; CHO, S. W.; KIM, Y. A. et al. Cancers with higher density of tumor-associated macrophages were associated with poor survival rates. **Journal of Pathology and Translational Medicine**, v49, no. 4, p 318–324, 2015.

KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **J Clin Invest.** v119, p 1420-8, 2009

KARNJANAPRATUM, S.; YOU, S. Molecular characteristics of sulfated polysaccharides from *Monostroma nitidum* and their in vitro anticancer and immunomodulatory activities. **Int. J. Biol. Macromol.** V 48, p 311-318, 2011.

KENNY, P. A.; LEE, G. Y.; BISSELL, M.J. Targeting the tumor microenvironment. **Front Biosci**, v1, p 3468–74, 2007

KLIMP, A. H.; DE VRIES, E. G. E.; SCHERPHORF, G. L.; DAEMEN, T. A. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.** v44, p 143-161, 2002.

KOYANAGI, S.; TANIGAWA, N.; NAKAGAWA, H.; SOEDA, S.; SHIMENO, H. Oversulfation of fucoidan enhances its anti-angiogenic and antitumor activities. **Biochem. Pharmacol.**, v65, p 173–179, 2003

KWAK, J. Y. Fucoidan as a Marine Anticancer Agent in Preclinical Development. **Mar. Drugs.** v12(2), p 851-870, 2016.

KWAK-KIM, J. et al. Immunological Modes of Pregnancy Loss: Inflammation, Immune Effectors, and Stress. **American Journal of Reproductive Immunology**, v72, p 129-140, 2014.

KELECOM, A.; TEIXEIRA, V. L. Dolastane diterpenes from the marine brown alga *Dictyota cervicornis*. **Phytochemistry**, v27, p 2907-2909, 1988.

KENNY, P.A.; LEE, G. Y.; BISSELL, M. J. Targeting the tumor microenvironment. **Front Biosci**. v12, p 3468–74, 2007.

KERKAR, S.P.; RESTIFO, N. P. Cellular constituents of immune escape within the tumor microenvironment. **Cancer Res**, v72, p 3125–3130, 2012

KIM, K. J.; WEN, X. Y.; YANG, H.K.; KIM, W. H.; KANG, G. H. Prognostic implication of M2 macrophages are determined by the proportional balance of tumor associated macrophages and tumor infiltrating lymphocytes in microsatellite-unstable gastric carcinoma. **PLoS One**. v10, e0144192, 2015.

KIM, M.H.; JOO, H.G. Immunostimulatory effects of fucoidan on bone marrow-derived dendritic cells. **Immunol. Lett**. v115, p 138–143, 2008

KINGSTON, D. G. Modern natural products drug discovery and its relevance to biodiversity conservation. **J Nat Prod**. v74(3), p 496-511, 2011.

KONIG G. M, WRIGHT A. D, STICHER O, ANGERHOFER C. K, PEZZUTO J. M. Biological-activities of selected marine natural-products. **Planta Med** 60:532-537, 1994

KUSMARTSEV, S. & GABRILOVICH, D. I. STAT1 signaling regulates tumor-associated macrophage-mediated T cell deletion. **Journal of Immunology**, v174, no. 8, p. 4880–4891, 2005.

LEMIESZEK, M.; RZESKI, W. Anticancer properties of polysaccharides isolated from fungi of the Basidiomycetes class. **Contemp Oncol** 16(4). P. 285-289, 2012.

LEWIS, C. E. & POLLARD, J. W. “Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments,” **Cancer Research**, v66, no. 2, p. 605–612, 2006.

LINS K. O. A. L.; BEZERRA, D. P.; ALVES, A. P.N. N.; ALENCAR, N. M. N.; LIMA, M.W.; TORRES, V. M.; FARIAS, W. R. L.; PESSOA, C.; de MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V. Antitumor properties of a sulfated polysaccharide from the red seaweed *Champia feldmannii* (Diaz-Pifferer). **J. Appl. Toxicol.**, v29, pp. 20-26, 2009

LIU, C.; KLIN, Q.; GAO, Y.; YE, L.; XING, Y.; XI, T. Characterizations and antitumor activity of a polysaccharide from *Strongylocentrotus nudus* eggs. **Carbohydr. Polym**. v67, 2007.

LIU, C. Y.; XU, J. Y.; SHI, X. Y.; HUANG, W.; RUAN, T. Y.; XIE, P.; DING, J. L. M2-polarized tumor-associated macrophages promoted epithelial–mesenchymal transition in pancreatic cancer cells, partially through TLR4/IL-10 signaling pathway. **Laboratory Investigation**. v93, p 844–854, 2013

LIU, Y.; CAO, X. The origin and function of tumor-associated macrophages. **Cellular and Molecular Immunology**. v12, p 1-4. 2015.

LIU, Q.-M., XU, S.-S., LI, L., PAN, T.-M., SHI, C.-L., LIU, H., CAO, M.-J., SU, W.-J., AND LIU, G.-M. *In vitro* and *in vivo* immunomodulatory activity of sulfated polysaccharide from *Porphyra haitanensis*, **Carbohydrate Polymers**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.02.032>, 2017

LUCAS, T.; WAISMAN, A.; RANJAN, R.; ROES, J.; KRIEG, T.; MÜLLER, W.; ROERS, A.; EMING, S. A. Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair. **J Immunol**. v184(7), p 3964-77, 2010.

LUNDHOLM, M.; HÄGGLÖF, C.; WIKBERG, M. L. et al., Secreted factors from colorectal and prostate cancer cells skew the immune response in opposite directions. **Scientific Reports**, vol.5, Article ID 15651, 2015.

MAEDA, R.; IDA, T.; IHARA, H.; SAKAMOTO, T. Immunostimulatory Activity of Polysaccharides Isolated from *Caulerpa lentillifera* on Macrophage Cells. **Biosci. Biotechnol. Biochem**. v76(3), p 501–505, 2012.

MANTOVANI A. & ALLAVENA P. Immunology in the clinic review series; focus on cancer: tumour-associated macrophages: undisputed stars of the inflammatory tumour microenvironment. **Clinical Experimental Immunology** v167 (2), p 195-205, 2012.

MANTOVANI, A.; SICA, A.; LOCATI, M. Macrophage polarization comes of age. **Immunity**. v23 (4), p 344-346, 2005.

MANTOVANI, A.; SICA, A.; LOCATI, M. New vistas on macrophage differentiation and activation. **Europe Journal of Immunology**. v37 (1), p 14-16, 2007.

MANTOVANI, A.; SOZZANI, S.; LOCATI, M.; ALLAVENA, P.; SICA, A. Macrophage polarization: tumor associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Trends Immunology**. v23 (11), p 549-555, 2002

MARTINEZ, F. O., S. GORDON, M. LOCATI E A. MANTOVANI. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. **J Immunol**. v177 (10), p 7303-7311, 2006

MARTINS, A.; VIEIRA, H.; GASPAR, H.; SANTOS, S. Marketed marine natural products in the pharmaceutical and cosmeceutical industries: tips for success. **Marine Drugs**, v.12, p. 1066-1101, 2014.

MARUYAMA, H.; TAMAUCHI, H.; IIZUKA, M.; NAKANO, T. The role of NK cells in antitumor activity of dietary fucoidan from *Undaria pinnatifida* sporophylls (Mekabu). **Planta Med**. v72, p 1415–1417, 2006

MATHEWS, M. B. Polyanionic proteoglycans. In: *Connective Tissue: Macromolecular Structure and Evolution* Kleinzeller, Springer, G.F.; Witman, H.G. (eds). Berlin: Springer-Verlag, p.93-125, 1975

MELCHART, D.; CLEMM, C.; WEBER, B. DRACZYNSKI, T.; WORKU, F.; LINDE, K.; WEIDENHAMMER, W.; WAGNER, H.; SALLER, R. Polysaccharides Isolated from *Echinacea purpurea* herba Cell Cultures to Counteract Undesired Effects of Chemotherapy – a Pilot Study. **Phytother. Res.** 16, p. 138-142, 2002.

MILLS, C. D. M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease. **Crit Rev Immunol.** v32(6), p 463-88, 2012.

MILLS, C. D.; KINCAID, K.; ALT, J. M.; HEILMAN, M. J.; HILL, A. M. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. **Journal Immunology.** v164, p 6166–6173, 2000.

MOFFAT, J. G.; RUDOLPH, J.; BAILEY, D. Phenotypic screening in cancer drug discovery - past, present and future. **Nature Reviews.** v13(8), p 588-602, 2014

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nat Rev Immunol.** v 8(12), p 958-69, 2008.

MULLOY, B.; RIBEIRO, A. C.; ALVES, A. P.; VIEIRA, R. P.; MOURÃO, P. A. S. Sulfated fucans from echinoderms have a regular tetrasaccharide repeating unit defined by a specific patterns of sulfation at the O-2 and O-4 positions. **J. Biol. Chem.**, v. 289, p.22113-22123, 1994.

NAKAJIMA, T.; MORISHITA, Y. Adjuvant Therapy With Pretein-Bound Polysaccharide K and Tegafur Uracil in Patients With Stage II or III Colorectal Cancer: Randomized, Controlled Trial. **Dis Colon Rectum.** v. 46, no. 8, p.1060-1068, 2003.

NAKAMURA T, SUZUKI H, WADA Y, KODAMA T, AND DOI T. Fucoidan induces nitric oxide production via p38 mitogen-activated protein kinase and NF-κB-dependent signaling pathways through macrophage scavenger receptors. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v343, p 286–294, 2006.

NAMIKAWA, T.; FUKUDOME, I.; OGAWA, M.; MUNEKAGE, E; SHIGA, M.; MAEDA, H. et al. Clinical efficacy of protein-bound polysaccharide K in patients with gastric cancer undergoing chemotherapy with an oral fluoropyrimidine (S-1). **Euro. J. of Surg. Oncol.** v41(6), p795-800, 2015.

NARAZAKI, M.; SEGARRA, M.; TOSATO, G. Sulfated polysaccharides identified as inducers of neuropilin-1 internalization and functional inhibition of VEGF165 and semaphorin3A. **Blood** , v111, p 4126–4136, 2008

NA, Y. S.; KIM, W. J.; KIM, S. M.; PARK, J. K.; LEE, S. M.; KIM, S. O.; SYNITSYA, A.; PARK, Y. I. Purification, characterization and immunostimulating activity of water-soluble polysaccharide isolated from *Capsosiphon fulvescens*. **Int Immunopharmacol.** v 10, p 364-370, 2010)

NEWMAN D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **J Nat Prod.** v75(3), p 311-35, 2012

NICOLETTI, I.; MIGLIORATI, G.; PAGLIACCI, M. C. et al. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **J Immunol Methods**, v139, 271-9, 1991.

NOBRE, L.T.D.B. et al. Fucan effect on CHO cell proliferation and migration. **Carbohydrate Polymers**, 98: 224-232, 2013

NOVAK, M. L.; KOH, T. J. Phenotypic transitions of macrophages orchestrate tissue repair. **Am J Pathol**. v183(5), p 1352-63, 2013.

OH, B.; KIM, J.; LU, W.; ROSENTHAL, D. Anticancer effect of fucoidan in combination with tyrosine kinase inhibitor lapatinib. **Evid. Based Complement. Altern. Med.** 865375, doi:10.1155/2014/865375, 2014

OHWADA, S.; KAWATE, S.; IKEYA, T.; YOKOMORI, T.; KUSABA, T.; ROPPOGI, T.; TAKAHASHI, T.; NAKAMURA, S.; KAWASGIMA, Y.; ONUCHIC, A. C., CHAMMAS, R. Câncer e o microambiente tumoral. **Rev. Med (São Paulo)**. 89 (1), p. 21-31, 2010.

OLANO, C.; MÉNDEZ, C.; SALAS, J. A. Antitumor Compounds from Marine Actinomycetes. **Marine Drugs**, v7(2), p 210-248, 2009.

OOI, V. E. C. & LIU, F. Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide protein complexes. **Curr Med Chem** 7:715-729, 2000

Organização Mundial de Saúde (OMS). www.who.int.

ORMEROD, M. G.; CHEETHAM, F. P. M.; SUN, X. M. Discrimination of apoptotic thymocytes by forward light scatter. **Cytometry**. v21, p 300–304, 1995

OZPOLAT, B. & BENBROOK, D. M. Targeting autophagy in cancer management-strategies and developments. **Cancer Management Research**, v7, p. 291-299, 2015

PALUCKA, K.; BANCHEREAU, J. Dendritic-cell-based therapeutic cancer vaccines. **J. Immunity**. v39 (1), p 38-48, 2013

PARK, H. Y.; YU, A. R.; CHOI, I. W.; HONG, H.D.; LEE, K. W.; CHOI, H.D. Immunoestimulatory effects and characterization of a glycoprotein fraction from rice bran. **Int Immunopharmacol**. v17, p 191-197, 2013.

PAULSEN, B. S. Plant polysaccharides with immunostimulatory activities. **Curr. Org. Chem.**, v. 5, p. 939 –950, 2001.

PERCIVAL E. & McDOWELL R. H. Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides. **Academic Press**, London & New York, 1967.

PEREIRA, M. G. et al. Structure and anticoagulant activity of a sulfated galactan from the red alga, *Gelidium crinale*. Is there a specific structural requirement for the anticoagulant action. **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 12, p. 2015- 2023, 2005.

PETIT, P. X.; LECOEUR, H.; ZORN, E. et al. Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis. **J Cell Biol**, v130, p157-67, 1995

PHILCHENKOV, A.; ZAVELEVICH, M.; IMBS, T.; ZVYAGINTSEVA, T.; ZAPOROZHETS, T. Sensitization of human malignant lymphoid cells to etoposide by fucoidan, a brown seaweed polysaccharide. **Exp. Oncol.** v29, p 181–185, 2007.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos. 2. ed., São Paulo: **Atheneu**, p. 179-215, 2003.

POMIN, V.H. Fucanomics and galactanomics: Current status in drug discovery, mechanisms of action and role of the well-defined structures. **Biochim. Biophys. Acta.** v1820, p 1971–1979, 2012

POMIN, V.H.; MOURÃO, P.A. Structure, biology, evolution, and medical importance of sulfated fucans and galactans. **Glycobiology** , 18, 1016–1027, 2008

POLLI, C. D.; RUAS, L. P.; VERONEZ, L. C.; GERALDINO, T. H.; MORAIS, F. S.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; SILVA, G. P. Jacalin-Activated Macrophages Exhibit an Antitumor Phenotype. *BioMed Research International*. v2016, p 1-12, 2016.

PYONTECK, S. M.; AKKARI, L.; SCHUHMACHER, A. J.; et al. CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression. **Nat Med.** v19(10), p 1264-72, 2013.

QIAN, B. Z.; POLLARD, J. W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. **Cell**, v141(1), p 39-51, 2010.

QUAIL, D. F.; JOYCE, J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. **Nat Med.** v19, p 1423–37, 2013.

QUATROMONI, J. G.; ERUSLANOV, E. Tumor-associated macrophages: function, phenotype, and link to prognosis in human lung cancer. **Am J Transl Res.** V.4(4), p. 376-389, 2012.

RABANAL, M., PONCE, N. M., NAVARRO, D. A., GOMEZ, R. M., & STORTZ, C. A. The system of fucoidans from the brown seaweed *Dictyota dichotoma*: chemical analysis and antiviral activity. **Carbohydrate Polymers**, v101, p 804–811, 2014.

RADISKY, D. C. Epithelial–mesenchymal transition. **J Cell Sci.** v118, p 4325-6, 2005

RAMOS, L. A.; CAVALHEIRO, C. C. S.; CAVALHEIRO, E. T. G. Determinação de nitrito em águas utilizando extrato de flores. **Química Nova**, v. 29, n. p. 1114-1120, 2006.

RIXE, O.; FOJO, T. Is cell death a critical end point for anticancer therapies or is cytostasis sufficient? **Clin Cancer Res**, v. 13, n. 24, p. 7280-7, 2007

ROCHA, H.A.O. et al. A fucan from the brown seaweed *Spatoglossum schröderi* inhibits Chinese hamster ovary cell adhesion to several extracellular matrix proteins. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v34, p 621-626, 2001

ROZA, V., MENSHOVA, S. D., ANASTYUK, S. P., ERMAKOVA, N. M., SHEVCHENKO, V. I., & ZVYAGINTSEVA, T. N. Structure and anticancer activity in vitro of sulphated galactofucan from brown alga *Alaria angusta*. **Carbohydrate Polymers**, v132, p 118–125, 2015

SCHEPETKIN, I.A.; QUINN, M.T. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. **International Immunopharmacology**, v. 6, p. 317– 333, 2006

SCHMERLING, R. A.; BUZAID, A. C. Avanços e promessas no melanoma metastático. *Asco*, **Onco** , 2013.

SCHNEIDER, T.; EHRIG, K.; LIEWERT, I.; ALBAN, S. Interference with the cxcl12/cxcr4 axis as potential antitumor strategy: Superiority of a sulfated galactofucan from the brown alga *saccharina latissima* and fucoidan over heparins. **Glycobiology**. v25, p 812–824, 2015

SCHOCK, F.; PERRIMON, N. Molecular mechanisms of epithelial morphogenesis. **Ann Rev Cell Dev Biol**. v18, p 463-93, 2002

SENTHILKUMAR, K.; MANIVASAGAN, P.; VENKATESAN, J.; KIM, S.K. Brown seaweed fucoidan: Biological activity and apoptosis, growth signaling mechanism in cancer. **Int. J. Biol. Macromol.** , v60, p 366–374, 2013

SHAPIRO, H. M. Practical Flow Cytometry. New York : **Ed Wiley-Liss**, 1995.

SHIGEOKA, M.; URAKAWA, N.; NAKAMURA, T.; NISHIO, M.; WATAJIMA, T.; KURODA, D.; KOMORI, T.; KAKEJI, Y.; SEMBA, S.; YOKOZAKI, H. Tumor associated macrophage expressing CD204 is associated with tumor aggressiveness of esophageal squamous cell carcinoma. **Cancer Sci**. v104, p 1112–9, 2013

SHIME, H.; MATSUMOTO, M.; OSHIUMI, H. et al. Toll-like receptor 3 signaling converts tumorsupporting myeloid cells to tumoricidal effectors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v109, no. 6, p 2066 2071, 2012.

SICA, A. & MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. **The Journal of Clinical Investigation**. v122, no. 3, p. 787–795, 2012.

SILVA, D. C.; FREITAS, A. L. P.; BARROS, F. C. N.; LINS, K. O. A. L.; ALVES, A. P. N. N.; ALENCAR, N. M. N.; FIGUEIREDO, I. S. T.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; FEITOSA, J. P. A.; MACIEL, J. S.; PAULA, R. C. M. Polysaccharide isolated from *Passiflora edulis*: Characterization and antitumor properties. **Carb Pol** v. 87, p. 139-145, 2012.

SINGH, Y.; PAWAR, V. K.; MEHER, J. G.; RAVAL, K.; KUMAR, A.; SHRIVASTAVA, R.; BHADAURIA, S.; CHOURASIA, M. K. Targeting tumor

associated macrophages (TAMs) via nanocarriers. **Journal of Controlled Release**. v 254, p 92-106, 2017.

SILVA, D. C.; FREITAS, A. L. P.; BARROS, F. C. N.; LINS, O. A. L.; ALVES, A. P. N. N.; ALENCAR, N. M. N.; FIGUEIREDO, I. S. T. et al. Polysaccharide isolated from *Passiflora edulis*: Characterization and antitumor properties. **Carb. Pol.** v87, p 139-145, 2012.

SITHRANGA BOOPATHY, N.; KATHIRESAN K. Anticancer Drugs from Marine Flora: An Overview. **J. Oncol.**, pp. 1–18, 2010.

SKEHAN, P. et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **J. Natl. Cancer Inst.** v82, p. 1107-1112, 1990.

SOCKOLOSKY, J. T. et al. Durable antitumor responses to CD47 blockade require adaptive immune stimulation. **Proc. Natl Acad. Sci.** v 113, p 2646–2654, 2016

SOENGAS, M. S.; LOWE, S. W. Apoptosis and melanoma chemoresistance. **Oncogene**, v. 22, n. 20, p. 3138-51, 2003

SOLÉ, M. A.; FOLDATS, E. El género *Dictyota* (Phaeophyceae, Dictyotales) en el Caribe Venezolano. **Acta Botánica Venezuelica**, 26, 1, 41-82, 2003.

SOUSA, A.P. A; PESSOA, C. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAIS, M. O.; TORRES, M. R.; ALVES, A. P. N. N. In vivo growth-inhibition of Sarcoma 180 by alginates from brown seaweed *Sargassum vulgare*. **Carb. Pol.**, v. 66, p. 1, 2007

SOUZA, B. W. S.; CERQUEIRA, M. A.; BOURBON, A. I.; PINHEIRO, A. C.; MARTINS, J. T.; TEIXEIRA, J. A.; COIMBRA, M. A.; VICENTE, A. A. Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. **Food Hydrocoll.**, v27, pp. 287–292, 2012.

STENGEL, D. B.; CONNAN, S. & POPPER, Z. A. Algal chemodiversity and bioactivity: Sources of natural variability and implications for commercial application. **Biotechnology Advances**, 29, 483-501, 2011.

STRZYZ, P. Cancer biology: TGF- β and EMT as double agents. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. v17(4), p 202-203, 2017.

SUN, C.; ROSENDAHL, A. H.; WANG, X. D.; WU, D. Q.; ANDERSSON, R. Polysaccharide-K (PSK) in cancer – Old Story, New Possibilities? **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 757-762, 2012.

SURESH, V.; ANBAZHAGAN, C.; THANGAM, R.; SENTHILKUMAR, D.; SENTHILKUMAR, N.; KANNAN, S.; RENGASAMY, R.; PALANI, P. Stabilization of mitochondrial and microsomal function of fucoidan from *Sargassum plagiophyllum* in diethylnitrosamine induced hepatocarcinogenesis. **Carbohydr. Polym.**, v92, p 1377–1385, 2013

SU, S.; LIU, Q.; CHEN, J.; CHEN, J.; CHEN, F.; HE, C.; HUANG, D.; WU, W.; LIN, L.; HUANG, W.; ZHANG, J.; CUI, X.; ZHENG, F.; LI, H.; YAO, H.; SU, F.; SONG, E.

A positive feedback loop between mesenchymal-like cancer cells and macrophages is essential to breast cancer metastasis. **Cancer Cell**. v25(5), p 605-20, 2014.

SWAT, W.; IGNATOWICZ, L.; KISIELOW, P. Detection of apoptosis of immature CD4⁺8⁺ thymocytes by flow cytometry. **J Immunol Methods**. v137, p 79–87, 1981

SWEENEY, E.A.; LORTAT-JACOB, H.; PRIESTLEY, G.V.; NAKAMOTO, B.; PAPAYANNOPOULOU, T. Sulfated polysaccharides increase plasma levels of sdf-1 in monkeys and mice: Involvement in mobilization of stem/progenitor cells. **Blood**. v99, p 44–51, 2002

TAKEDA, K.; TOMIMORI, K.; KIMURA, R.; ISHIKAWA, C.; NOWLING, T.K.; MORI, N. Anti-tumor activity of fucoidan is mediated by nitric oxide released from macrophages. **Int. J. Oncol.** , v40, p 251–260, 2012

TANG, X.; MO, C.; WANG, Y.; WEI, D.; XIAO, H. Anti-tumour strategies aiming to target tumour-associated macrophages. **Immunology**, v.138, n.2, p. 93-104, 2013.

TAN, S. Y.; FAN, Y.; LUO, H. S.; SHEN, Z. X.; GUO, Y.; ZHAO, L. J. Prognostic significance of cell infiltrations of immunosurveillance in colorectal cancer. **World Journal of Gastroenterology**, vol. 11, no. 8, p 1210–1214, 2005.

TARIQ, M.; ZHANG, J.; LIANG, G.; DING, L.; HE, Q.; YANG, B., Macrophage Polarization: Anti-cancer Strategies to Target Tumor-associated Macrophage in Breast Cancer. **J. Cell. Biochem**, doi: 10.1002/jcb.25895, 2017

TAVEIRA, D. A.; SILVA, A. M.; KAULBACH, H. C.; CHUIDIAN, F.S.; LAMBERT, D. R.; SUFFREDINI, A. F.; DANNER, R. L. Brief report: shock e multiple-organ dysfunction after self administration of Salmonella endotoxin. **N Engl J Med**, v. 328, p. 1457-1460, 1993.

TEIXEIRA, V. L.; ALMEIDA, S. A. S.; KELECOM, A. Chemosystematic and biogeographic studies of the diterpenes form the marine brown alga *Dictyota dichotoma*. **Biochemical Systematics and Ecology**, 18, 2/3, 87-92, 1990

TEIXEIRA, V. L.; KELECOM, A. Geographic distribution of the diterpenes from the marine brown alga *Dictyota Lamouroux* (Dictyotales, Phaeophyta). **Neritica**, Pontal do Sul, PR, 2, 179-200, 1987.

TERUYA T, TAKEDA S, TAMAKI Y, AND TAKO M, BIOSCI. Fucoidan Isolated from *Laminaria angustata* var. *longissima* Induced Macrophage Activation. **Biotechnol. Biochem**. v74, p 1960–1962, 2010.

THIERY, J. P. Epithelial-mesenchymal transition in tumor progression. **Nat Rev Cancer**. v2, p 442-54, 2002

THINH, P.D.; MENSHOVA, R.V.; ERMAKOVA, S.P.; ANASTYUK, S.D.; LY, B.M.; ZVYAGINTSEVA, T.N. Structural characteristics and anticancer activity of fucoidan from the brown alga *Sargassum mcclurei*. **Mar. Drugs** , v11, p 1456–1476, 2013.

TURK, S. S.; SCHNEIDER, R. Printing properties of a high substituted guar gum and its mixture with alginate. **Dye Pigment** v. 47, p. 269-275, 2000.

TZIANABOS, A. O. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biological function. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.13, p. 523–533, 2000.

UMAPOORANI T, PERIYANAYAGAM K, INDUMATHI S, BALASUBRAMANIAN R, SUGITHRA B, SUBBULAKSHMI N, VELMURUGAN R. Antimitotic activities of ulvan from *Ulva lactuca* by using *Allium cepa* root tip model. **Indo Am. J. Pharm. Res.** v6, p 5779-5783, 2016.

VACULOVÁ, A.; HOFMANOVA, J.; SOUCEK, K.; KOVARIKOVÁ, M.; KOZUBÍK, A. Tumor necrosis factor-alpha induces apoptosis associated with poly(ADP-ribose) polymerase cleavage in HT-29 colon cancer cells. **Anticancer Research**, v22, no. 3, p 1635–1639, 2002.

VAN-BEEK, E.; BALM, A.; NIEWEG, O.; HAMMING-VRIEZE, O.; LOHUIS, P. C. KLOP, W. M. Treatment of Regional Metastatic Melanoma of Unknown Primary Origin. **Cancers.**, 7(3), p. 1543–1553, 2015

VAN ENGELAND, M. et al. Plasma membrane alterations and cytoskeletal changes in apoptosis. **Experimental Cell Research**, v235, p 421-430, 1997.

VAN GINDERACHTER, J. A.; MOVAHEDI, K.; HASSANZADEH GHASSABEH, G. et al., “Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: picking the best of both worlds for tumor promotion, **Immunobiology**, v211, no. 6–8, p. 487–501, 2006

VAN OVERMEIRE, E.; LAOUI, D.; KEIRSSE, J.; BONELLI, S.; LAHMAR, Q.; VAN GINDERACHTER, J. A. STAT of the union: dynamics of distinct tumor-associated macrophage subsets governed by STAT1. **Eur J Immunol.** v44, p 2238–42, 2014.

VASCONCELOS, M. A. et al. Temporal variation in vegetative development of caulerpa scalpelliformis (chlorophyta) from baleia beach, Ilha Grande bay (Rio de Janeiro, Brazil). **Brazilian Journal of Oceanography.** v. 59, p. 145-152, 2011.

VIDOTTI, E.C.; ROLLEMBERG, M.C.E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à biorremediação e à química analítica. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p.139-145, 2004.

VO, T. S.; NGO, D. H.; KIM, S. K. Potential targets for anti-inflammatory and anti-allergic activities of marine algae: An overview. **Inflamm. Allergy Drug Targets**, v11, pp. 90-101, 2012.

XUE, M.; GE, Y.; ZHANG, J.; WANG, Q.; HOU, L.; LIU, Y.; SUN, L.; LI, Q. Anticancer properties and mechanisms of fucoidan on mouse breast cancer *in vitro* and *in vivo*. **PLoS One** , v7, e43483, 2012

WACK C; BECKER, J. C; BRÖCKER, E. B; LUTZ, W. K; FISCHER, W. H. Chemoimmunotherapy for melanoma with dacarbazine and 2,4-dinitrochlorobenzene: results from a murine tumor model. **Melanoma Res.**; 11:247-253, 2001

WEBER, M.; ILIOPOULOS, C.; MOEBIUS, P. et al., Prognostic significance of macrophage polarization in early stage oral squamous cell carcinomas. **Oral Oncology**, vol. 52, p. 75–84, 2016.

WEISSENSTEIN, U. et al. Interaction of standardized mistletoe (*Viscum album*) extracts with chemotherapeutic drugs regarding cytostatic and cytotoxic effects in vitro. **BMC Complementary And Alternative Medicine**, v.14, n.6, 2014

WIJESEKARA I.; PANGESTUTI, R.; KIM S.K. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. **Carb. Pol.** v84, pp. 14–21, 2011

WILLINGHAM, M.C. Cytochemical methods for the detection of apoptosis. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, 47: 1101-1109, 1999

WYSOR, B.; DE CLERCK, O. An updated and annotated list of marine brown algae (Phaeophyceae) of the caribbean coast of the Republic of Panama. **Botanica Marina**, 46, 2, 151-160, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. <http://www.who.int/en/> 2016

YAMAGUCHI, T.; FUSHIDA, S.; YAMAMOTO, Y.; TSUKADA, T.; KINOSHITA, J.; OYAMA, K. et al. Tumor-associated macrophages of the M2 phenotype contribute to progression in gastric cancer with peritoneal dissemination. **Gastric Cancer**, 2015.

YANG, M.; MA, C.; SUN, J.; SHAO, Q.; GAO, W.; ZHANG, Y.; LI, Z.; XIE, Q.; DONG, Z.; QU, X. Fucoidan stimulation induces a functional maturation of human monocyte-derived dendritic cells. **Int. Immunopharmacol.** v8, p 1754–1760, 2008.

YANG, L.; WANG, F.; WANG, L.; HUANG, L.; WANG, J., ZHANG, B.; ZHANG, Y. CD163+ tumor-associated macrophage is a prognostic biomarker and is associated with therapeutic effect on malignant pleural effusion of lung cancer patients. **Oncotarget**. v6, p 10592–603, 2015.

YANG, L.; ZANG, Y. Tumor-associated macrophages: from basic research to clinical application. *J. Hematol Oncol.* V10, p 58, 2017

YANG, Z. J.; CHEE, C. E.; HUANG, S; SINICROPE, F. A. The role of autophagy in cancer: Therapeutic Implications. **Molecular Cancer Therapy**, v10, n.9, p. 1533-1541, 2011.

YIN, GUANGWEN; LI, W.; LIN, Q.; LIN, X.; LI, J.; ZHU, Q.; JIANG, H.; HUANG, Z. Dietary administration of laminarin improves the growth performance and immune responses in *Epinephelus coioides*. **Fish & Shellfish Immunology**. v41, p 402-406, 2014

ZHANG, C. Y.; WU, W. H.; WANG, J.; LAN M. B. Antioxidant properties of polysaccharide from the brown seaweed *Sargassum graminifolium* (Turn.), and its effects on Calcium Oxalate Crystallization. **Mar. Drugs**, v10(1), p 119-130, 2012.

ZHANG, Z.; TERUYA, K.; YOSHIDA, T.; ETO, H.; SHIRAHATA, S. Fucoidan extract enhances the anti-cancer activity of chemotherapeutic agents in mda-mb-231 and mcf-7 breast cancer cells. **Mar. Drugs.** v11, p 81–98, 2013

ZHU, C.; CAO, R.; ZHANG, S.X.; MAN, Y.N.; WU, X.Z. Fucoidan inhibits the growth of hepatocellular carcinoma independent of angiogenesis. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.** v2013, 2013.