



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

FELIPE BARROS TELES

**“GALACTANA SULFATADA NÃO-CITOTÓXICA DA ALGA MARINHA *Gracilaria*
cornea J. Agardh POLARIZA MACRÓFAGOS PARA UM FENÓTIPO
ANTITUMORAL *in vitro* E INIBE O CRESCIMENTO TUMORAL EM UM
MODELO DE MELANOMA MURINO”**

FORTALEZA

2024

FELIPE BARROS TELES

“GALACTANA SULFATADA NÃO-CITOTÓXICA DA ALGA MARINHA *Gracilaria cornea* J. Agardh POLARIZA MACRÓFAGOS PARA UM FENÓTIPO ANTITUMORAL *in vitro* E INIBE O CRESCIMENTO TUMORAL EM UM MODELO DE MELANOMA MURINO”

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Diego Veras Wilke.
Coorientador: Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior.

FORTALEZA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

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

T272g Teles, Felipe Barros.

Galactana sulfatada não-citotóxica da alga marinha *Gracilaria cornea* J. Agardh polariza macrófagos para um fenótipo antitumoral in vitro e inibe o crescimento tumoral em um modelo de melanoma murino / Felipe Barros Teles. – 2024.

100 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2024.

Orientação: Prof. Dr. Diego Veras Wilke.

Coorientação: Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior.

1. Algas Vermelhas. 2. Polissacarídeos. 3. Macrófagos. 4. Imunoestimulante. I. Título.

CDD 615.1

FELIPE BARROS TELES

“GALACTANA SULFATADA NÃO-CITOTÓXICA DA ALGA MARINHA *Gracilaria cornea* J. Agardh POLARIZA MACRÓFAGOS PARA UM FENÓTIPO ANTITUMORAL *in vitro* E INIBE O CRESCIMENTO TUMORAL EM UM MODELO DE MELANOMA MURINO”

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Farmacologia.

Aprovado em: 11/03/2024.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Mauro Sérgio Gonçalves Pavão
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Prof^a. Dra. Marjory Lima Holanda Araújo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Pedro Marcos Gomes Soares
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À minha tia Eugênia Luzi Barros de Alencar,
exemplo máximo de resiliência, dedico esta
tese.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Dr. Diego Veras Wilke, pela oportunidade e confiança ao longo dos mais de oito anos em que trabalhamos juntos. Sua filosofia de trabalho, que sempre prezou pelo rigor, incentivou-me a buscar a excelência em tudo o que fizesse. Seu entusiasmo e otimismo mantiveram em mim a motivação necessária para enfrentar os momentos mais desafiadores, sobretudo, nos últimos anos do doutorado. Minha sincera gratidão!

Ao meu co-orientador, professor Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior, sempre tão cortês e generoso, agradeço a boa vontade em ajudar sempre que precisei.

À professora Dra. Norma Maria Barros Benevides, orientadora no mestrado e grande colaboradora no doutorado, agradeço por manter sempre abertas as portas do Laboratório de Carboidratos e Lectinas de Algas (CarboLec).

Aos membros da banca, por terem aceitem o convite e pelas valiosas contribuições e críticas que foram essenciais para o enriquecimento da tese.

Aos colegas de laboratório, sou grato pelos bons momentos de convivência e por toda ajuda nos experimentos da tese.

À minha amiga Keilla Santana, cuja alegria contagiante ajudaram a tornar os dias de trabalho mais leves. Seu apoio e lealdade me ajudaram a seguir em frente com determinação e otimismo. Por todos os momentos compartilhados, minha gratidão é imensa!

Aos amigos e padrinhos de casamento Ticiania Lima e Antônio Neto, por contribuir com ideias para tese e pelos momentos memoráveis que vivemos desde a minha iniciação científica.

À minha avó (*in memoriam*) por me estimular a estudar desde cedo e por me ensinar o valor do conhecimento. Um dia lhe prometi atingir o mais elevado nível acadêmico e é com grande satisfação que posso dizer que honrei meu compromisso.

Aos meus sobrinhos, Nicole e Gustavo, joias da família, que enchem nossos dias de alegria. Que nunca deixem de sonhar alto e que nunca lhes falte a coragem e a ousadia para perseguir o que desejam!

À minha mãe Lídia Alencar, por todo amor e carinho.

À minha tia Eugênia Alencar, por sua dedicação e sacrifícios em meu favor. Há muito de você em mim e sempre haverá.

À minha esposa Alexia Assef, pelo companheirismo e apoio incondicional há mais de onze anos. Foi um grande privilégio ter você ao meu lado ao longo de toda minha trajetória acadêmica. Seu apoio emocional e constante incentivo foram o alicerce sobre o qual foi possível construir cada página desta tese. Nenhuma palavra será boa o suficiente para demonstrar minha gratidão por tudo o que você fez e faz por mim. Eu sou uma pessoa melhor ao seu lado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos e pelo apoio financeiro (Projeto Ciências do Mar II CAPES. Código financeiro: nº 23038.001422/2014-84).

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia da Biodiversidade e Produtos Naturais (INCT BioNat-CNPq/FAPESP, código financeiro nº 465637/2014-0).

À Central Multiusuário do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará (UFC) pelo suporte técnico.

“A Natureza muitas vezes nos dá pistas sobre os seus segredos mais profundos, e é possível que ela nos tenha dado uma pista que, se

seguirmos, poderá nos levar à solução deste difícil problema.”

(William B. Colley)

RESUMO

GALACTANA SULFATADA NÃO-CITOTÓXICA DA ALGA MARINHA *Gracilaria cornea* J. Agardh POLARIZA MACRÓFAGOS PARA UM FENÓTIPO ANTITUMORAL *in vitro* E INIBE O CRESCIMENTO TUMORAL EM UM MODELO DE MELANOMA MURINO

As algas marinhas são conhecidas por produzirem diversos compostos bioativos, entre os quais podemos destacar os polissacarídeos sulfatados (PS). Os PS são biomoléculas que possuem diversas atividades biológicas já descritas. Em relação ao câncer, a capacidade que determinados PS possuem em estimular células da imunidade inata, sobretudo ativar macrófagos (Mfs) para um fenótipo antitumoral, representa uma abordagem promissora que tem atraído cada vez mais o interesse da comunidade científica pelo potencial terapêutico que representa. O presente estudo tem como objetivo avaliar se galactanas sulfatadas (GS) - um PS encontrado principalmente nas algas vermelhas - obtidas das espécies *Gracilaria cornea* (GS-Gc) e *Solieria filiformis* (GS-Sf) - são capazes de ativar uma linhagem de macrófagos murinos (RAW 264.7) para um fenótipo antitumoral. Os resultados mostraram que ambas as amostras induziram a produção de óxido nítrico (NO) em RAW 264.7, sugerindo sua ativação para um fenótipo pró-inflamatório (semelhante ao M1). Além disso, embora GS-Gc não tenha inibido diretamente a proliferação da linhagem de melanoma murino (B16-F10), o meio-condicionado de RAW 264.7 incubada com GS-Gc (MC-GS-Gc) foi capaz de inibir a proliferação de B16-F10. Este resultado sugere que, embora GS-Gc não apresente citotoxicidade direta contra a linhagem tumoral estudada, pode exercer efeito antitumoral mediado pela ativação dos Mfs. Devido ao seu perfil bioativo, GS-Gc foi selecionada para ensaios posteriores. Os experimentos de caracterização fenotípica subsequentes revelaram que a GS-Gc aumentou a expressão dos marcadores de superfície MHC de classe II e CD86, além de aumentar a expressão do marcador intracelular iNOS. Esse resultado reforça ainda mais o potencial imunestimulante de GS-Gc sobre Mfs. Em um modelo de melanoma murino, a administração de GS-Gc na dose de 25 mg/kg, via intraperitoneal (i.p) em camundongos C57BL/6 ao longo de 14 dias promoveu uma redução de aproximadamente 60% do peso tumoral em comparação ao grupo controle negativo (salina). Além disso, análises histopatológicas mostraram aumento do peso do baço acompanhado de desorganização da polpa branca, corroborando com a hipótese de GS-Gc exerce efeito antitumoral por meio da estimulação do sistema imunológico. Por fim, durante todo o tratamento dos animais com a amostra, não foram observados efeitos tóxicos, indicando sua segurança para potencial utilização terapêutica. Em síntese, o nosso estudo revelou um potencial antitumoral e imunestimulante promissor da GS de *G. cornea*. Enquanto continuamos a estudar os mecanismos subjacentes aos efeitos farmacológicos observados, o nosso trabalho contribui para o crescente conjunto de evidências que apoiam o potencial terapêutico dos polissacarídeos de origem marinha para o tratamento do câncer.

Palavras-chave: Polissacarídeos Sulfatados; Imunoestimulante; Macrófagos; Antitumoral.

ABSTRACT

NON-CYTOTOXIC SULFATED GALACTAN FROM RED SEAWEED *Gracilaria cornea*
J. Agardh POLARIZES MACROPHAGES TOWARDS AN ANTITUMOR PHENOTYPE *in vitro*
AND INHIBITS TUMOR GROWTH IN A MURINE MELANOMA MODEL

Seaweeds are known for producing various bioactive compounds, among which we can highlight sulfated polysaccharides (SP). SP are biomolecules that have various biological activities that have already been described. In relation to cancer, the ability of certain SP to stimulate innate immunity cells, especially to activate macrophages (Mfs) towards an anti-tumor phenotype, represents a promising approach that has attracted increasing interest from the scientific community due to its therapeutic potential. The aim of the present study was to assess whether sulfated galactans (SG) - a PS found in red seaweeds - obtained from the species *Gracilaria cornea* (SG-Gc) and *Solieria filiformis* (SG-Sf), were able to activating a lineage of murine macrophages (RAW 264.7) towards an antitumor phenotype. The results showed that both SG-Gc and SG-Sf induced the production of nitric oxide (NO) in RAW 264.7, suggesting their activation to a pro-inflammatory phenotype (similar to M1). Furthermore, although SG-Gc did not directly inhibit the proliferation of the murine melanoma cell line (B16-F10), the medium-conditioned RAW 264.7 incubated with SG-Gc (MC-SG-Gc) was able to inhibit the proliferation of B16-F10. This result suggests that, although SG-Gc does not show direct cytotoxicity against B16-F10, it may exert an antitumor effect mediated by macrophage activation. Due to its bioactive profile, SG-Gc was selected for further testing. Subsequent phenotypic characterization experiments revealed that SG-Gc increased the expression of MHC class II and CD86 surface markers, as well as increasing the expression of iNOS (intracellular marker). This result further reinforces the immunostimulant potential of SG-Gc on macrophages. In a murine melanoma model, the administration of SG-Gc at a dose of 25 mg/kg, intraperitoneally (i.p) in C57BL/6 mice over 14 days promoted a reduction of approximately 60% in tumor weight compared to the negative control group. In addition, histopathological analyses showed an increase in spleen weight accompanied by disorganization of the white pulp, corroborating the hypothesis that SG-Gc exerts an anti-tumour effect by stimulating the immune system. Finally, no toxic effects were observed throughout the treatment of the animals with the sample, indicating its safety for potential therapeutic use. In summary, our study emphasizes the promising antitumor and immunomodulatory properties of SG, especially the *G. cornea* species. While we continue to study the mechanisms underlying the observed pharmacological effects, our work contributes to the growing body of evidence supporting the therapeutic potential of polysaccharides of marine origin for the treatment of cancer.

Keywords: Sulfated Polysaccharides; Immunostimulant; Macrophages; Antitumor.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Etapas da carcinogênese	19
Figura 2 - Capacidades funcionais do câncer propostas em 2000.	20
Figura 3 - Capacidades funcionais emergentes e características facilitadoras do câncer.....	21
Figura 4 - Capacidades funcionais emergentes e características facilitadoras propostas recentemente.....	22
Figura 5 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma (números arredondados para múltiplos de 10)	24
Figura 6 - Representação dos principais componentes do microambiente tumoral.	26
Figura 7 - Paradigma da polarização fenotípica de macrófagos para dois estados funcionais.	29
Figura 8 - Representação do espectro da plasticidade fenotípica dos macrófagos.....	30
Figura 9 - Linha do tempo com os principais marcos históricos na pesquisa dos macrófagos associados a tumores e do microambiente tumoral.	31
Figura 10 - Representação esquemática da estrutura de um polissacarídeo.....	32
Figura 11 - Esquema da estrutura das galactanas formada pelas unidades A e B que se alternam ao longo da cadeia linear.	34
Figura 12 – Representação dos enantiômeros da galactose por meio da projeção de Fischer.	35
Figura 13 - Diversidade estrutural das galactanas do grupo ágar.....	36
Figura 14 - Diversidade estrutural das famílias de carragenanas	38
Figura 15 - Fotografia de um exemplar da espécie <i>G. cornea</i>	39
Figura 16 - Fotografia de um exemplar da espécie <i>S. filiformis</i>	41
Figura 17 - Planejamento experimental do trabalho.....	47
Figura 18 - Localização da área de cultivo da espécie <i>S. filiformis</i>	48
Figura 19 - Fluxograma das etapas do isolamento das galactanas sulfatadas.	50
Figura 20 - Fotomicrografia da linhagem de macrófagos RAW 264.7.	53
Figura 21 - Fotomicrografia da linhagem de melanoma metastático murino B16-F10.	53
Figura 22 - Esquema do mecanismo de reação envolvido na reação de Griess.	54
Figura 23 - Esquema do ensaio do SRB.	55
Figura 24 - Estratégia de <i>gates</i> para citometria de fluxo.....	59

Figura 25 - Sequência temporal de etapas do experimento <i>in vivo</i> .	60
Figura 26 – GS-Gc e GS-Sf estimulam a produção de óxido nítrico por RAW 264.7	62
Figura 27 - GS-Sf inibe a proliferação celular de B16-F10	64
Figura 28 - O meio-condicionado de RAW 264.7 estimulada com GS-Gc ou GS-Sf inibe a proliferação celular de B16-F10.	66
Figura 29 – GS-Gc induz em RAW 264.7 aumento da expressão de iNOS.	68
Figura 30 – GS-Gc induz em RAW 264.7 o aumento da expressão dos marcadores CD86 e MHC classe II.	69
Figura 31 GS-Gc inibe na maior dose o crescimento tumoral em camundongos C57BL/6 transplantados com B16-F10.	74
Figura 32 – GS-Gc não induziu alterações na arquitetura tumoral e nem foram encontrados achados significativos nos tumores de camundongos C57BL/6 transplantados com B16-F10.	75
Figura 33 - GS-Gc induz na maior dose aumento do peso do baço em camundongos C57BL/6 transplantados com B16-F10	77
Figura 34 – Fotomicrografias do baço de camundongos C57BL/6 transplantados com B16-F10	79
Figura 35 – GS-Gc induz aumento na contagem de leucócitos em camundongos C57BL/6 transplantados com B16-F10.	81
Figura 36 - GS-Gc não altera os níveis séricos de creatinina em camundongos C57BL/6 transplantados com B16-F10.	83
Figura 37 - GS-Gc não altera o peso dos rins em camundongos C57BL/6 transplantados com B16-F10.	84
Figura 38 - GS-Gc não induz alterações morfológicas nos rins de camundongos C57BL/6 transplantados com B16-F10.	85
Figura 39 - GS-Gc altera os níveis séricos de ALT e AST em camundongos C57BL/6 transplantados com B16-F10.	86
Figura 40 - GS-Gc aumenta o peso do fígado de camundongos C57BL/6 transplantados com B16-F10.	87
Figura 41 - GS-Gc não induz alterações morfológicas no fígado de camundongos C57BL/6 transplantados com B16-F10.	88
Figura 42 - Resumo esquemático dos resultados obtidos.	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características estruturais das galactanas sulfatadas de <i>Gracilaria cornea</i>	40
Tabela 2 – Características estruturais das galactanas sulfatadas de <i>Solieria filiformis</i>	42
Tabela 3 - Análises químicas de GS-Gc.	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorbância
ANOVA	Análise de Variância
B16-F10	Linhagem Melanoma Murino
BSA	Albumina Sérica Bovina, do inglês <i>Bovine Serum Albumin</i>
CCL	Ligante de quimiocina
CCP	Cloreto cetilpiridínio
CD	Preteínas expressas em células imunes, do inglês <i>Cluster of Differentiation</i>
CF	Citometria de Fluxo
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's médium
EDTA	Agente quelante, do inglês <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
FDA	Food and Drug Administration
FSC	Desvio frontal, do inglês <i>Forward scatter</i>
GLOBOCAN	Global Cancer Observatory
GM-CSF	Fator estimulante do crescimento de granulócitos e macrófagos
GS	Galactana Sulfatada
GS-Gc	Galactana Sulfatada de <i>Gracilaria cornea</i>
GS-Sf	Galactana Sulfatada de <i>Solieria filiformis</i>
IARC	Agência Internacional de Pesquisa em Câncer
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional de Câncer
INF	Interferon
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida, do inglês <i>Inducible nitric oxide synthase</i>
LPS	Lipopolissacarídeo de <i>Escherichia coli</i>
M1	Macrófagos ativados pela via clássica
M2	Macrófagos ativados pela via alternativa
MAT	Microambiente tumoral
MC	Meio condicionado
MFI	Intensidade de Fluorescência Mediana, do inglês <i>Median Fluorescence Intensity</i>
Mfs	Macrófagos

MHC	Complexo principal de histocompatibilidade, do inglês <i>Major Histocompatibility Complex</i>
MMP	Metaloprotease de Matriz
NED	cloridrato de N-(1-naftil) etilenodiamina
NF- κ B	Fator de transcrição nuclear κ B, do inglês <i>factor nuclear kappa B</i>
NK	Células assassinas naturais, do inglês <i>natural killer</i>
NO	Óxido Nítrico, do inglês Nitric Oxide
PBS	Solução tampão salina, do inglês Phosphate Buffer Solution
PRR	Receptor de reconhecimento de padrões
PS	Polissacarídeo sulfatado
RAW 264.7	Linhagem macrófagos murinos
ROS	Espécies reativas de oxigênio, do inglês <i>Reactive oxygen species</i>
SASP	Fenótipo Secretório Associado a Senescência, do inglês <i>Senescence-associated secretory phenotype</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
SRB	Sulforrodamina B
SSC	Desvio lateral, do inglês <i>Side Scatter</i>
TAM	Macrófagos associados ao tumor, do inglês <i>Tumor associated macrophages</i>
TCA	Ácido tricloroacético, do inglês <i>Trichloroacetic acid</i>
TGF	Fator de transformação do crescimento
TH1	Linfócito T auxiliar tipo 1
TH2	Linfócito T auxiliar tipo 2
TLR	Receptor do tipo Toll
TNF	Fator de necrose tumoral
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 O câncer	18
1.1.1 A epidemiologia do câncer	22
1.1.2 O melanoma cutâneo	25
1.1.3 O microambiente tumoral	26
1.1.4 Os macrófagos como alvo de estratégias terapêuticas antitumorais	28
1.2 Os polissacarídeos sulfatados de algas marinhas	32
1.2.1 As galactanas sulfatadas	34
1.2.2 Galactanas sulfatadas bioativas de uma agarófito e uma carragenófito encontradas no litoral cearense	39
2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA.....	43
3 OBJETIVOS	46
3.1 Geral.....	46
3.2 Específicos.....	46
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	47
4.1 Planejamento experimental.....	47
4.2 Obtenção das algas	48
4.3 Isolamento das Galactanas Sulfatadas	49
4.4 Análises químicas das GS	50
4.4.1 Determinação do rendimento percentual do processo de isolamento das GS.....	50
4.4.2 Avaliação da presença de proteínas contaminantes na amostra	50
4.4.3 Determinação do teor percentual de D-galactose na amostra	51
4.4.4 Determinação do teor percentual de sulfato livre na amostra	52
4.5 Ensaios <i>in vitro</i>.....	52
4.5.1 Linhagens celulares e procedimentos de cultura celular.....	52
4.5.2 Avaliação da produção de óxido nítrico por RAW 264.7 estimulada com GS-Gc ou SG-Sf	54
4.5.3 Avaliação do potencial antiproliferativo de GS-Gc e GS-Gc contra B16-F10.....	55
4.5.4 Avaliação do potencial antiproliferativo do meio-condicionado de RAW 264.7 estimulada com GS-Gc e SG-Sf contra B16-F10.....	56
4.5.5 Análise da expressão de marcadores de superfície e intracelular em RAW 264.7 estimulada com GS-Gc e SG-Sf.....	57
4.6 Ensaios <i>in vivo</i>.....	59
4.6.1 Animais	59
4.6.2 Ensaio antitumoral e coleta de tumor, sangue e órgãos	59
4.6.3 Análise histopatológica	60

4.6.4 <i>Análise bioquímica</i>	61
4.6.5 <i>Análise hematológica</i>	61
4.7 <i>Análise estatística</i>	61
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
5.1 <i>Ensaio in vitro</i>	62
5.1.1 <i>Avaliação da produção de óxido nítrico por RAW 264.7 estimulada com GS-Gc ou GS-Sf</i>	62
5.1.2 <i>Avaliação do potencial antiproliferativo de GS-Gc e GS-Gc contra B16-F10</i>	64
5.1.3 <i>Avaliação do potencial antiproliferativo do meio condicionado de RAW 264.7 estimulada com GS-Gc e GS-Sf contra B16-F10</i>	66
5.1.4 <i>Análise da expressão de marcadores associados ao fenótipo M1-like em RAW 264.7 estimulada com GS-Gc</i>	68
5.2 <i>Análises químicas de GS-Gc</i>	72
5.3 <i>Ensaio in vivo</i>	73
5.3.1 <i>Avaliação do potencial antitumoral de GS-Gc em um modelo de melanoma murino</i>	73
5.3.2 <i>Avaliação do potencial imunoestimulante de GS-Gc in vivo</i>	77
5.3.3 <i>Análise de toxicidade do GS-Gc</i>	82
6 CONCLUSÃO	90
REFERÊNCIAS	91

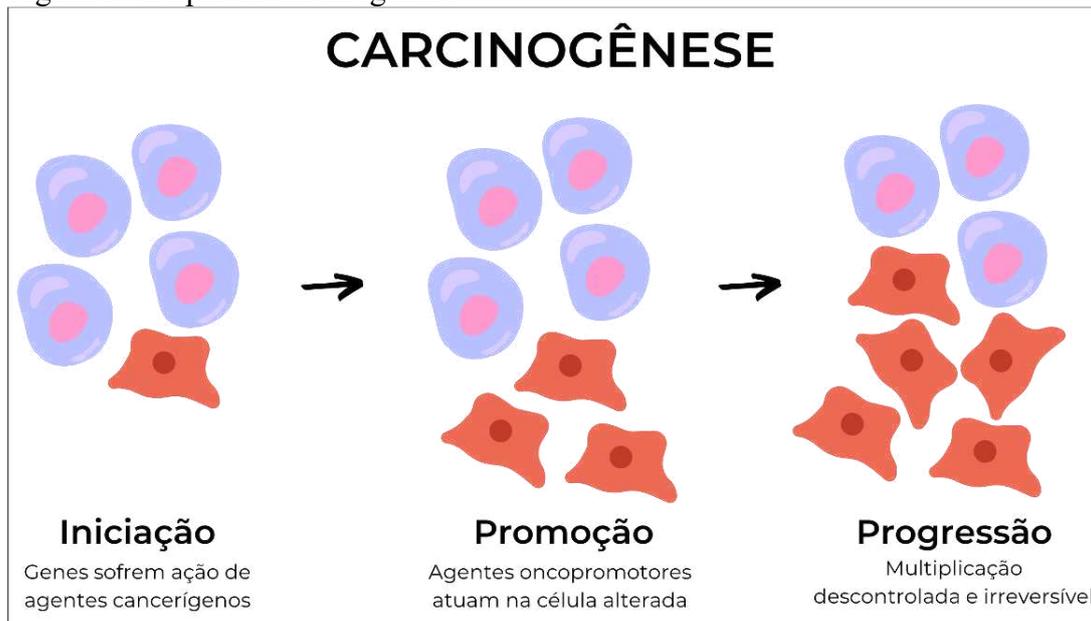
1 INTRODUÇÃO

1.1 O câncer

Doenças representam um estado de interrupção do funcionamento normal do organismo. No câncer, as células tumorais exibem disfunções nos mecanismos que regulam o crescimento e a divisão celular levando a uma proliferação fora da homeostase, desequilíbrio no uso dos recursos do hospedeiro, ruptura tecidual e cooptação de células não tumorais gerando ao paciente, em última instância, dor, falência de órgãos e complicações como a caquexia. Além disso, as células transformadas estão sujeitas à evolução por seleção natural levando ao surgimento de subpopulações com diferentes fenótipos que podem exibir desde resistência à quimioterapia citotóxica até a capacidade de invadir tecidos próximos e se espalhar para outras partes do organismo através dos vasos sanguíneos e linfáticos. (Brown *et al.*, 2023).

A carcinogênese é um processo lento e gradual por meio da qual uma célula não tumoral se transforma em uma célula tumoral (Figura 1). Didaticamente, pode ser dividida em três fases: iniciação, promoção e progressão. Na fase de “iniciação”, alterações genéticas em genes-alvo (proto-oncogenes e genes supressores tumorais, por exemplo) são induzidas pelos agentes carcinogênicos (de natureza química, física ou biológica). Essas mutações conferem à célula iniciada uma vantagem de crescimento. Durante a “promoção”, a célula é estimulada a se dividir por ação dos agentes promotores (hormônios, inflamação crônica e algumas substâncias como ésteres de forbol, por exemplo) ampliando o efeito das mutações iniciais, porém, sem causá-las diretamente. Isso leva à proliferação das células mutadas, aumentando a chance de acumular novas mutações obtendo vantagens adicionais de crescimento e sobrevivência em relação às células do tecido de origem. Na fase final, denominada “progressão”, a lesão pré-maligna se transforma em um tumor maligno invasivo com concomitante aumento da heterogeneidade celular (Klaunig, 2020).

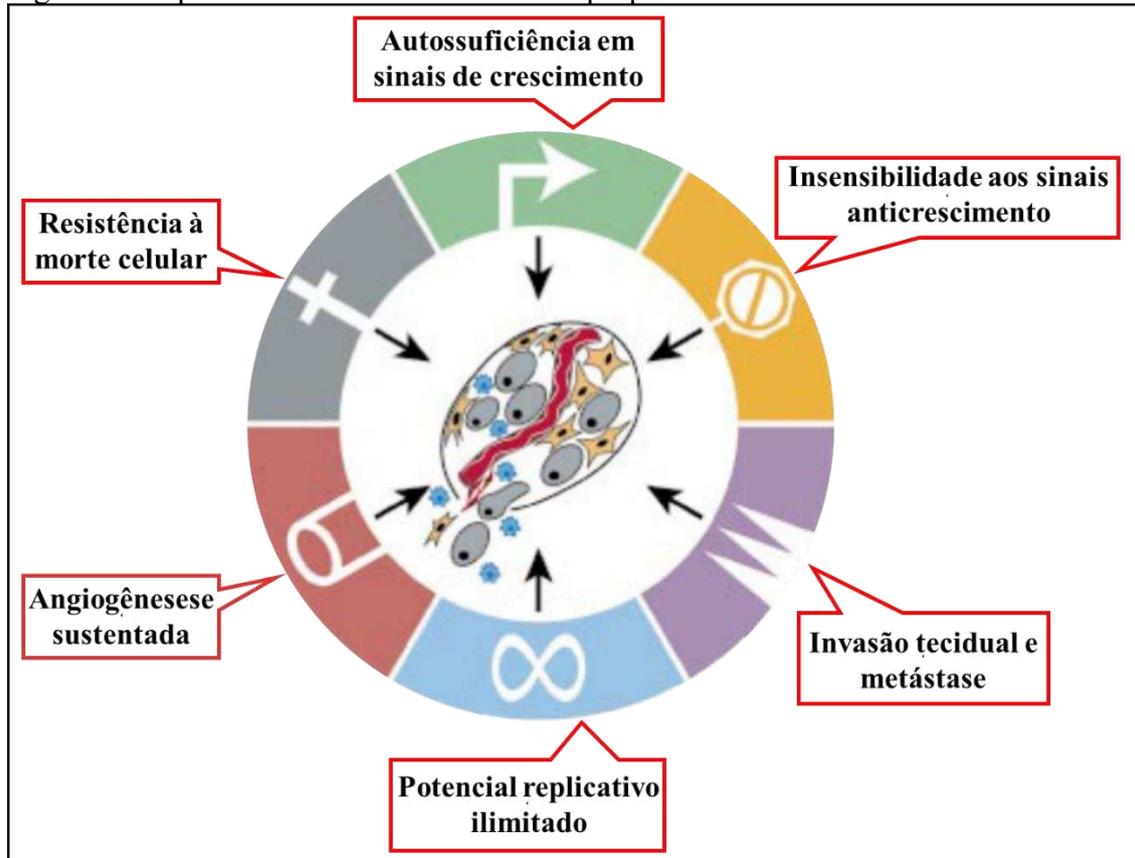
Figura 1 - Etapas da carcinogênese



Fonte: Elaborado pelo autor.

No início dos anos 2000, Douglas Hanahan e Robert A. Weinberg propuseram que, a despeito da notável diversidade de neoplasias malignas e dos mecanismos moleculares subjacentes, seria possível identificar um conjunto de capacidades funcionais adquiridas durante a carcinogênese e compartilhadas pelos tumores que seriam indispensáveis para o seu desenvolvimento. Inicialmente, esse conjunto reunia seis características denominadas “*hallmarks of cancer*” (Figura 2). Uma breve descrição dessas capacidades funcionais é apresentada a seguir: i) Autossuficiência em sinais de crescimento, produzindo ou respondendo de forma constitutiva a seus próprios fatores de crescimento; ii) Insensibilidade aos sinais antiproliferativos; iii) Capacidade de invadir tecidos e formar metástases, espalhando-se para outras partes do corpo; iv) Potencial replicativo ilimitado, evitando a senescência celular, principalmente, pela ativação da enzima telomerase; v) Indução de angiogênese sustentada, formando novos vasos sanguíneos e garantindo suprimento de nutrientes e oxigênio, além de facilitar metástases; vi) Resistência à apoptose, permitindo que sobrevivam e se proliferem a despeito dos significativos danos ao material genético (Hanahan; Weinberg, 2000).

Figura 2 - Capacidades funcionais do câncer propostas em 2000.

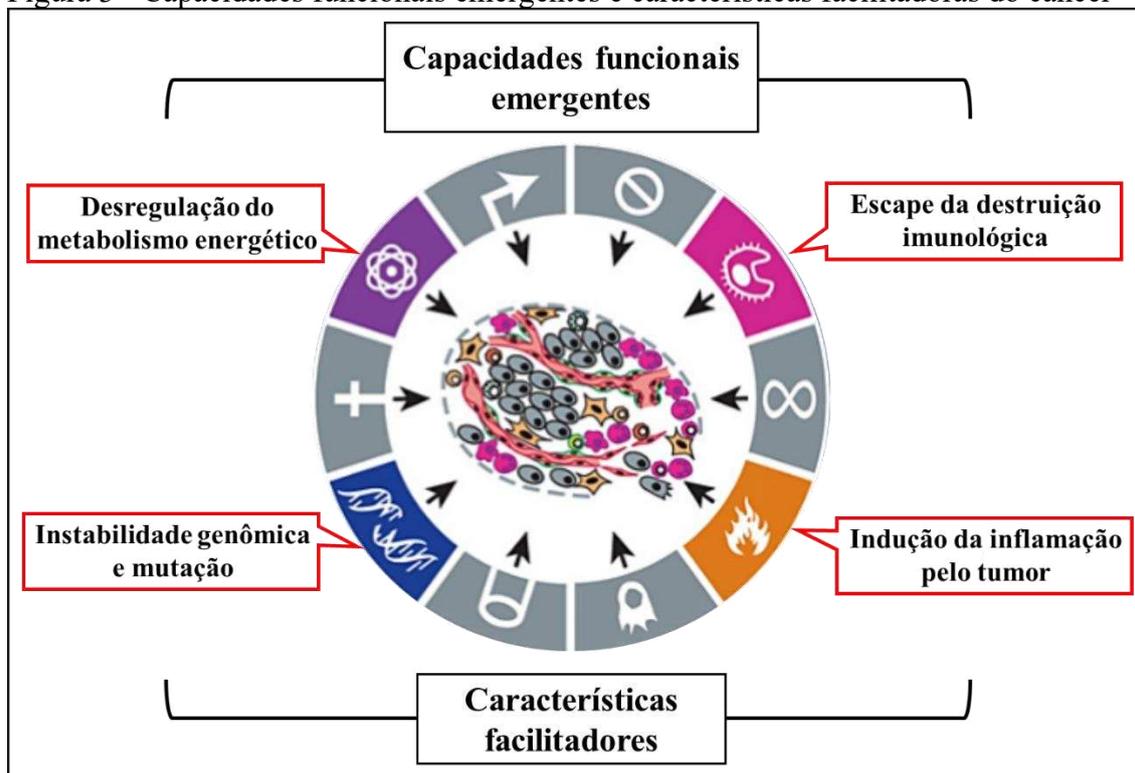


Fonte: Hanahan; Weinberg (2000, com adaptações).

Já no início da década passada, os autores publicaram um novo artigo propondo duas capacidades funcionais em adição às seis previamente propostas. Foram elas: i) Reprogramação do metabolismo energético e ii) Evasão do sistema imune. Sobre a primeira, as células tumorais adaptam seu metabolismo energético de modo a permitir seu crescimento acelerado, optando pela glicólise aeróbica em vez da fosforilação oxidativa, um processo conhecido como “efeito Warburg”. Além disso, as células transformadas desenvolvem estratégias para evitar a detecção e destruição pelo sistema imunológico do hospedeiro, como a modificação da expressão proteica para inibir células imunes, alteração de antígenos de superfície, e a criação de um microambiente imunossupressor. Esses mecanismos, fundamentais para a sobrevivência e proliferação tumoral, são alvos para terapias inovadoras como a imunoterapia. Por fim, além das duas capacidades funcionais propostas, foram sugeridas duas “características facilitadoras”, ou seja, características que facilitam o surgimento das capacidades funcionais. Foram elas; i) Instabilidade genômica e ii) Indução da inflamação (Figura 3). A instabilidade genômica, resultante de falhas no reparo do DNA, acelera a evolução do câncer ao permitir o acúmulo de mutações vantajosas, tendo como uma das consequências a

resistência a tratamentos. Já a inflamação crônica é reconhecida por seu papel dúbio na carcinogênese, podendo tanto combater quanto promover o desenvolvimento tumoral, através da indução de processos como proliferação celular, angiogênese e metástase (Hanahan; Weinberg, 2011).

Figura 3 - Capacidades funcionais emergentes e características facilitadoras do câncer

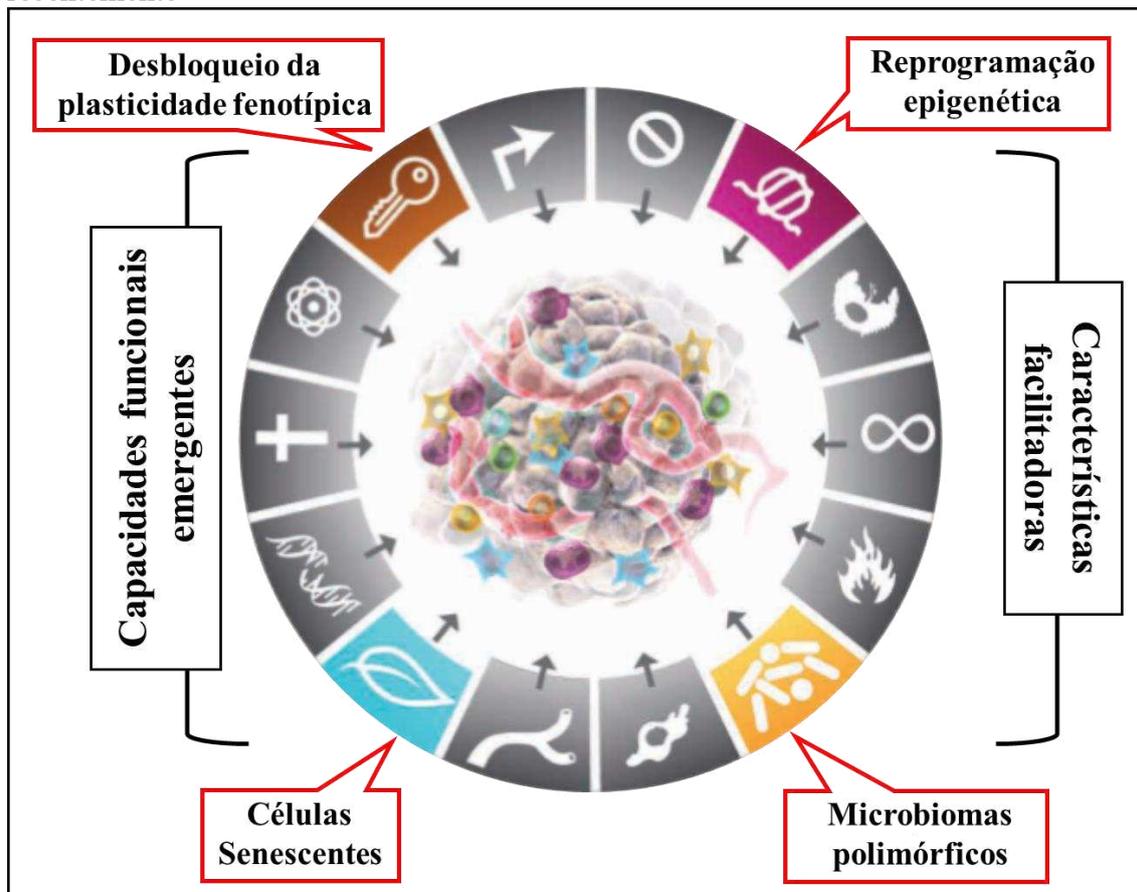


Fonte: Hanahan; Weinberg (2011, com adaptações).

Recentemente, Douglas Hanahan sugeriu nova expansão das capacidades funcionais e das características facilitadoras do câncer (Figura 4). Entre as capacidades funcionais propostas estão: i) Desbloqueio da plasticidade fenotípica e ii) Células senescentes. A plasticidade fenotípica refere-se à habilidade das células tumorais de reverter a diferenciação terminal, o que pode aumentar a resistência aos fármacos anticâncer e facilitar o processo de metástase. Já as células senescentes, embora inicialmente atuem como um mecanismo de defesa contra tumores, podem, em certos contextos, promover a progressão tumoral através de suas secreções parácrinas que afetam tanto células tumorais quanto não-tumorais, estimulando características cancerígenas. Em relação às características facilitadoras, o autor sugeriu a inclusão de: i) Microbiomas polimórficos e ii) Reprogramação epigenética não-mutacional. Pesquisas recentes apontam que certos perfis de microbiota podem favorecer o desenvolvimento de

câncer, através da mutagênese induzida por toxinas bacterianas ou por mimetizar sinais que promovem a proliferação celular, não se restringindo apenas ao cólon, mas influenciando também o sistema imune. Quanto à reprogramação epigenética, esta envolve mudanças na expressão gênica que não são resultado de mutações no DNA, contribuindo para que as células tumorais adquiram novas funcionalidades (Hanahan, 2022).

Figura 4 - Capacidades funcionais emergentes e características facilitadoras propostas recentemente



Fonte: Hanahan (2022, com adaptações).

1.1.1 A epidemiologia do câncer

O câncer já é o principal problema de saúde pública no mundo, sendo uma das principais causas de morte ao redor do globo. O câncer já representa a primeira ou a segunda causa de morte antes dos 70 anos em 112 países de 183 países estudados. Além disso, a incidência e a mortalidade por câncer vêm crescendo rapidamente ao redor do

globo. De acordo com o *Global Cancer Observatory* (GLOBOCAN) – um projeto global de pesquisa e monitoramento de câncer ligado à *International Agency for Research on Cancer* (IARC) - foram estimados, para o ano de 2020, aproximadamente 20 milhões de novos casos de câncer no mundo e para o ano 2040, estima-se 28,4 milhões de novos casos, indicando, portanto, um crescimento de 47% em relação a 2020. Este aumento é mais acentuado nos países em desenvolvimento (variando entre 64% e 95%) em comparação aos países desenvolvidos (onde o aumento previsto varia entre 32% e 56%). Essa diferença pode ser atribuída a alterações demográficas e a fatores de risco associados à globalização e ao crescimento econômico (Sung *et al.*, 2021).

Para o Brasil, as estimativas mais recentes divulgadas pelo Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) é de que ocorrerão em torno de 704 mil novos casos de câncer para cada ano do triênio 2023-2025, sendo o câncer de pele não melanoma o tipo mais incidente, com estimativa de 220.490 novos casos para cada ano do triênio (INCA, 2022). Além disso, excluindo o câncer de pele não melanoma e considerando uma divisão por sexo, o câncer de próstata apresenta a maior taxa de incidência em homens, enquanto o câncer de mama possui a maior taxa de incidência entre as mulheres (Figura 5).

Figura 5 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma (números arredondados para múltiplos de 10)

Localização Primária		Casos	%	
				Homens
	Próstata	20.650	38,1%	
Traqueia, brônquios e pulmões	3.450	6,4%		
Estômago	3.450	6,4%		
Cólon e reto	3.100	5,7%		
Cavidade oral	2.350	4,3%		
Leucemias	1.770	3,3%		
Esôfago	1.630	3,0%		
Fígado	1.600	2,9%		
Laringe	1.450	2,7%		
Sistema nervoso central	1.410	2,6%		
Localização Primária		Casos	%	
Mulheres	Mama feminina	15.690	28,1%	
	Colo do útero	5.280	9,5%	
	Glândula tireoide	4.060	7,3%	
	Cólon e reto	3.930	7,0%	
	Traqueia, brônquio e pulmão	3.120	5,6%	
	Estômago	2.230	4,0%	
	Ovário	1.960	3,5%	
	Corpo do útero	1.550	2,8%	
	Leucemias	1.530	2,7%	
	Sistema nervoso central	1.360	2,4%	

Fonte: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2023 (com adaptações)

Entre os cânceres de pele, o melanoma cutâneo é o tipo que apresenta a menor taxa de incidência (INCA, 2022). Entretanto, a elevada propensão para formar metástases torna o melanoma a forma mais letal de câncer cutâneo, sobretudo, quando não detectado precocemente (O'neill; Scoggins, 2019).

1.1.2 O melanoma cutâneo

O melanoma tem origem a partir dos melanócitos, células presentes na epiderme e folículos capilares da pele humana que produzem melanina, um pigmento que dá cor nossa pele, olhos e cabelos (Cichorek *et al.*, 2013).

A frequente exposição à radiação ultravioleta pode induzir mutações em melanócitos ou em células-tronco de melanócitos. Uma das mutações mais comuns em melanomas cutâneos humanos envolve a substituição de um aminoácido valina (V) por um aminoácido ácido glutâmico (E) na posição 600 da proteína codificada pelo proto-oncogene *BRAF*. Desse modo, a proteína BRAF-V600E, produto do oncogene *BRAF^{V600E}*, leva à hiperativação da via RAS/RAF/ERK, promovendo o aumento do crescimento e da sobrevivência das células transformadas (Centeno *et al.*, 2023).

Entre as abordagens terapêuticas sistêmicas para o tratamento do melanoma cutâneo a terapia alvo-direcionada e a imunoterapia são consideradas opções de “primeira-linha”. Pacientes positivos para *BRAF^{V600E}* se beneficiam com a terapia alvo-direcionada utilizando inibidores de BRAF, como vemurafenibe e dabrafenibe. Entretanto, apesar da elevada eficácia e rápida resposta, em alguns pacientes, os tumores podem desenvolver resistência aos fármacos. A imunoterapia, por outro lado, sobretudo o uso de inibidores do *checkpoint* imunológico como ipilimumabe (anticorpo anti-CTLA4), nivolumabe e pembrolizumabe (anticorpos anti-PD-1), tem sido aplicada com sucesso em pacientes com melanoma avançado, produzindo respostas duradouras. Porém, além dessa abordagem terapêutica possuir elevado custo, nem todos os pacientes respondem satisfatoriamente (Leonardi *et al.*, 2018).

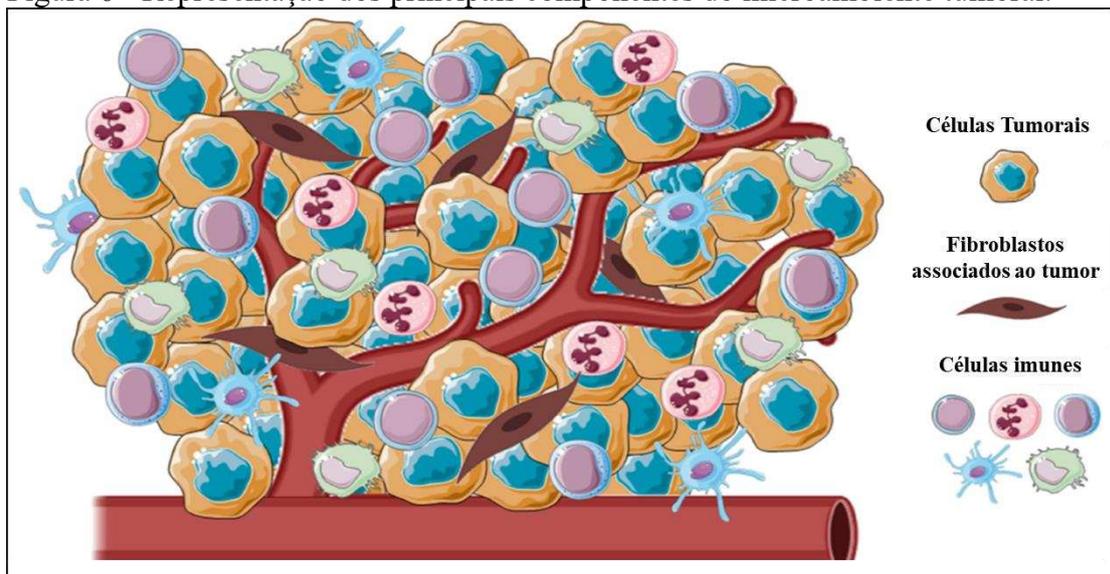
É importante destacar que tanto a terapia alvo-direcionada quanto a imunoterapia são influenciadas pelo ambiente no qual as células tumorais se encontram. De fato, fibroblastos podem secretar fatores parácrinos que ativam vias de sobrevivência nas células do melanoma, permitindo que escapem dos efeitos dos inibidores de BRAF (Falcone *et al.*, 2020). Por outro lado, uma das razões que podem explicar a falha da imunoterapia em alguns pacientes é que, apesar da imunogenicidade do melanoma (decorrente das diversas mutações que levam à formação de neoantígenos potencialmente reconhecíveis pelo sistema imunológico), a existência de um ambiente imunossupressor pode inibir a ativação de uma resposta imune antitumoral efetiva (Kharouf *et al.*, 2023; Pitcovski *et al.*, 2017).

1.1.3 O microambiente tumoral

Em 1889, Stephen Paget elaborou a hipótese da "semente e do solo", segundo a qual a disseminação das células tumorais ("sementes") dependia de encontrar um ambiente ("solo") que fosse propício ao seu crescimento explicando, assim, a formação de metástases no câncer. A compreensão moderna do microambiente tumoral (MAT) corrobora a hipótese de Page (Akhtar *et al.*, 2019).

De fato, o tumor não é apenas uma mera coleção de células tumorais. Ao contrário, os tumores são formados por células tumorais (parênquima) e não-tumorais (estroma) que interagem entre si de modo dinâmico e complexo durante o desenvolvimento do câncer auxiliando a sobrevivência, invasão e disseminação metastática das células tumorais. O estroma tumoral é formado por fibroblastos, adipócitos, células endoteliais, células imunes, bem como matriz extracelular. Todos esses elementos desempenham papéis fundamentais na sobrevivência, invasão e disseminação do câncer (Figura 6). O MAT pode tanto suprimir quanto promover o crescimento do tumor, variando de acordo com o tipo e estágio do tumor. Portanto, compreender o MAT é essencial para desenvolver tratamentos eficazes, como terapias antiangiogênicas e imunoterapias que visam pontos de controle imunológicos (Anderson; Simon, 2020).

Figura 6 - Representação dos principais componentes do microambiente tumoral.



Fonte: Adaptado de Polidoro e colaboradores (2020)

O microambiente tumoral (MAT) tem um papel fundamental na progressão do câncer, influenciando desde a invasão tecidual até a metástase, através da remodelação da matriz extracelular e da liberação de enzimas como as metaloproteinases de matriz (MMPs). Fibroblastos associados ao câncer (CAFs) no MAT promovem a motilidade e invasividade tumoral. O MAT também ajuda na formação de vasos sanguíneos (angiogênese) - essencial para o suprimento de nutrientes e oxigênio ao tumor e para o processo de metástase - ao estimular a produção de citocinas como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Ademais, o MAT também pode suprimir a resposta imune contra o tumor ao recrutar células imunorreguladoras como linfócitos T reguladores (Tregs), além de produzir citocinas imunossupressoras, facilitando a evasão tumoral do sistema imunológico (Franco *et al.*, 2020).

Dada a importância do MAT para a progressão tumoral, diversas estratégias terapêuticas direcionadas às células estromais tem sido objeto de pesquisa nas últimas décadas. Uma das vantagens de utilizar o MAT como alvo terapêutico se deve ao fato de que as células não tumorais são geneticamente mais estáveis comparadas às células tumorais, que são mais propensas a desenvolver resistência a fármacos em razão da instabilidade genética. Por outro lado, a combinação de terapias direcionadas às células tumorais e não tumorais pode ser mais eficaz e trazer mais benefícios para os pacientes por produzir efeitos sinérgicos (Xiao *et al.*, 2021).

Nesse contexto, é importante mencionar o pioneirismo do trabalho de Judah Folkman que nos anos 70 já defendia a inibição da formação de novos vasos sanguíneos no MAT como estratégia antitumoral. A aprovação em 2004 do anticorpo monoclonal bevacizumab (anti-VEGF-A) pelo FDA representou um importante marco, sendo a primeira terapia direcionada a um componente do MAT aprovada para uso clínico (Egginton *et al.*, 2014; Folkman, 1971; Santhosh *et al.*, 2015).

Outras abordagens terapêuticas visam a modulação da resposta imune no MAT e são denominadas coletivamente de “imunoterapia”. A imunoterapia tem revolucionado o tratamento do câncer e parte da premissa básica de que o sistema imune do hospedeiro pode, sob certas circunstâncias, identificar e eliminar células neoplásicas malignas. As principais estratégias de imunoterapia contra o câncer incluem: terapias com vírus oncolíticos, que estimulam a imunidade antitumoral; vacinas que ativam respostas imunes via antígenos tumorais; uso de citocinas para modular a imunidade; transferência de células adotivas, como linfócitos infiltrantes de tumores (TILs) ou células T

modificadas, para atacar o câncer; e inibidores de checkpoint imunológico, que reativam a resposta imune (Zhang *et al.*, 2020)

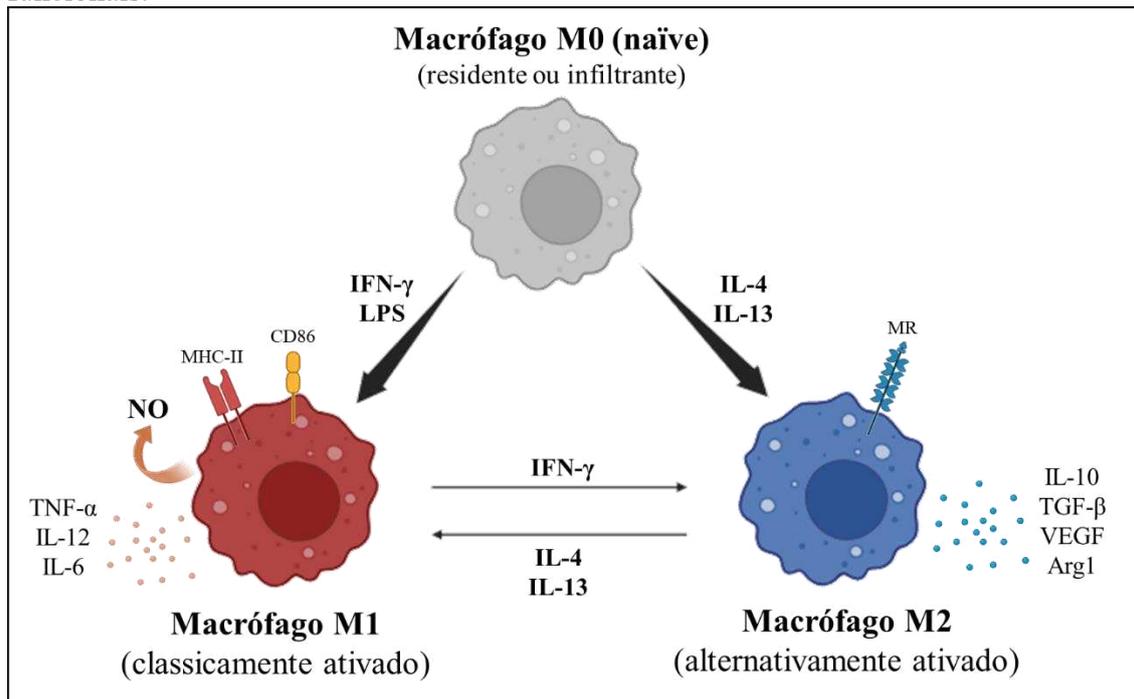
Outras estratégias que vem sendo pesquisadas utilizam macrófagos associados ao tumor (TAMs) como alvos, uma vez que essas células imunes estão infiltradas em grande quantidade no MAT e desempenham papéis fundamentais em todos os estágios da progressão tumoral (Allavena; Mantovani, 2012; Ngambenjawong *et al.*, 2017);

1.1.4 Os macrófagos como alvo de estratégias terapêuticas antitumorais

Os macrófagos (Mfs) são células altamente versáteis do sistema imunológico, essenciais para a manutenção da homeostase, cicatrização de feridas e imunidade. Embora desempenhem funções protetoras para o organismo, também podem promover inflamação crônica, um fator de risco para o desenvolvimento de câncer devido a danos ao DNA (Kloc *et al.*, 2017).

Os Mfs exibem notável plasticidade fenotípica em resposta a diversos estímulos, refletindo sua capacidade de reprogramação funcional. Com base no paradigma Th1/Th2 dos linfócitos, os Mfs podem ser classificados em dois estados funcionais i) estado classicamente ativado (M1), induzido por LPS, IFN- γ e outras citocinas e caracterizado pela produção de óxido nítrico (NO) e citocinas pró-inflamatórias. Os Mfs M1 possuem função pró-inflamatória; ii) estado alternativamente ativado (M2), induzido por IL-4 e IL-13 e caracterizado pela produção de arginase e citocinas anti-inflamatórias como TGF- β 1. Os Mfs M2 estão envolvidos na reparação tecidual e supressão da imunidade adaptativa (Mills *et al.*, 2000). A Figura 7 resume as principais características dos estados funcionais M1 e M2.

Figura 7 - Paradigma da polarização fenotípica de macrófagos para dois estados funcionais.



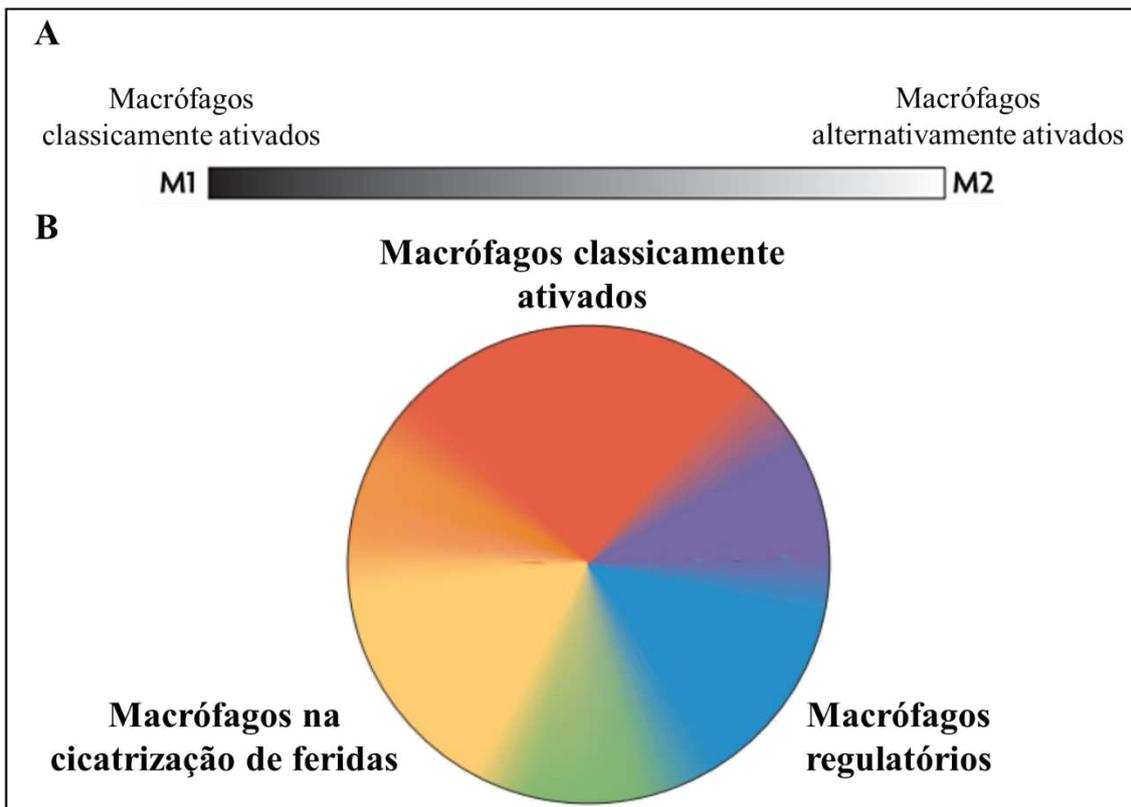
Fonte: Elaborado pelo autor com BioRender.com

Martinez e colaboradores (2008) sugeriram a subclassificação dos Mfs M2 em M2a, M2b, e M2c, baseados em estímulos de ativação específicos e funções distintas, abrangendo reparação de tecidos, respostas imunes regulatórias, e supressão da resposta imune, respectivamente. Assim, M2a é ativado por IL-4 e IL-13, está relacionado à reparação tecidual e fibrose; M2b responde a imunocomplexos e sinais de receptores do tipo Toll ou IL-1R, mediando respostas imunes regulatórias e inflamatórias; e M2c é induzido por IL-10, TGF- β , ou glicocorticoides, estando relacionado à supressão da resposta imune e remodelação tecidual (Martinez *et al.*, 2008)

Entretanto, a realidade biológica dos Mfs é bem mais complexa e mais fluida do que essas classificações podem sugerir. Consequentemente, os fenótipos M1 e M2 podem representar extremos de um amplo espectro de estados funcionais. Nesse sentido, Mosser e Edwards (2010) propuseram uma ampliação da classificação dos Mfs com base nas funções fundamentais que estão envolvidas na manutenção da homeostase que são: defesa do hospedeiro, cicatrização de feridas e regulação imune. A classificação de Mfs de acordo com essas funções fornece três populações básicas de Mfs, análogas às três cores primárias em uma roda de cores (Figura 8). Esta classificação também ajuda a ilustrar como os Mfs podem evoluir para apresentar características que são

compartilhadas por mais de uma população de Mfs, análogo a cores secundárias em uma roda de cores. Além disso, traz os Mfs M1 mais próximos dos outros dois tipos de células, permitindo o desenvolvimento de Mfs que compartilham características de duas populações. Na verdade, pode haver muitos tipos diferentes de ativação que ainda não foram identificados, resultando em um "espectro" de populações de Mfs com base em sua função (Mosser; Edwards, 2010).

Figura 8 - Representação do espectro da plasticidade fenotípica dos macrófagos.

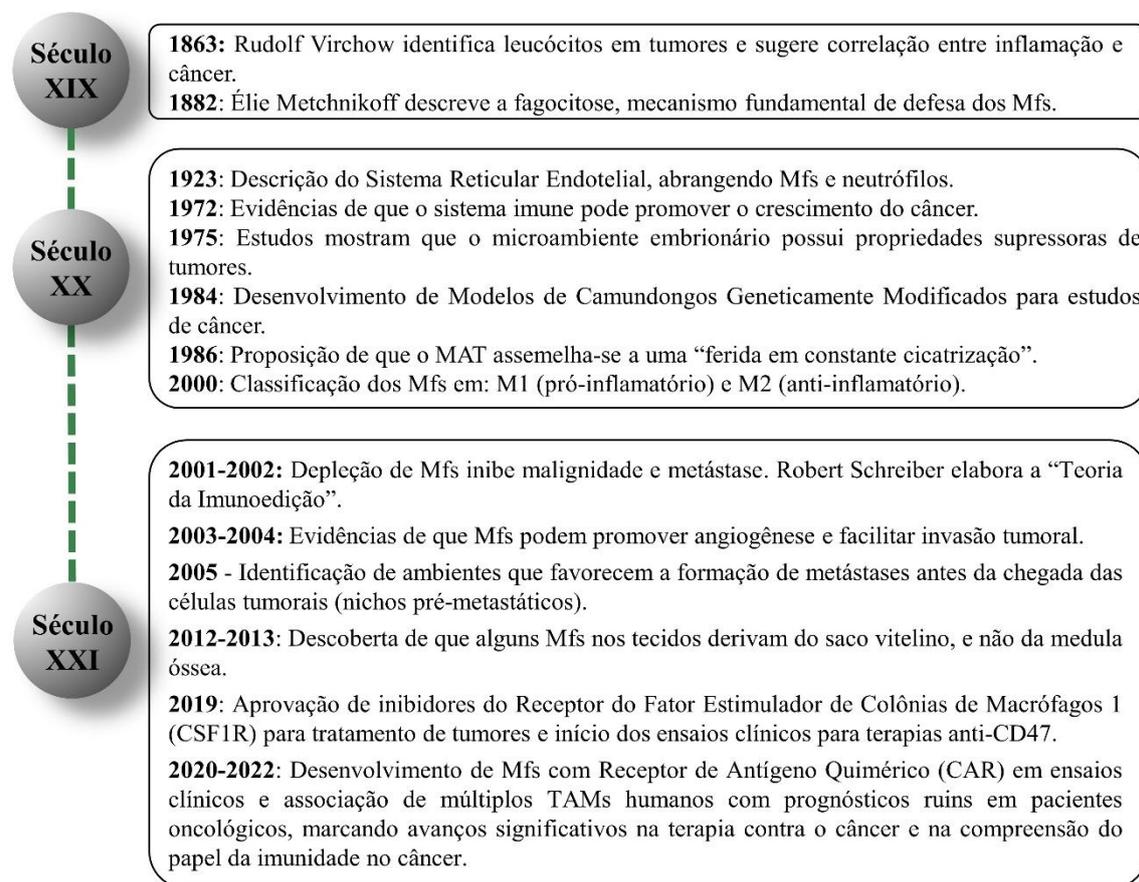


Fonte: Adaptado de Mosser e Edwards (2010).

O conhecimento sobre a relação dos Mfs com o câncer foi evoluindo ao longo do tempo. A ideia de que os Mfs podem exercer tanto funções antitumorais quanto pró-tumorais nem sempre foi clara. Em um artigo de revisão publicado recentemente, Cassetta e Pollard compilaram e analisaram as descobertas mais significativas dos últimos 120 anos sobre a biologia dos TAMs e seu impacto no MAT (Figura 9). Além disso, o trabalho enfatiza que o uso de tecnologias emergentes tem permitido explorar a complexidade dos TAMs em tumores humanos e sugere que a aplicação desses recursos em amostras de pacientes que não responderam a terapias anteriores poderá ajudar a entender melhor como os TAMs se adaptam e resistem à terapia antitumoral, abrindo caminho para o

desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas mais precisas e eficazes (Cassetta & Pollard., 2023).

Figura 9 - Linha do tempo com os principais marcos históricos na pesquisa dos macrófagos associados a tumores e do microambiente tumoral.



Fonte: Adaptado de Cassetta e Pollard (2023)

Durante a carcinogênese, o fenótipo dos Mfs presentes no MAT é modulado. No início, os Mfs possuem funções imunoestimulantes, mas, conforme o tumor progride, eles são influenciados por fatores como CSF-1, IL-4, IL-10, TGF- β e ácido láctico, presentes no MAT, adotando um fenótipo pró-tumoral. No MAT, os TAMs facilitam a progressão do tumor de diversas formas, incluindo: supressão da imunidade, estímulo à angiogênese, facilitação da metástase e promoção do crescimento tumoral por meio da liberação de fatores de crescimento e citocinas (Colegio *et al.*, 2014).

Uma vez que os TAMs desempenham papéis fundamentais para a progressão tumoral e diversos estudos têm correlacionado uma alta densidade de TAMs em tumores sólidos a um pior prognóstico para o paciente a escolha dos Mfs como alvo terapêutico

constitui uma estratégia promissora (Chen *et al.*, 2019). Entre as abordagens direcionadas ao Mfs podemos destacar a modulação fenotípica que visa alterar o estado de ativação dos Mfs para exercer funções antitumorais (Kowal *et al.*, 2019; Jinushi *et al.*, 2015).

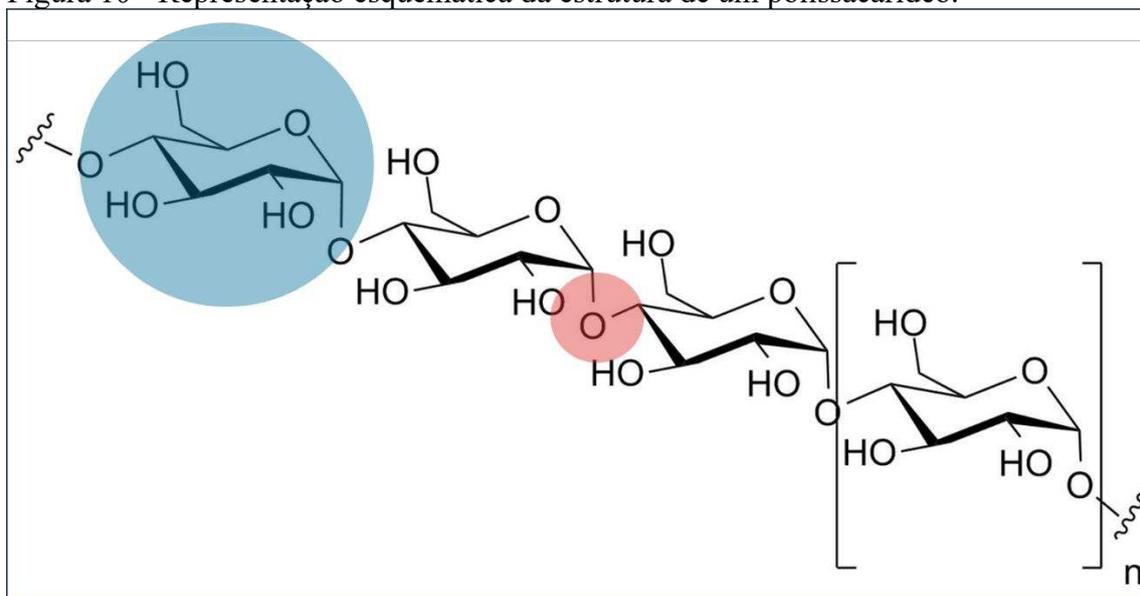
Nesse contexto, os produtos naturais podem desempenhar um papel importante na imunoterapia do câncer, podendo ajudar a remodelar o microambiente imunossupressor dos tumores, induzir morte celular imunogênica e atuarem como adjuvantes potencializando a resposta imune do hospedeiro (Dong *et al.*, 2022).

Entre os produtos naturais que vem sendo estudados nos últimos anos como moduladores da resposta imune, os polissacarídeos, de diversas fontes naturais, têm despontado como potenciais adjuvantes na quimioterapia do câncer, sendo capazes de ativar Mfs para fenótipos antitumorais. Desse modo, esses compostos podem desempenhar papel essencial na melhora da resposta imune e aumentar a eficácia da imunoterapia antitumoral (Li *et al.*, 2021).

1.2 Os polissacarídeos sulfatados de algas marinhas

Os polissacarídeos são polímeros naturais formados a partir da ligação de diversos resíduos de monossacarídeos por meio de ligação covalente do tipo O-glicosídica, como ilustrado na Figura 10 (Xiao *et al.*, 2017).

Figura 10 - Representação esquemática da estrutura de um polissacarídeo.



Fonte: Elaborado pelo autor. Círculo azul indica um resíduo de monossacarídeo. Círculo vermelho indica ligação O-glicosídica entre dois resíduos de monossacarídeos.

Quando os polissacarídeos apresentam grupos substituintes do tipo éster de sulfato ao longo de sua cadeia, conferindo carga elétrica negativa à macromolécula, eles são denominados polissacarídeos sulfatados (PS) (Muthukumar *et al.*, 2021).

Trabalhos publicados nos últimos anos têm demonstrado a existência de uma correlação entre o grau de sulfatação de polissacarídeos e suas atividades biológicas, sobretudo, atividades imunoestimulantes. Algumas revisões enfatizam que a estrutura, composição e presença e posição dos grupos do tipo éster de sulfato influenciam na ativação de Mfs para fenótipos semelhantes a M1 (Feng *et al.*, 2023; Kang *et al.*, 2022).

Os PS são encontrados em abundância nos organismos marinhos, incluindo vertebrados, invertebrados, micro-organismos, angiospermas marinhas, microalgas e macroalgas (Lee *et al.*, 2022; Nunes *et al.*, 2019). Entre as razões pelas quais os PS predominam nos organismos marinhos podemos citar a maior biodisponibilidade de íons sulfato (SO_4^{2-}) nos oceanos (25 - 28 mM) em relação ao ambiente terrestre (10 - 50 μM) (Bochenek *et al.*, 2013) e a vantagem adaptativa conferida pelos PS como resultado das funções biológicas altamente relevantes que desempenham para as espécies que habitam o ambiente marinho. Embora os detalhes das funções biológicas não estejam completamente elucidados, sabe-se que os PS desempenham papéis na osmorregulação, fornecimento de flexibilidade mecânica contra a ação das ondas do mar (Kloareg & Quatrano, 1988), proteção contra patógenos (PERCIVAL, 1979) e auxiliam na sobrevivência das espécies que habitam zonas intertidais, uma vez que previnem a dessecação em razão das propriedades hidrofílicas que retém água no interior do organismo (Arata *et al.*, 2017).

A despeito da diversidade de organismos marinhos que sintetizam PS, as macroalgas marinhas merecem destaque por serem uma fonte rica dessas biomoléculas que vem sendo exploradas há décadas por diversos setores da indústria, como: alimentício, cosmético e farmacêutico (Jiao *et al.*, 2011).

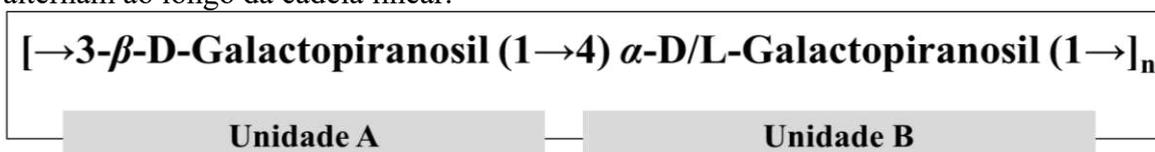
Com base no tipo de pigmento acessório, as macroalgas são classificadas, em três grupos taxonômicos: Chlorophyta (algas verdes), Ochrophyta (algas pardas) e Rhodophyta (algas vermelhas) (Mantri *et al.*, 2020). Os PS variam entre os grupos taxonômicos quanto ao peso molecular, tipo de monossacarídeo mais abundante, posição das ligações glicosídicas, posição dos substituintes (incluindo grupos sulfato), entre outras características. Nas algas verdes, os PS são representados pelas ulvanas, presentes

espécies do gênero *Ulva*; Ramnanas, encontradas em espécies do gênero *Monostroma* e arabinogalactanas, identificadas em espécies do gênero *Codium* (Hentati *et al.*, 2020). Nas algas pardas, os PS são representados pelas fucoidanas e nas algas vermelhas, pelas galactanas (Gurpilhares *et al.*, 2015).

1.2.1 As galactanas sulfatadas

Em relação à estrutura, as galactanas exibem uma cadeia linear, formada pela alternância dos resíduos β -D-galactopiranosil 3-ligado, denominado “unidade A”, e α -D/L-galactopiranosil 4-ligado, denominado “unidade B” (Mourão, 2015; Usov, 2011). Um esquema geral da estrutura das galactanas é apresentado na Figura 11.

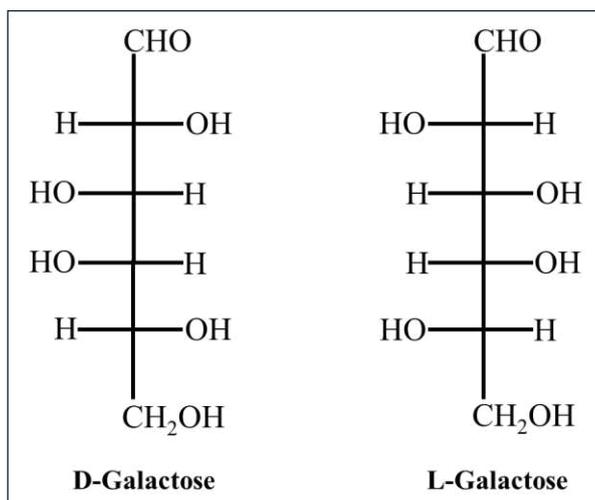
Figura 11 - Esquema da estrutura das galactanas formada pelas unidades A e B que se alternam ao longo da cadeia linear.



Fonte: elaborado pelo autor.

Dependendo de qual enantiômero da galactose a unidade B deriva, as galactanas são divididas em dois grupos cujas denominações aqui adotadas seguem o sistema de nomenclatura proposto por Knutsen e colaboradores (1994). Assim, quando a unidade B deriva da L-galactose, a galactana pertence ao grupo ágar. Em contrapartida, quando a unidade B deriva da D-galactose, a galactana pertence ao grupo carragenana (Figura 12). Além disso, resíduos 3,6-anidro- α -D/L-galactopiranosil 4-ligado podem ser encontrados tanto nas agaranas quanto nas carragenanas (Knutsen *et al.*, 1994).

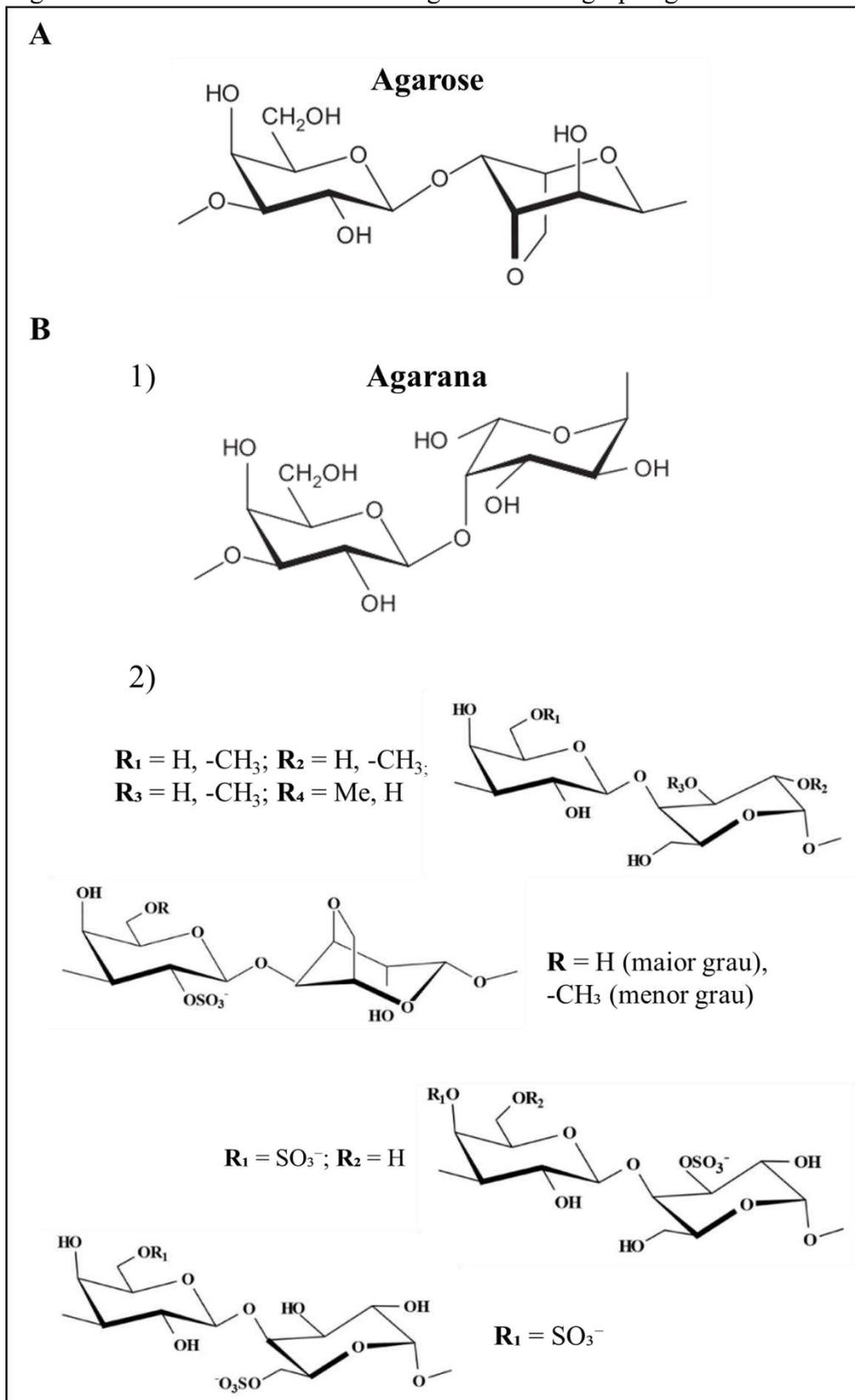
Figura 12 – Representação dos enantiômeros da galactose por meio da projeção de Fischer.



Fonte: elaborado pelo autor.

As algas vermelhas que produzem galactanas do grupo ágar são denominadas agarófitas (Sánchez *et al.*, 2023). O termo ágar (também denominado ágar-ágar) abrange tanto a agarose, um polissacarídeo neutro de estrutura regular (Figura 13-A), quanto seus precursores e derivados. Inclui também polissacarídeos com estrutura do tipo agarana que possuem sulfato e outros substituintes ao longo da cadeia principal (Figura 13-B), além de exibir graus variados de resíduos 3,6-anidro- α -L-galactopiranosil em sua estrutura (Knutsen *et al.*, 1994).

Figura 13 - Diversidade estrutural das galactanas do grupo ágar

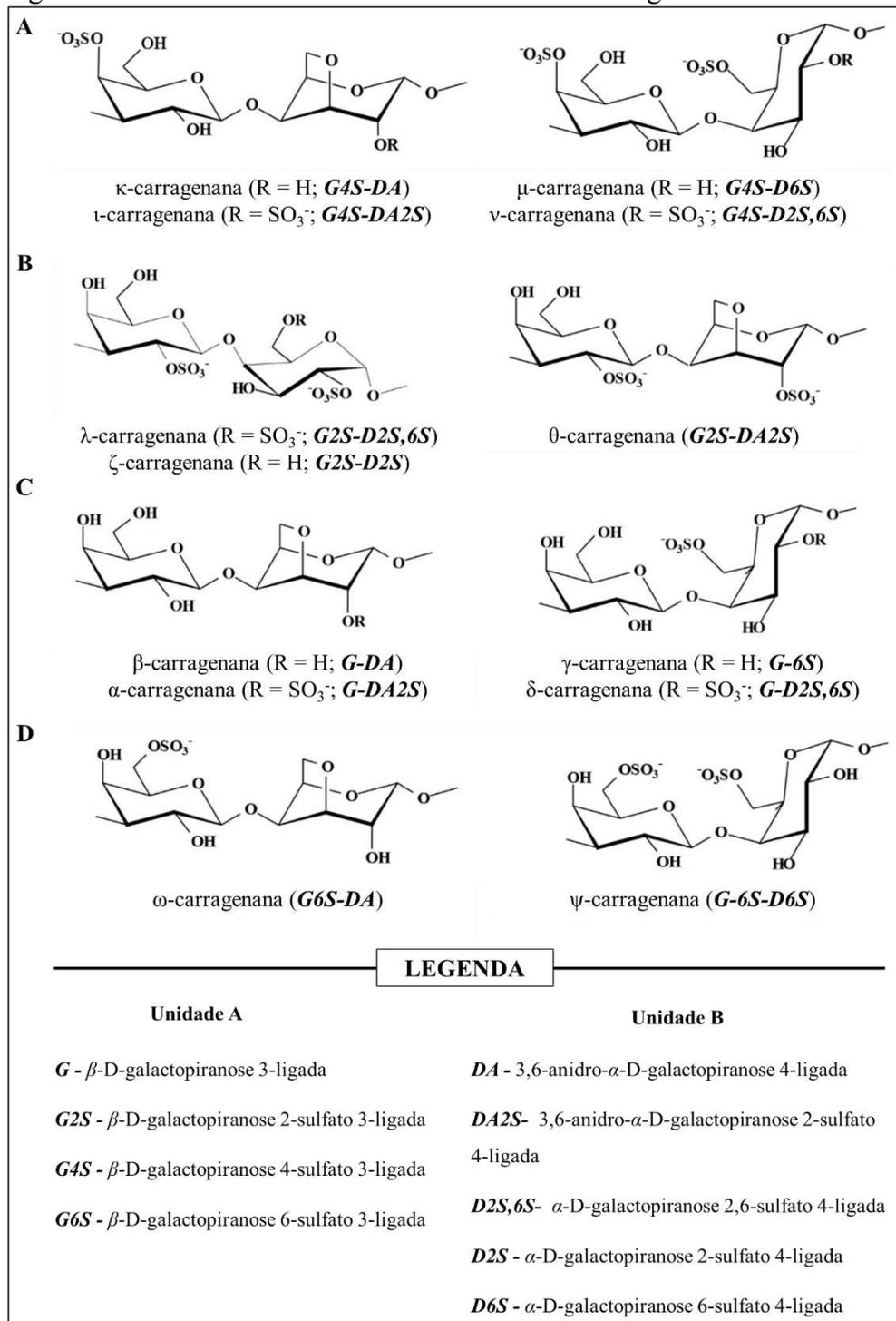


Fonte: Adaptado de Usov (2011) e Ciancia *et al.* (2020). **A** Representação da estrutura química da agarose. **B** 1) Representação da estrutura química da agarana (teoricamente definida). 2) Representação da estrutura química de algumas agaranas de ocorrência natural.

Em contrapartida, as algas vermelhas que produzem galactanas do grupo carragenana são denominadas carragenófitas (Sánchez *et al.*, 2023) e pertencem à ordem taxonômica Gigartinales (Véliz *et al.*, 2017).

Historicamente, as carragenanas têm sido representadas por letras do alfabeto grego. Porém, com o aumento da complexidade e variedade de padrões de sulfatação, surgiu a necessidade de um sistema mais preciso e descritivo. Assim, como alternativa, foi proposto um sistema de nomenclatura que usa códigos para representar estruturas e padrões de sulfatação dos diferentes dissacarídeos (Knutsen *et al.*, 1994). As estruturas químicas de diferentes carragenanas estão representadas na Figura 14.

Figura 14 - Diversidade estrutural das famílias de carragenanas



Fonte: Adaptado de Ciancia *et al* (2020). As letras indicam as famílias de carragenanas (**A** - família κ ; **B** - família ι ; **C** - família β e **D** - família ω). Cada carragenana está representada por uma letra do alfabeto grego e, entre parênteses, um código de letras e números representa as unidades A e B da cadeia principal e a posição do grupo sulfato, como proposto por Knutsen *et al.* (1994).

1.2.2 Galactanas sulfatadas bioativas de uma agarófita e uma carragenófita encontradas no litoral cearense

Espécies de algas marinhas vermelhas do gênero *Gracilaria* têm sido coletadas na região Nordeste do Brasil desde a década de 1960 para a extração de ágar para fins comerciais (Marinho-Soriano, 2017).

A espécie *Gracilaria cornea* J. Agardh (Ordem: Gracilariales, Família: Gracilariaceae) é uma agarófita que pode ser encontrada em diversos pontos do litoral cearense (Figura 15). Essa espécie apresenta particular importância em razão do seu bom rendimento de ágar, sendo considerada de relevância econômica para o país (Robledo; Freile-Pelegrín, 2011).

Figura 15 - Fotografia de um exemplar da espécie *G. cornea*



Fonte: Arquivo pessoal

Entretanto, a importância de *G. cornea* não se limita à Economia, despertando interesse também na área biomédica. Trabalhos publicados nos últimos anos vêm relatando algumas atividades biológicas, como: atividade antinoceptiva e anti-inflamatória (Coura *et al.*, 2012a; Coura *et al.*, 2015; Coura *et al.*, 2017), atividade neuroprotetora (Souza *et al.*, 2017) e atividade ansiolítica (Monteiro *et al.*, 2016). Além disso, a estrutura e composição química das GS de *G. cornea* já foram determinadas (Melo *et al.*, 2002). Os resultados estão sumarizados na Tabela 1.

Tabela 1 - Características estruturais das galactanas sulfatadas de *Gracilaria cornea*

Composição química	Posição de grupos sulfato	DS (Degree of Substitution)	Massa Molar (g x mol ⁻¹)
Galactose (64,6%); 3,6-anidrogalactose (24,7%); 6-O-Metil-galactose (8,5%); Glucose (1,5%); Xilose (0,7%)	C4 e e pequeno grau de substituição em C6 da galactose	0,22	Entre 1,8×10 ⁴ e 2,1×10 ⁶

Fonte: Adaptado de Melo e colaboradores (2002)

A espécie *Solieria filiformis* (Kützing) PW. Gabrielson (Ordem: Gigartinales, Família: Solieraceae), por sua vez, é considerada uma das mais promissoras fontes para obtenção de carragenanas destinadas a atender a demanda do mercado mundial (Robledo & Freile-Pelegrín, 2011). No Ceará, um projeto de cultivo de *S. filiformis* (Figura 16) vem sendo desenvolvido experimentalmente com o envolvimento de pesquisadores da Universidade Federal do Ceará em parceria com a Associação de Produtores de Algas de Flecheiras e Guajiru (APAFG).

Figura 16 - Fotografia de um exemplar da espécie *S. filiformis*

Fonte: Algaebase

Em relação ao potencial farmacológico das GS de *S. filiformis*, estudos têm evidenciado algumas atividades biológicas, incluindo: efeito pró-inflamatório (Assreuy *et al.*, 2010), antinoceptivo (Araújo *et al.*, 2017); anticoagulante (Rodrigues *et al.*, 2009), gastroprotetor (Sousa *et al.*, 2016), antioxidante (Sousa *et al.*, 2016); anti-leishmaniose (Lehnhardt Pires *et al.*, 2013) e antiviral (Morán-Santibañez *et al.*, 2016).

A composição e estrutura química das GS de *S. filiformis* também já foram determinadas revelando que essa carragenófito produz tanto ι-carragenana quanto κ-*kappa* (Murano *et al.*, 1997; Araújo *et al.*, 2011 e Sousa *et al.*, 2016). A Tabela 2 resume as informações sobre composição e estrutura química das GS de *S. filiformis*.

Tabela 2 – Características estruturais das galactanas sulfatadas de *Solieria filiformis*

Composição	DS (Degree of Substitution)	Massa Molar (g x mol⁻¹)
Predominância de resíduos de β -D-galactopiranosose-4-sulfato (<i>G4S</i>) e 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose-2-sulfato (<i>DA2S</i>) – ι-carragenana	1,08	210,4 (Pico)
Resíduos de β -D-galactopiranosose 4-sulfato (<i>G4S</i>) e 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose (<i>DA</i>) – κ-carragenana .		

Fonte: Adaptado de Murano e colaboradores (1997); Araújo e colaboradores (2011) e Sousa e colaboradores (2016)

Apesar dos diversos trabalhos com GS de *G. cornea* e *S. filiformis* demonstrando efeitos biológicos em diferentes modelos seja *in vitro* ou *in vivo*, o potencial imunoestimulante dessas GS em um contexto antitumoral ainda não foi explorado.

2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

O câncer representa um dos maiores desafios de saúde pública, especialmente nos países em desenvolvimento, onde a limitação de recursos e a falta de acesso a tratamentos avançados intensificam sua gravidade (Cazap *et al.*, 2016). Entre os vários tipos de câncer, o câncer de pele do tipo melanoma, apesar de apresentar baixa incidência é notoriamente agressivo por sua propensão à metástase, tornando-o particularmente perigoso (Pieniasek *et al.*, 2018).

Em relação aos agentes quimioterápicos citotóxicos disponíveis para o tratamento do câncer, apesar de eficazes, eles podem causar efeitos colaterais graves aos pacientes, como dor, náuseas, diarreia, perda de cabelo, depressão do sistema imunológico, entre outros. Esses efeitos resultam da falta de seletividade, pois as células tumorais não são as únicas afetadas pelos quimioterápicos (BAUDINO, 2015). Nesse contexto, um número crescente de terapias focadas no sistema imunológico para reconhecer e eliminar as células tumorais estão sendo testadas em ensaios pré-clínicos e clínicos. Uma dessas abordagens consiste em utilizar monócitos e macrófagos (Mfs) como alvos de imunoterapia (Sawa-Wejksza *et al.*, 2017).

Embora não sejam as principais células efetoras da imunidade inata contra tumores, os Mfs são abundantes no microambiente tumoral (MAT) e desempenham funções tão importantes que têm se tornado alvos terapêuticos promissores, uma vez que sua reprogramação ou eliminação pode retardar ou até mesmo reverter a progressão do câncer (Noy; Pollard, 2014). Entre as funções pró-tumorais que os macrófagos associados ao tumor (TAMs) desempenham, podemos destacar: i) Promoção da angiogênese pelo aumento da secreção de VEGF; ii) Imunossupressão pela produção de citocinas imunossupressoras, como IL-6 e IL-10 que podem inibir a imunidade antitumoral do hospedeiro. Além disso, os TAMs também podem alterar a apresentação de antígenos e a resposta imune mediada por linfócitos T, pelo aumento da secreção de TGF- β e iii) Favorecimento da metástase por meio da expressão de metaloproteases de matriz, como MMP-2 e MMP-9, que degradam proteínas da matriz extracelular facilitando a invasão de tecidos (Singh *et al.*, 2017).

A busca por novos compostos que possam favorecer a ativação do sistema imune é de grande relevância no contexto do câncer. Nesse sentido a natureza é fonte abundante de compostos bioativos com potencial antitumoral que podem ser encontrados

nos mais diversos ecossistemas. Entretanto, o ambiente marinho, em particular, ainda permanece subexplorado, em parte devido às dificuldades para acessá-lo. Apesar disso, a pesquisa com organismos marinhos já levou à descoberta de moléculas com atividade antitumoral, como a citarabina (Ara-C), derivada da esponja marinha *Tectitethya crypta*, tendo sido a primeira molécula de origem marinha aprovada para uso clínico, e a trabectedina (Yondelis) isolada da ascídia *Ecteinascidia turbinata* (Jimenez *et al.*, 2018).

Além disso, ecossistema marinho abriga uma diversidade de organismos que são fonte de uma classe de biomoléculas promissoras que tem sido descritas como pouco tóxicas, com elevado potencial biotecnológico e com diversas atividades biológicas já descritas na literatura, especialmente aquelas relacionadas à imunestimulação: os polissacarídeos sulfatados (PS) (Cunha; Grenha, 2016; Zaitseva *et al.*, 2022). Dentre os organismos que sintetizam PS, as algas marinhas se destacam pela elevada produção desses compostos e pela facilidade de acesso e potencial de cultivo. As algas vermelhas, em especial, são de grande importância econômica para o nosso país, especialmente o gênero *Gracilaria*, que vem sendo explorado desde a década de 1960. Entretanto, o extrativismo intenso e descontrolado para a extração de ágar e carragenana, principalmente no nordeste do Brasil, levou a uma queda significativa nas populações nativas, resultando em um declínio acentuado na indústria de algas. Apesar disso, nosso país possui condições para se tornar um produtor de biomassa de algas através da maricultura, em razão do seu clima, topografia, condições ambientais favoráveis e espécies nativas com bom potencial para cultivo, trazendo ainda impacto social e econômico para as famílias de pescadores locais já que pode representar uma fonte de renda alternativa (Marinho-Soriano, 2017).

Por fim, o conhecimento e a exploração responsável de nossos recursos naturais marinhos são essenciais para garantir que o Brasil não apenas proteja a biodiversidade da sua “Amazônia azul” (zona econômica exclusiva do Brasil no Oceano Atlântico) mas também avance na produção de conhecimento científico, uma vez que, até o momento, o país tem contribuído de forma modesta ao campo da farmacologia marinha, que ainda carece de investigações abrangentes e aprofundadas acerca da bioatividade de compostos marinhos (Wilke *et al.*, 2021). Assim, investir na pesquisa dos PS de algas da nossa biodiversidade transcende a questão científica, configurando-se como uma estratégia para assegurar que o nosso país se posicione como líder na pesquisa e inovação

em farmacologia e biotecnologia, reduzindo a dependência de tecnologias e produtos importados e reforçando sua soberania no cenário global.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar se galactanas sulfatadas (GS) obtidas das algas marinhas vermelhas *Gracilaria cornea* e *Solieria filiformis* são capazes de ativar macrófagos para um fenótipo antitumoral.

3.2 Específicos

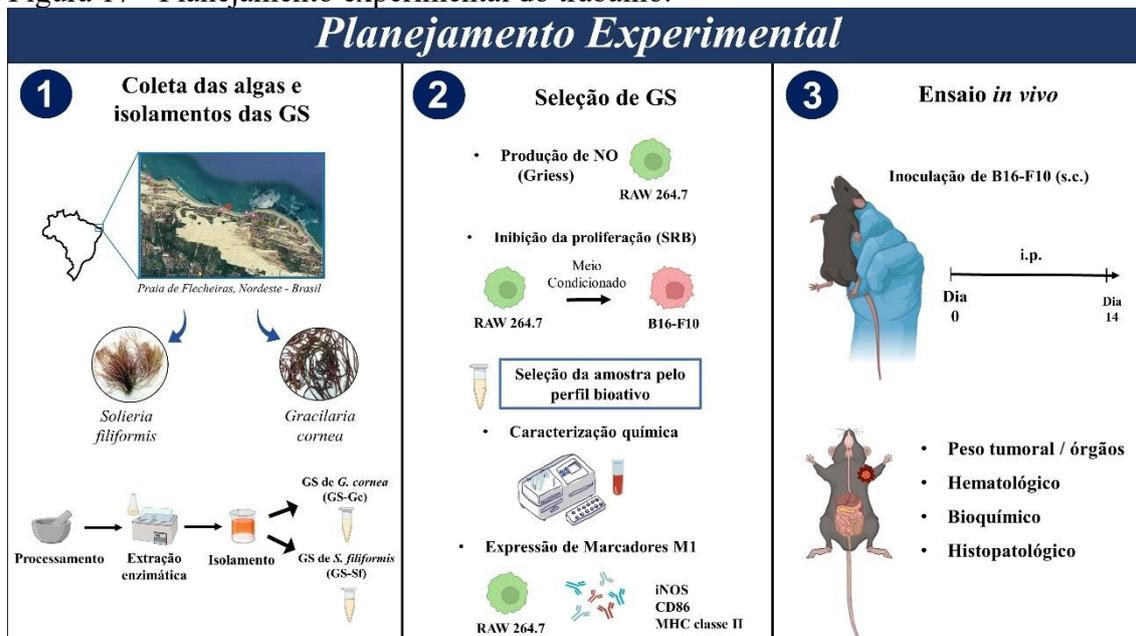
- Avaliar se GS obtidas de *G. cornea* (GS-Gc) e *S. filiformis* (GS-Sf) são capazes de induzir a produção de óxido nítrico (NO) em uma linhagem de macrófagos murinos (RAW 264.7);
- Avaliar se GS-Gc e GS-Sf são capazes de inibir diretamente o crescimento tumoral de uma linhagem de melanoma murino (B16-F10);
- Avaliar se o meio-condicionado (MC) de RAW 264.7 estimulada com GS-Gc ou GS-Sf é capaz de inibir o crescimento de B16-F10;
- Selecionar a amostra capaz de induzir RAW 264.7 a liberar NO e fatores antiproliferativos sem exibir citotoxicidade direta contra B16-F10;
- Realizar *in vitro* caracterizações fenotípicas adicionais em RAW 264.7 estimulada com a amostra selecionada com base no perfil bioativo;
- Realizar caracterização química da amostra selecionada;
- Avaliar se a amostra selecionada é capaz de inibir o crescimento tumoral em um modelo de melanoma murino;
- Avaliar se a amostra selecionada exibe toxicidade *in vivo*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Planejamento experimental

As espécies de macroalgas marinhas vermelhas *Gracilaria cornea* J. Agardh e *Solieria filiformis* (Kützinger) P.W. Gabrielson foram obtidas na Praia de Flecheiras, localizada no município de Trairi, Ceará. Para o isolamento das Galactanas Sulfatadas (GS) utilizamos um protocolo de extração enzimática. Para a seleção da amostra com base no perfil bioativo, realizamos ensaios *in vitro* para avaliar ativação de uma linhagem de macrófagos murino (RAW 264.7) para um fenótipo antitumoral e para avaliar a citotoxicidade contra uma linhagem de melanoma metastático murino (B16-F10). A amostra selecionada foi utilizada em ensaios *in vitro* adicionais a fim de melhor caracterizar o fenótipo de RAW 264.7. Além disso, a amostra foi caracterizada quimicamente para obtermos informações sobre o rendimento do processo de extração, composição química e eventual presença de contaminantes proteicos. Por fim, o potencial antitumoral da galactana investigado utilizando um modelo de melanoma murino. A Figura 17 resume a sequência de experimentos adotada neste trabalho.

Figura 17 - Planejamento experimental do trabalho.

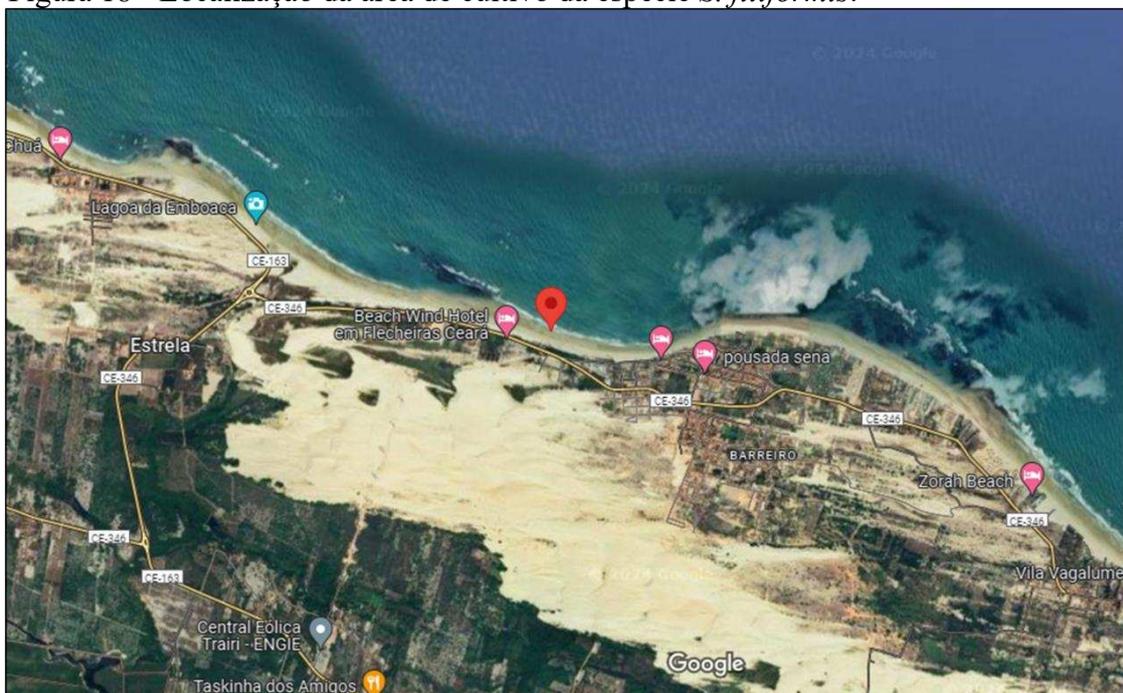


Fonte: elaborado pelo autor

4.2 Obtenção das algas

Espécimes de *G. cornea* foram coletados em uma região da praia que fica exposta durante a maré baixa (zona intertidal), enquanto os espécimes de *S. filiformis* foram provenientes de um cultivo experimental localizado a 200 m da costa (3°13'06.0"S 39°16'47.0"W) (Figura 18).

Figura 18 - Localização da área de cultivo da espécie *S. filiformis*.



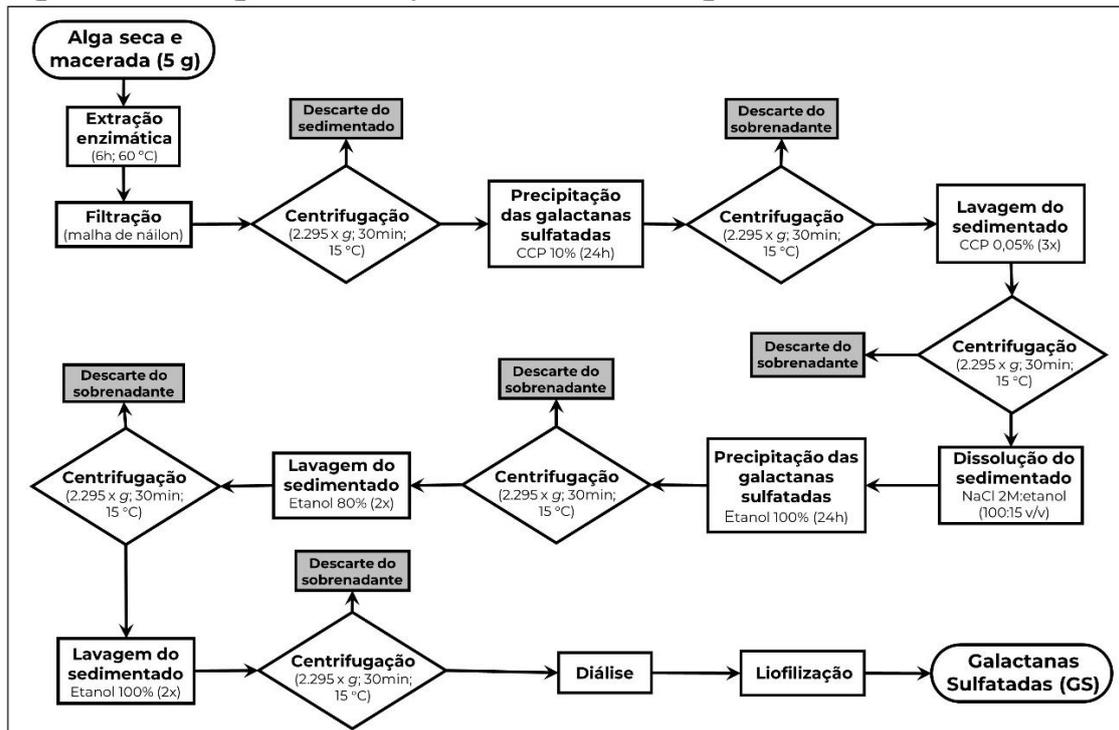
Fonte: Google Maps (2024). Escala não fornecida. Obtido em 25 de fevereiro de 2024.

Os vouchers de *G. cornea* (#34739) e *S. filiformis* (#35682) foram depositados no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará (UFC). Após a obtenção, as algas foram levadas para o Laboratório de Carboidratos e Lectinas de Algas (CarboLec) da UFC onde foram lavadas com água destilada, limpas de epífitas ou outros organismos incrustantes e armazenadas a -20 °C até uso posterior. A utilização dessas espécies para as atividades científicas descritas nesse trabalho foi registrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) (#A93CDDO).

4.3 Isolamento das Galactanas Sulfatadas

As galactanas sulfatadas (GS) de *G. cornea* e *S. filiformis* foram obtidas como descrito previamente por Farias e colaboradores (2000), com adaptações (Coura *et al.*, 2012). Inicialmente, as algas passaram por um processo de desidratação em temperatura ambiente, seguido de maceração com nitrogênio líquido. Após essas etapas, as algas maceradas (5 g) foram transferidas para erlenmeyers. Cada frasco recebeu solução tampão de acetato de sódio (100 mM; pH 5,0), contendo EDTA (5 mM) e cisteína (5 mM), e solução de papaína (30 mg/mL). O sistema foi incubado em banho-maria por 6h a 60 °C. Após esse período, a mistura passou por filtração em malha de náilon. O material residual foi descartado e o homogenato (filtrado) foi centrifugado ($2.295 \times g$, 30min; 15 °C). Ao sobrenadante foi adicionada solução de cloreto de cetilpiridínio (CCP) 10% para precipitação das GS. O sistema foi deixado em repouso por 24h à temperatura ambiente. Após esse período, a mistura foi centrifugada e o sedimentado foi lavado com CCP 0,05%. Uma nova etapa de centrifugação foi empregada e o sedimentado obtido foi dissolvido em solução de NaCl (2 M) e etanol absoluto (100:15; v/v). Após dissolução, foi adicionado etanol absoluto (4 °C) para nova precipitação das GS, nas mesmas condições já descritas. Após essa etapa, a mistura foi centrifugada e o sedimentado foi lavado com etanol 80% (2x) e etanol absoluto (1x) sempre com centrifugação após cada lavagem. Finalmente, o sedimentado resultante da última centrifugação foi dialisado contra água destilada e liofilizado (Figura 19).

Figura 19 - Fluxograma das etapas do isolamento das galactanas sulfatadas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Ao final da liofilização, GS de *G. cornea* e *S. filiformis* foram solubilizadas em salina (solução de NaCl 0,9%) estéril para os ensaios biológicos e receberam os códigos: GS-Gc e GS-Sf, respectivamente.

4.4 Análises químicas das GS

4.4.1 Determinação do rendimento percentual do processo de isolamento das GS

O rendimento percentual (R%) do processo de extração das GS foi calculado como descrito na fórmula a seguir:

$$R\% = \frac{\text{Massa da GS obtida ao final da liofilização}}{\text{Massa seca da alga no início da extração (5g)}} \times 100\%$$

4.4.2 Avaliação da presença de proteínas contaminantes na amostra

Para avaliar a presença de proteínas contaminantes, foi utilizado o método descrito por Bradford (1976). Em tubos de ensaios, albumina sérica bovina (BSA), utilizada como padrão, foi dissolvida em água destilada ($[BSA] = 1 \text{ mg/mL}$). Em seguida, foram feitas diluições gerando concentrações decrescentes do padrão (500 - 0 $\mu\text{g/mL}$). Cada concentração foi preparada em triplicata. Aos tubos de ensaios foi adicionado reagente de Bradford, seguido de agitação em vórtex. Após 2min do fim da agitação, realizou-se a leitura em espectrofotômetro ($\lambda = 595 \text{ nm}$) em cubeta de vidro. Utilizando as médias das absorbâncias (Abs) para cada concentração do padrão foi possível construir uma curva-padrão. Para a avaliar a presença de proteínas na amostra, utilizou-se, em triplicata, alíquotas do polissacarídeo dissolvido em água destilada (1 $\mu\text{g/mL}$). As alíquotas passaram pelas mesmas etapas descritas anteriormente e foram lidas em espectrofotômetro nas condições já mencionadas. A concentração de proteínas na amostra foi determinada pela média das Abs das réplicas, utilizando a curva-padrão previamente estabelecida.

4.4.3 Determinação do teor percentual de D-galactose na amostra

O teor percentual de D-galactose foi determinado por meio do ensaio ácido sulfúrico-UV, anteriormente descrito por Albalasmeh e colaboradores (2013). Em tubos de ensaios, padrão D-galactose foi dissolvido em água destilada ($[D\text{-galactose}] = 0,1 \text{ mg/mL}$). Em seguida, foram feitas diluições gerando concentrações decrescentes do padrão (90 - 10 $\mu\text{g/mL}$). Cada concentração foi preparada em triplicata. Aos tubos de ensaios foi adicionado ácido sulfúrico (H_2SO_4) seguido de agitação em vórtex. Em seguida, os tubos foram resfriados em gelo por 2min. A leitura das Abs foi feita em espectrofotômetro ($\lambda = 325 \text{ nm}$) em cubeta de quartzo. Utilizando as médias das Abs para cada concentração do padrão, construiu-se uma curva-padrão. Para a análise da amostra, utilizou-se, em triplicata, alíquotas do material dissolvido em água destilada (100 $\mu\text{g/mL}$). As alíquotas passaram pelas mesmas etapas descritas anteriormente e foram lidas em espectrofotômetro nas condições já mencionadas. A concentração de D-galactose na amostra foi determinada pela média das Abs das réplicas, utilizando a curva-padrão previamente estabelecida. Por fim, o teor percentual de D-galactose na amostra (T%) foi determinado como descrito na fórmula a seguir:

$$T\% = \frac{\text{Concentração de D-galactose na amostra}}{\text{Concentração do polissacarídeo dissolvido (100 µg/mL)}} \times 100\%$$

4.4.4 Determinação do teor percentual de sulfato livre na amostra

Para determinar o teor percentual de sulfato na amostra, utilizou-se o protocolo descrito por Dodgson (1961). Em tubos de ensaio, dissolveu-se o padrão sulfato de sódio (Na₂SO₄) em ácido clorídrico (HCl) (1M) ([SO₄²⁻] = 1.000 µg/mL). Em seguida, foram feitas diluições gerando concentrações decrescentes do padrão (1000 - 0 µg/mL). Cada concentração foi preparada em triplicata. Aos tubos de ensaios foi adicionado ácido tricloroacético (TCA) (3%) e gelatina contendo cloreto de bário (BaCl₂), seguido de agitação em vórtex. Após 20min de repouso à temperatura ambiente, realizou-se a leitura em espectrofotômetro (λ = 360 nm) em cubeta de quartzo. Utilizando a médias das Abs para cada concentração do padrão, construiu-se uma curva-padrão. Para a análise da amostra, inicialmente procedeu-se com a etapa de hidrólise em condições ácidas. Para isso, o polissacarídeo foi dissolvido em HCl (1 M) (5 mg/mL), em triplicata. Em seguida, os tubos foram levados ao banho-maria por 5 h a 110 °C. Após essa etapa, o hidrolisado passou pelas mesmas etapas descritas anteriormente para o padrão e a leitura em espectrofotômetro ocorreu condições já mencionadas. A concentração de sulfato (SO₄²⁻) na amostra foi determinada pela média das Abs das réplicas, utilizando a curva-padrão previamente estabelecida. Por fim, o teor percentual de sulfato livre (T⁰_{Sulf}) foi determinado dividindo a concentração de SO₄²⁻ na amostra (C) pela concentração do polissacarídeo dissolvido (5 mg/mL), como descrito na fórmula a seguir:

$$T\% = \frac{\text{Concentração de sulfato livre na amostra}}{\text{Concentração do polissacarídeo dissolvido (5 mg/mL)}} \times 100\%$$

4.5 Ensaio *in vitro*

4.5.1 Linhagens celulares e procedimentos de cultura celular

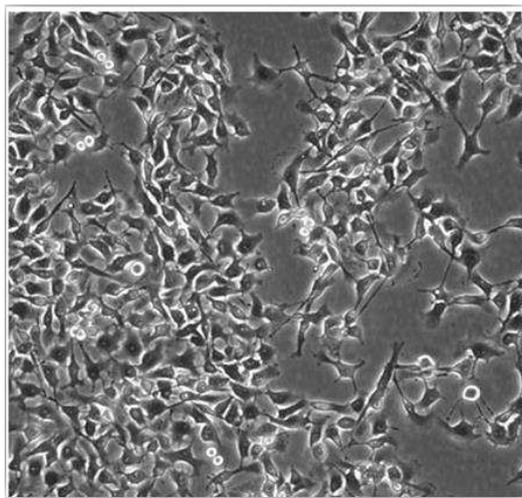
A linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 (Figura 20) e a linhagem de melanoma metastático murino B16-F10 (Figura 21), utilizadas no presente trabalho, foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ).

Figura 20 - Fotomicrografia da linhagem de macrófagos RAW 264.7.



Fonte: imagem cedida por Alexia Assef

Figura 21 - Fotomicrografia da linhagem de melanoma metastático murino B16-F10.



Fonte: Imagem cedida por Alexia Assef

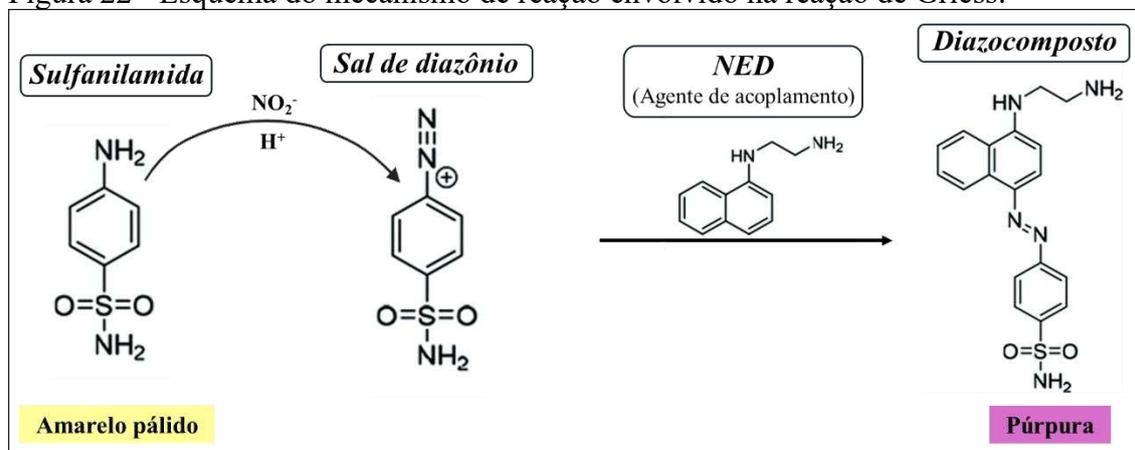
As células foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), inativado pelo calor, e 1% de penicilina/estreptomicina. As linhagens celulares foram mantidas a 37 °C em incubadora (modelo Airstream classe II-B2, ESCO, Portland, EUA) com atmosfera umidificada e CO₂ a 5% (v/v). As células passaram por manutenções regulares a fim de mantê-las na fase exponencial de crescimento. Para os ensaios com RAW 264.7 utilizou-se o plaqueamento de $1,5 \times 10^5$ células/mL. Para os ensaios com B16-F10 utilizou-se o plaqueamento de $4,0 \times 10^4$ células/mL.

4.5.2 Avaliação da produção de óxido nítrico por RAW 264.7 estimulada com GS-Gc ou SG-Sf

Para avaliar se as GS induzem a produção de óxido nítrico (NO) em RAW 264.7, as células foram plaqueadas e após 24h foram incubadas, em triplicata, com salina (solução estéril de NaCl a 0,9%), como controle negativo, lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* (100 ng/mL), como controle positivo, GS-Gc (10, 100 ou 250 µg/mL) ou GS-Sf (1, 10 ou 100 µg/mL). Após 24h de incubação, a concentração de NO foi determinada indiretamente por meio da quantificação do nitrito (NO_2^-) em solução usando o teste de Griess, descrito por Green e colaboradores (1981).

No teste de Griess (Figura 22), o íon NO_2^- formado reage com uma amina aromática (sulfanilamida, por exemplo), em meio ácido, formando um sal de diazônio que, mediante a presença de um agente de acoplamento (agente redutor), como cloridrato de N-(1-naftil) etilenodiamina (NED), forma um diazocomposto colorido (Váradi *et al.*, 2019).

Figura 22 - Esquema do mecanismo de reação envolvido na reação de Griess.



Fonte: Adaptado de Váradi e colaboradores (2019).

Inicialmente, realizou-se uma diluição seriada, em duplicata, utilizando nitrito de sódio (NaNO_2) como padrão. As concentrações variaram de 200 a 1,56 µM (fator de diluição = 2). Para análise do sobrenadante de RAW 264.7 incubada com as GS ou com os controles, utilizou-se uma alíquota de 50 µL. Aos poços foram adicionados 50 µL de reagente de Griess [sulfanilamida 1% em ácido acético a 30% e N-(1-Naftil)

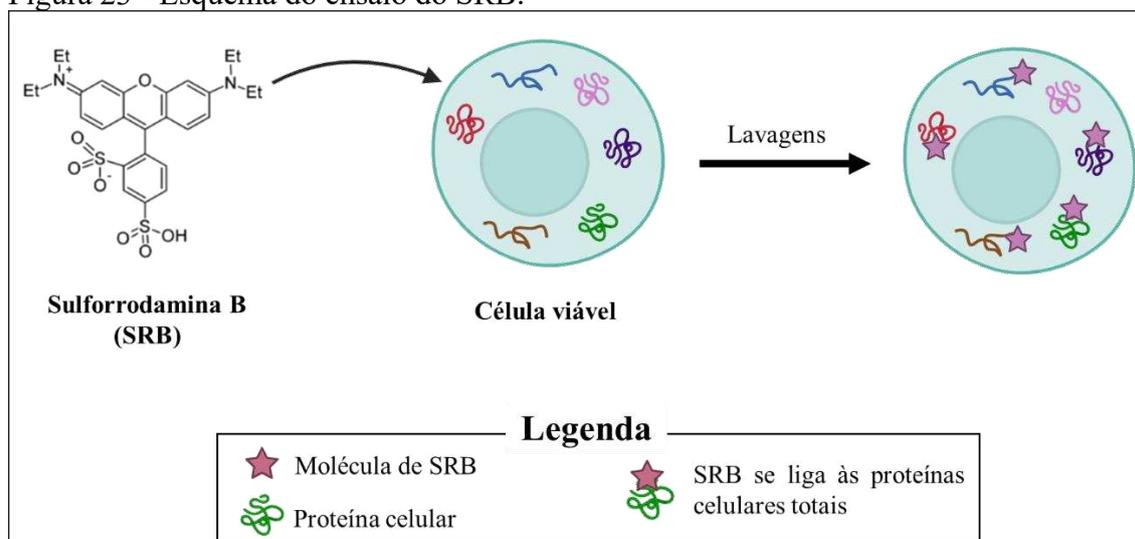
etilenodiamina (NED) 0,1% em ácido acético a 60%]] e a placa foi mantida em ambiente de baixa luminosidade por um período entre 5 e 10 minutos. A leitura foi feita a 560 nm em leitor de microplacas e as médias das absorbâncias da diluição seriada de NO_2^- foram utilizadas para construir uma curva-padrão. A concentração de NO_2^- no sobrenadante de RAW 264.7 foi determinada a partir média das absorbâncias das réplicas utilizando a curva-padrão obtida anteriormente.

4.5.3 Avaliação do potencial antiproliferativo de GS-Gc e GS-Sf contra B16-F10

Para avaliar se GS-Gc e GS-Sf inibem o crescimento de B16-F10, utilizamos o ensaio da sulforrodamina B (SRB) descrito por Skehan e colaboradores (1990) (Skehan *et al.*, 1990).

O SRB é um corante do grupo das aminoxantinas que possui coloração rosa brilhante, exibindo dois grupos sulfônicos em sua estrutura (Figura 23). Em culturas celulares fixadas com ácido tricloroacético (TCA), em condições ligeiramente ácidas, o SRB se liga aos resíduos de aminoácidos básicos das proteínas, permitindo a determinação da densidade celular com base no teor de proteínas totais e sem depender do metabolismo celular (Sanjai *et al.*, 2024).

Figura 23 - Esquema do ensaio do SRB.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Para o ensaio de SRB, as células B16-F10 foram plaqueadas e mantidas em incubadora por 24h. Após esse período, uma das placas foi fixada com ácido tricloroacético (TCA) 10% (placa do tempo zero, T₀). As células B16-F10 da outra placa (placa teste) foram estimuladas, em triplicata, com salina, como controle negativo, LPS (100 ng/mL), como controle positivo, GS-Gc (10, 100 ou 250 µg/mL) ou GS-Sf (1, 10 ou 100 µg/mL). Na sequência, foram mantidas em incubadora por 48h. Após essa etapa, o sobrenadante da placa teste foi descartado, as células foram fixadas com TCA 10% e armazenadas em geladeira (4 °C) por 1 h. Transcorrido esse tempo, ambas as placas foram lavadas com água destilada, receberam solução de SRB 0,4% e foram mantidas em incubadora por 30 min. Em seguida, o SRB foi removido e os poços lavados com ácido acético 1%. Por fim, as placas receberam tampão Tris-base 10 mM e foram homogeneizadas por agitação controlada. A leitura das absorbâncias (Abs) foi feita em leitor de microplacas (modelo Multiskan FC, Fisher Scientific, Pittsburgh, EUA) a 560 nm.

Os valores de Abs obtidos foram utilizados para determinar o percentual de crescimento celular normalizado (% Crescimento celular normalizado) de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Crescimento celular normalizado} = \frac{(T-T_0)}{(CN-T_0)} \times 100\%$$

onde: “T” representa a Abs de cada réplica de cada grupo; “T₀” representa a Abs média da placa do tempo zero e “CN” representa a Abs média do controle negativo salina.

Em seguida, os valores de % Crescimento celular normalizado foram transformados em percentual de inibição do crescimento celular (% Inibição do crescimento celular), utilizando a fórmula:

$$\% \text{ Inibição do crescimento celular} = 100\% - \% \text{ Crescimento celular normalizado.}$$

4.5.4 Avaliação do potencial antiproliferativo do meio-condicionado de RAW 264.7 estimulada com GS-Gc e SG-Sf contra B16-F10

Para avaliar se RAW 264.7 incubada com GS-Gc e GS-Sf produzia e secretava fatores capazes de inibir o crescimento de B16-F10, utilizamos o ensaio de SRB nas condições descritas anteriormente. Entretanto, em vez de incubarmos B16-F10 com as amostras, utilizamos o meio condicionado (MC) de RAW 264.7. Para isso, plaqueamos a linhagem de macrófagos e, após 24 h, incubamos, em triplicata, as células com salina, como controle negativo, LPS (100 ng/mL), como controle positivo, GS-Gc (10, 100 ou 250 µg/mL) ou GS-Sf (1, 10 ou 100 µg/mL). O tempo de incubação de RAW 264.7 com amostras ou controles foi de 24h. Após esse período, B16-F10 recebeu, em triplicata, igual volume (1:1 v/v) do MC de RAW 264.7 incubada com salina (MC-Sal), LPS (MC-LPS), GS-Gc (MC-GS-Gc) ou GS-Sf (MC-GS-Sf).

4.5.5 Análise da expressão de marcadores de superfície e intracelular em RAW 264.7 estimulada com GS-Gc e SG-Sf

Para avaliar a expressão de marcadores de superfície ou intracelular, utilizamos a técnica de citometria de fluxo (CF). A CF é uma técnica que permite identificar e quantificar vários parâmetros celulares simultaneamente, bem como realizar diversas análises em partículas microscópicas. No âmbito da prospecção de compostos bioativos com potencial antitumoral, a CF exerce papel de grande relevância, sobretudo, por permitir a caracterização dos efeitos citotóxicos que determinados compostos podem exercer (Fiorentino *et al.*, 2012).

O princípio de funcionamento da técnica consiste em medir a forma como um feixe de laser é dispersado ao atravessar uma célula: o parâmetro “dispersão frontal” ou “FSC” (do inglês "*Forward Scatter*") informa sobre o tamanho da célula, enquanto o parâmetro “dispersão lateral” ou “SSC” (do inglês "*Side Scatter*") informa sobre o nível de complexidade interna da célula, como sua granulosidade. Entretanto, além de informar sobre aspectos morfológicos, a CF também permite a identificação de fluorescência emitida por corantes ou marcadores ligados a componentes celulares específicos. Esses marcadores fluorescentes permitem a identificação e a quantificação de várias populações celulares e suas condições fisiológicas (Adan *et al.*, 2017; Shapiro, 1981).

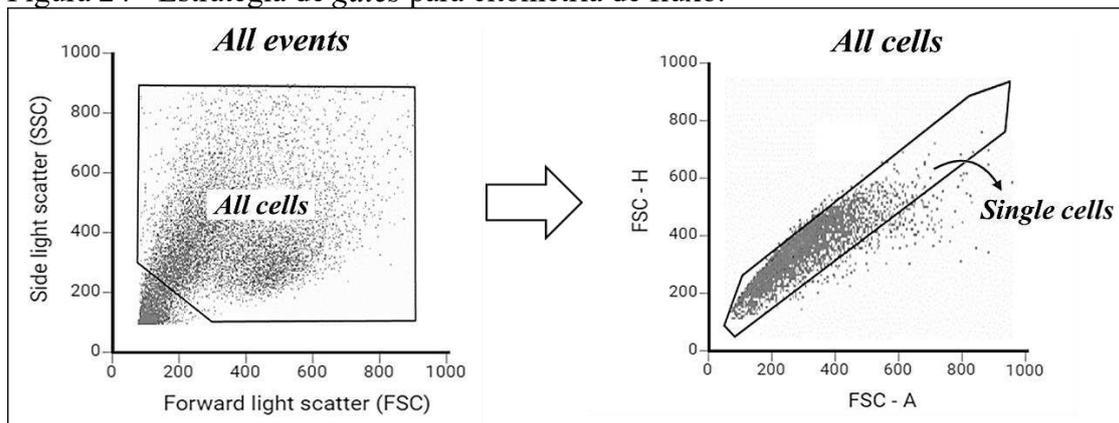
Para a caracterização fenotípica de RAW 264.7, foram utilizados anticorpos específicos conjugados a fluorocromos. A marcação de proteínas de superfície foi

realizada utilizando os anticorpos anti-CD86 conjugado a FITC (#11-0862-82) e anti-MHC classe II conjugado com PE (#12-5320-82). Para detecção da proteína intracelular óxido nítrico sintase induzível (iNOS) foi utilizado o anticorpo anti-iNOS conjugado a Alexa Fluor 488 (#53-5920-82). Todos os anticorpos conjugados a fluorocromos foram adquiridos da empresa Thermo Fisher (Waltham, MA, EUA).

Inicialmente, RAW 264.7 foi plaqueada e mantida em incubadora (modelo MCO-19AIC, Sanyo Electric Co., Ltd., Moriguchi, Osaka, Japão) por 24h. Após esse período, as células foram estimuladas com salina, LPS (100 ng/mL) ou GS-Gc (250 µg/mL), em triplicata, por mais 24h. Na sequência, as células foram soltas utilizando um *cell scrapper* (raspador de células), marcadas com os anticorpos para as proteínas de superfície durante 30 min a 4°C em tampão FACS (SFB 4% em PBS) e depois lavadas novamente com o tampão. Para a marcação intracelular, após a soltura com o *cell scraper*, RAW 264.7 foi fixada com paraformaldeído (PFA) a 1% por 5 min. Em seguida, foi permeabilizada com o surfactante Triton X-100 0,1% por 5 min. Após essa etapa, foram marcadas com o anticorpo anti-iNOS por 30 min a 4 °C em tampão FACS e depois lavadas com o mesmo tampão.

Para aquisição dos dados utilizamos um citômetro de fluxo (modelo FACSVerse, BD Biosciences, San Jose, EUA). Na interface do citômetro foi criado um gráfico do tipo *dot plot* (gráfico de pontos) utilizando os parâmetros *FSC* e *SSC*. Esse gráfico continha todos os eventos adquiridos pelo citômetro (*all events*). A fim de excluir eventos que não interessavam à análise (ex: *debris* e *outliers*) criou-se uma região dentro do gráfico (*gate*) contendo somente os eventos de interesse, os quais foram denominados “células totais” (*all cells*). Um novo gráfico foi gerado contendo somente *all cells* e nele criou-se um gate para selecionar somente as células individuais (*single cells*). Nesse gráfico, foram utilizadas duas medidas do parâmetro FSC: a medida “H”, que representa a altura (do inglês “*height*”) do pico do sinal detectado quando o feixe de laser atravessa uma célula e a medida “A”, que representa a área (do inglês “*area*”) do sinal (Figura 24). Por fim, foram adquiridos 10^4 eventos a partir do gate de *single cells*, em triplicata, para cada grupo.

Figura 24 - Estratégia de *gates* para citometria de fluxo.



Fonte: elaborado pelo autor.

Os dados adquiridos pelo citômetro foram posteriormente analisados utilizando um software de análise de dados de CF (FlowJo LLC, versão 10.10, Tree Star, Ashland, USA). Sendo obtidos valores de intensidade de fluorescência mediana (MFI, do inglês *median fluorescence intensity*) ou porcentagem de populações celulares duplo-marcadas para CD86 e MHC classe II (CD86⁺/MHCII⁺). Os valores de MFI obtidos foram normalizados usando a média dos valores de MFI do controle negativo salina.

4.6 Ensaios *in vivo*

4.6.1 Animais

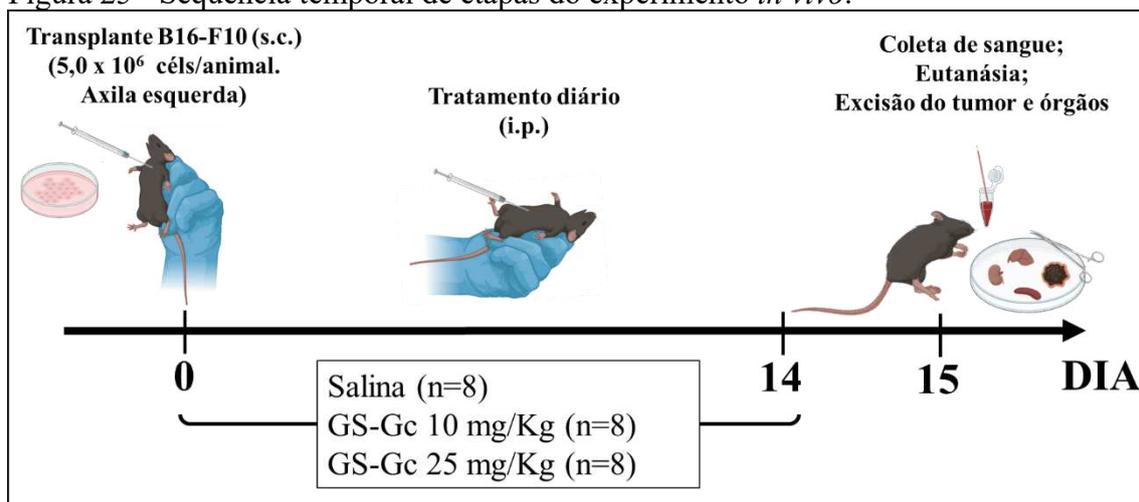
Foram utilizados 24 camundongos fêmeas C57BL/6 (25 - 30 g) com 6 a 8 semanas de idade, obtidos do biotério da Universidade de Fortaleza, Brasil. Os animais foram alojados em gaiolas sob um ciclo claro-escuro de 12h/12h com alimento e água ad libitum. Todos os procedimentos de manejo dos animais foram realizados seguindo a legislação brasileira para uso e cuidado de animais de laboratório (nº 11.724/2008 após aprovação pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Federal do Ceará (nº 50/17).

4.6.2 Ensaio antitumoral e coleta de tumor, sangue e órgãos

Os animais foram divididos aleatoriamente em 3 grupos (n = 8 animais/grupo). As células B16-F10 foram diluídas em meio DMEM e transplantadas

subcutaneamente ($5,0 \times 10^5$ células/mL) na axila esquerda de todos os camundongos. Após 24h do transplante tumoral, cada grupo recebeu, por via intraperitoneal (i.p.), salina (controle negativo) ou GS-Gc (10 mg/Kg ou 25 mg/Kg) por 14 dias. Todos os procedimentos descritos acima foram realizados pelo mesmo pesquisador. Os pesos corporais foram medidos no dia do transplante do tumor e no último dia de tratamento. No dia 15, os camundongos foram anestesiados e amostras de sangue periférico de camundongos foram coletadas do plexo retro-orbital. Os animais foram então eutanasiados com overdose de cetamina e xilasina para excisão cirúrgica do tumor, rins, baço e fígado. Os órgãos foram pesados e fixados em formalina tamponada a 10%. O peso dos órgãos foi normalizado por 100 g de peso corporal de camundongos. As amostras de sangue foram coletadas para análises hematológicas e bioquímicas (Figura 25).

Figura 25 - Sequência temporal de etapas do experimento *in vivo*.



Fonte: Elaborado pelo autor com Biorender.com.

4.6.3 Análise histopatológica

Após fixação, os órgãos foram examinados macroscopicamente quanto alterações de tamanho ou cor e presença de hemorragia. Posteriormente, tanto os órgãos quanto os tumores foram incluídos em parafina, microtomizados e corados com hematoxilina e eosina. A análise histológica foi realizada por microscopia óptica. Foram consideradas a presença e extensão de lesões ou outras alterações morfológicas.

4.6.4 Análise bioquímica

As análises bioquímicas foram realizadas utilizando kits de diagnósticos padronizados (LABTEST®, Lagoa Santa-MG, Brasil). Inicialmente, o sangue total foi centrifugado a 2.500 rpm por 15 min na ausência de anticoagulantes. Para avaliar a função renal, os soros obtidos foram utilizados para dosagem dos níveis de uréia e creatinina. Para avaliar função hepática, os soros foram usados para dosagem dos níveis das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST).

4.6.5 Análise hematológica

As análises hematológicas foram realizadas utilizando um aparelho analisador de sangue (Mindray 210 BC-2800, Auto Hematology Analyzer Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Ltd, 211, China), de acordo com as instruções do fabricante. Aliquotas de sangue receberam o agente quelante EDTA a 5 mM (1 mL de sangue: 2 µl de EDTA) a fim de evitar a coagulação. Em seguida, o material foi analisado pelo aparelho, onde a contagem de leucócitos totais, linfócitos, monócitos e granulócitos foi realizada.

4.7 Análise estatística

Os dados representam a média \pm DP de três réplicas técnicas e biológicas. Análise de variância (ANOVA), seguida pelo pós-teste de Dunnett, foi utilizada para avaliar diferença estatística entre os grupos. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Para realizar as análises estatísticas foi empregado o software GraphPad Prism 6.0 (San Diego, CA, 222 EUA).

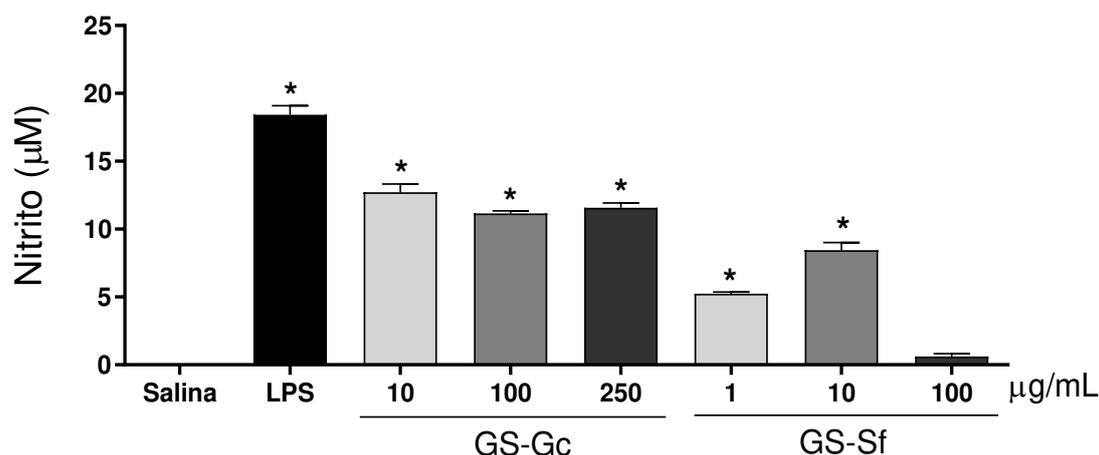
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ensaios *in vitro*

5.1.1 Avaliação da produção de óxido nítrico por RAW 264.7 estimulada com GS-Gc ou GS-Sf

Tanto GS-Gc quanto GS-Sf estimularam a liberação de NO por RAW 264.7. Embora a estimulação da GS-Gc tenha sido observada em todas as concentrações testadas, GS-Sf induziu a liberação de óxido nítrico (NO) apenas nas menores concentrações testadas (Figura 26).

Figura 26 – GS-Gc e GS-Sf estimulam a produção de óxido nítrico por RAW 264.7



Fonte: Elaborado pelo autor. Avaliação indireta da produção de óxido nítrico (NO) em RAW 264.7 estimulada com GS-Gc ou GS-Sf por meio do teste de Griess. RAW 264.7 foi incubada, em triplicata, com salina, como controle negativo, lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli* (100 ng/mL), como controle positivo, GS-Gc (10, 100 ou 250 µg/mL) ou GS-Sf (1, 10 ou 100 µg/mL) por 24h. Para esse ensaio foram realizados três experimentos independentes. Os valores de absorbância obtidos foram transformados em concentração de nitrito por meio de interpolação. Os valores das concentrações de nitrito, por sua vez, foram apresentados como média \pm desvio-padrão. As médias entre os grupos foram comparadas por análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Dunnett. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo salina.

Não observamos um padrão de ativação de RAW 264.7 que fosse dependente da concentração. Isso sugere que certos compostos podem desencadear respostas imunológicas sem seguir a tradicional relação dose-resposta, possivelmente devido a

fatores como a afinidade por diferentes receptores ou até mesmo por sua capacidade de inibir a proliferação celular.

Uma vez que não investigamos nesse trabalho quais receptores estão envolvidos na ativação de Mfs por *GS-Gc*, reconhecemos não ter dados suficientes para apoiar uma resposta sólida. No entanto, a afinidade putativa por múltiplos receptores (que desencadeiam diferentes vias de sinalização) poderia explicar o perfil não dependente da concentração da *GS-GC* na produção de NO por RAW 264.7.

Por outro lado, SG-Sf exibiu um comportamento em forma de sino nas concentrações de 1, 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$. Esse padrão pode ser explicado pelo fato de a concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ ser muito baixa para ativar qualquer resposta imune, enquanto a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ pode ter apresentado um efeito citotóxico. Novos ensaios devem ser conduzidos para elucidar esse fenômeno.

O NO é uma espécie reativa de nitrogênio de natureza gasosa que é convertida em nitrito (NO_2^-) em uma reação de múltiplas etapas em que o oxigênio molecular (O_2) e a água (H_2O) participam como reagentes (Ignarro *et al.*, 1993).

Além de desempenhar importantes funções de sinalização celular, o NO exerce papel crucial na resposta imunitária do hospedeiro contra vários agentes patogênicos, como parasitas, bactérias e vírus (Xue *et al.*, 2018).

Em adição à sua natureza química altamente reativa, o NO pode ainda reagir com ânions superóxidos, formando o peroxinitrito, um agente oxidante altamente deletério que pode causar danos a biomoléculas diversas, incluindo: lipídeos de membrana, proteínas e DNA (Burney *et al.*, 1999). Nesse sentido, quando produzido em altas concentrações por Mfs com fenótipo semelhante M1 no MAT, o NO pode exercer papel antitumoral por apresentar atividade citotóxica contra as células neoplásicas malignas (Kovacevic *et al.*, 2017).

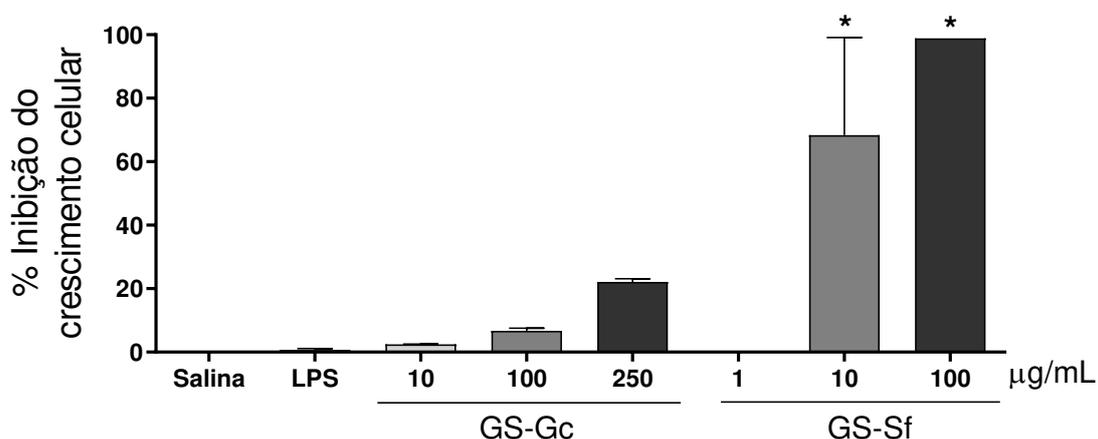
Diversos trabalhos têm relatado a ativação de Mfs por GS. A GS da alga parda *Cystoseria indica* induziu a liberação de NO em RAW 264.7 por meio da ativação das vias de sinalização do receptor Toll-like 4 (TLR4)/NF- κ B e MAPKs (Tabarsa *et al.*, 2020). O PS da alga parda *Nizamuddinina zanardinii*, de forma semelhante, ativou RAW 264.7 de modo a liberar NO e citocinas pró-inflamatórias (Tabarsa *et al.*, 2020). A consistência deste mecanismo parece ser partilhada por outras galactanas, incluindo os

obtidos das flores da planta *Panax ginseng* ou dos corpos de frutificação do fungo *Cantharellus cibarius*, que ativaram RAW 264.7, aumentando fagocitose e a liberação de NO e das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-6, IFN- γ e IL-1 β (Cui *et al.*, 2020).

5.1.2 Avaliação do potencial antiproliferativo de GS-Gc e GS-Sf contra B16-F10

Nas duas maiores concentrações testadas GS-Sf apresentou acentuado efeito antiproliferativo contra B16-F10. Em contrapartida, GS-Gc não exibiu inibição significativa da proliferação de B16-F10 (Figura 27).

Figura 27 - GS-Sf inibe a proliferação celular de B16-F10



Fonte: Elaborado pelo autor. Inibição da proliferação de B16-F10 incubada com GS-Gc ou GS-Sf em diferentes concentrações por meio do ensaio de SRB. B16-F10 foi incubada, em triplicata, com salina, como controle negativo, lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli* (100 ng/mL), como controle positivo, GS-Gc (10, 100 ou 250 µg/mL) ou GS-Sf (1, 10 ou 100 µg/mL) por 48h. Para avaliar a inibição crescimento de B16-F10 pelas amostras foram realizados três experimentos independentes. Os valores de crescimento celular de todos os grupos foram normalizados pelo crescimento celular do grupo salina e expresso em termos percentuais. Em seguida, os valores de percentual de crescimento celular foram transformados em valores de percentual de inibição e expressos como média \pm desvio-padrão. As médias dos grupos foram comparadas por análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Dunnett. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo salina.

Alguns trabalhos têm relatado atividade antiproliferativa *in vitro* de carragenanas contra linhagens tumorais. Uma iota-carragenana obtida da alga vermelha *Laurencia papillosa* inibiu a proliferação celular de uma linhagem de adenocarcinoma

por meio da induzindo de apoptose (Murad *et al.*, 2015). Já uma kappa(k)-carragenana obtida da alga vermelha *Hypnea musciformis*, reduziu a proliferação de uma linhagem de neuroblastoma (Souza *et al.*, 2018).

Khotimchenko e colaboradores publicaram uma revisão abrangente sobre os efeitos biológicos das carragenanas de algas vermelhas publicados até o ano de 2020. Segundo o artigo, diversos fatores influenciam nas atividades biológicas das carragenanas, como o peso molecular, estrutura química, quantidade e posicionamento dos grupos sulfato, método de isolamento, entre outros. Em relação à atividade antiproliferativa contra células tumorais *in vitro*, os autores constataram que a es existe uma correlação entre o peso molecular das carragenanas e o efeito sobre a proliferação celular: carragenanas de alto peso molecular (> 100 KDa) tendem a não apresentar efeito antiproliferativo significativo, enquanto de baixo peso molecular (10-20 KDa) tendem a inibir a proliferação das células tumorais *in vitro* (Khotimchenko *et al.*, 2020).

Um estudo mostrou que oligossacarídeos (< 20 KDa) obtidos a partir da hidrólise de carragenanas da espécie *Hypnea musciformis* exibiram uma maior atividade antiproliferativa contra uma linhagem de adenocarcinoma mamário murino (LM2) quando comparado às carragenanas nativas (não hidrolisadas). Além disso, os autores demonstraram que esses oligossacarídeos foram capazes de inibir a proliferação celular de um painel de células tumorais, incluindo melanoma metastático murino (B16-F10) (IC_{50} [mg/mL] = 0.039 ± 0.005); carcinoma de bexiga murino (MB49) (IC_{50} [mg/mL] = 0.045 ± 0.008), um tipo de leucemia mieloide crônica humana (K562) (IC_{50} [mg/mL] = 0.049 ± 0.002). A inibição do crescimento celular ocorre por indução de apoptose (tanto pela via intrínseca como pela via extrínseca), com ativação direta e indireta da caspase-3 (Calvo *et al.*, 2019).

Apesar de as carragenanas de *S. filiformis* terem um pico de peso molecular de 210 KDa (Sousa *et al.*, 2016), é importante ressaltar que as carragenanas, assim como os polissacarídeos em geral, apresentam peso molecular polidisperso, ou seja, têm uma distribuição de tamanho variada, com muitas variando de 500 a 1000 kDa. No entanto, até 25% desses polissacarídeos podem ter um peso molecular abaixo de 100 kDa (Lascombes *et al.*, 2017). Desse modo é possível que a inibição do crescimento se deva às frações com menor peso molecular presentes na amostra. Além disso, a inibição celular que GS-Sf apresentou pode não ser seletiva para B16-F10, podendo afetar o crescimento de outras células como a própria RAW 264.7, o que explicaria a grande redução na

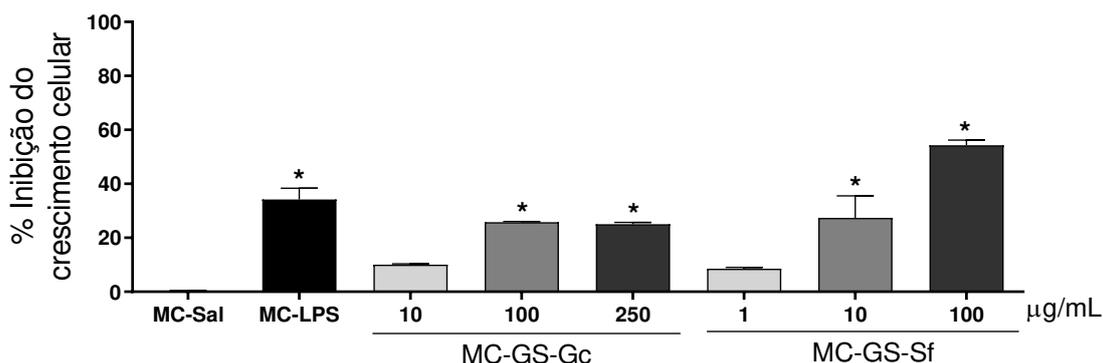
produção de NO por RAW 264.7 na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 26). Entretanto, estudos adicionais devem ser conduzidos para testar essa hipótese.

Em relação ao fato de GS-Gc não ter apresentado citotoxicidade significativa contra B16-10, trabalhos já têm demonstrado que as agaranas sulfatadas de alga marinha, apresentam baixa toxicidade, o que permite sua utilização como compostos alimentares (Fedorov *et al.*, 2013).

5.1.3 Avaliação do potencial antiproliferativo do meio condicionado de RAW 264.7 estimulada com GS-Gc e GS-Sf contra B16-F10

O meio-condicionado (MC) de RAW 264.7 exposta a GS-Gc (MC-GS-Gc) ou GS-Sf (MC-GS-Sf) inibiu o crescimento celular de B16-F10 (Figura 28).

Figura 28 - O meio-condicionado de RAW 264.7 estimulada com GS-Gc ou GS-Sf inibe a proliferação celular de B16-F10.



Fonte: Elaborado pelo autor. Inibição da proliferação de B16-F10 pelo meio-condicionado (MC) de RAW 264.7 foi avaliada pelo ensaio de SRB. B16-F10 recebeu, em triplicata, o MC (1:1 v/v) de RAW 264.7 incubada com salina (MC-Sal), LPS (MC-LPS), GS-Gc (MC-GS-Gc) (10, 100 ou 250 $\mu\text{g/mL}$) ou GS-Sf (MC-GS-Sf) (1, 10 ou 100 $\mu\text{g/mL}$) por 48h. Os valores de crescimento celular de todos os grupos foram normalizados pelo crescimento celular do grupo salina e expresso em termos percentuais. Em seguida, os valores de percentual de crescimento celular foram transformados em valores de percentual de inibição e

expressos como média \pm desvio-padrão. As médias dos grupos foram comparadas por análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Dunnett. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo salina.

Um trabalho utilizando MC de Mfs M1 (cultivados em meio livre de soro) obtidos a partir da estimulação de monócitos circulantes humanos com Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos Recombinante Humano (rHuM-CSF) ou Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos-Macrófagos Recombinante Humano (rHuGM-CSF) associado a LPS e/ou IFN- γ , foi capaz de inibir o crescimento de linhagens tumorais de câncer de mama humano (HCC1143 e T47D) e leucemia linfoblástica aguda humana (MOLT-4). De modo oposto, Mfs polarizados para fenótipo M2 não inibiram crescimento tumoral das linhagens estudadas. Os autores fizeram a caracterização fenotípica de Mfs M1 utilizando um painel de citocinas/quimiocinas bem como a análise da expressão de diversos marcadores de superfície. Além disso, os pesquisadores estudaram como o TNF- α , IFN- γ e TGF- β afetam o crescimento das células. Eles descobriram que, ao bloquear o TNF- α com um anticorpo, a inibição do crescimento das células tumorais pelo MC de Mfs M1 era parcialmente abolido. No entanto, o bloqueio de IFN- γ e TGF- β com anticorpos não alterou a proliferação celular (Rey-Giraud; Hafner; Ries, 2012). Esses resultados sugerem que, apesar de o TNF- α ter um papel importante na inibição da proliferação das células tumorais mediada pelos Mfs M1, deve existir pelo menos um outro fator solúvel no MC responsável pela inibição da proliferação celular.

Em um outro estudo, utilizando Mfs de diferentes origens (derivados de monócitos do sangue periférico humano ou linhagem THP-1), Engström e colaboradores demonstraram que o MC de Mfs polarizados para um fenótipo M1, após exposição a LPS e IFN- γ , inibe a proliferação de linhagens tumorais de carcinoma colorretal humano (HT-29 e CACO-2) por meio da indução de parada do ciclo celular e apoptose. Por outro lado, o MC de Mfs polarizados para fenótipo M2, após estimulação com IL4 e IL13, não inibiu o crescimento celular dessas linhagens. Os autores identificaram uma série de citocinas e quimiocinas liberadas pelo fenótipo M1 (TNF- α , IL6, IL8, IL10, CCL7, CCL8, CCL15, CXCL1, CXCL9) e testaram TNF- α (100 ng/mL) e CXCL9 (100 ng/mL) diretamente contra HT-29, porém não houve inibição do crescimento celular (Engström *et al.*, 2014).

Em nosso grupo, também incubamos B16-F10, por 72h, com diferentes concentrações de TNF- α (variando de 1,0 a 0,0156 ng/mL) a fim de avaliar o efeito sobre

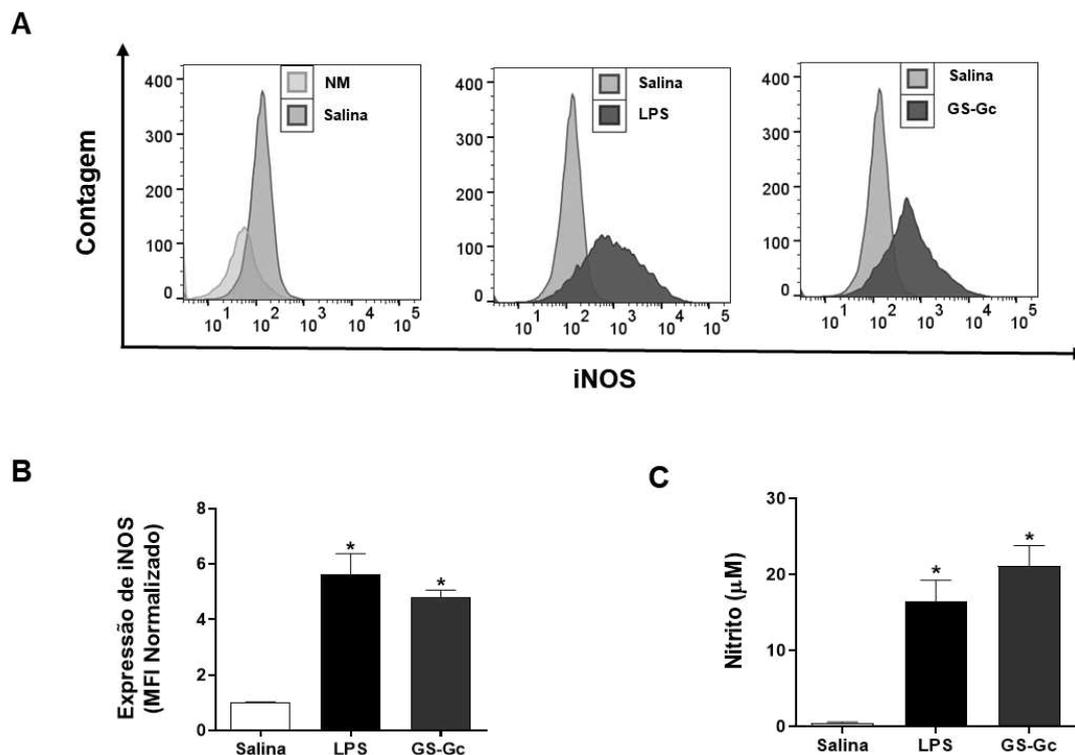
a proliferação celular. No entanto, não observamos inibição do crescimento dessas células tumorais (resultados não mostrados). Além disso, nosso planejamento experimental também não nos permite atribuir ao NO o efeito inibitório de MC-GS-Gc e MC-GS-Sf sobre o crescimento de B16-F10, uma vez que o NO é um gás volátil e altamente reativo, sendo rapidamente convertido em nitrito no meio de cultura, como discutido anteriormente. Portanto, os fatores antiproliferativos liberados por RAW 264.7 ao ser estimulada com as GS merecem ser melhor investigados em um estudo posterior.

Uma vez que, entre as GS testadas, GS-Gc exibiu um perfil bioativo do nosso interesse, apresentando baixa citotoxicidade direta contra B16-F10 e estimulando RAW 264.7 a liberar fatores capazes de inibir o crescimento da linhagem de melanoma, decidimos selecionar GS-Gc para novos ensaios.

5.1.4 Análise da expressão de marcadores associados ao fenótipo M1-like em RAW 264.7 estimulada com GS-Gc

A estimulação de RAW 264.7 com GS-Gc na concentração de 250 µg/mL induziu aumento de cinco vezes na expressão de iNOS quando comparado ao grupo salina (Figura 29 A-B). O aumento da expressão de iNOS correspondeu ao aumento da produção de NO por RAW 264.7 quando incubada com GS-Gc também na concentração de 250 µg/mL (Figura 29 C).

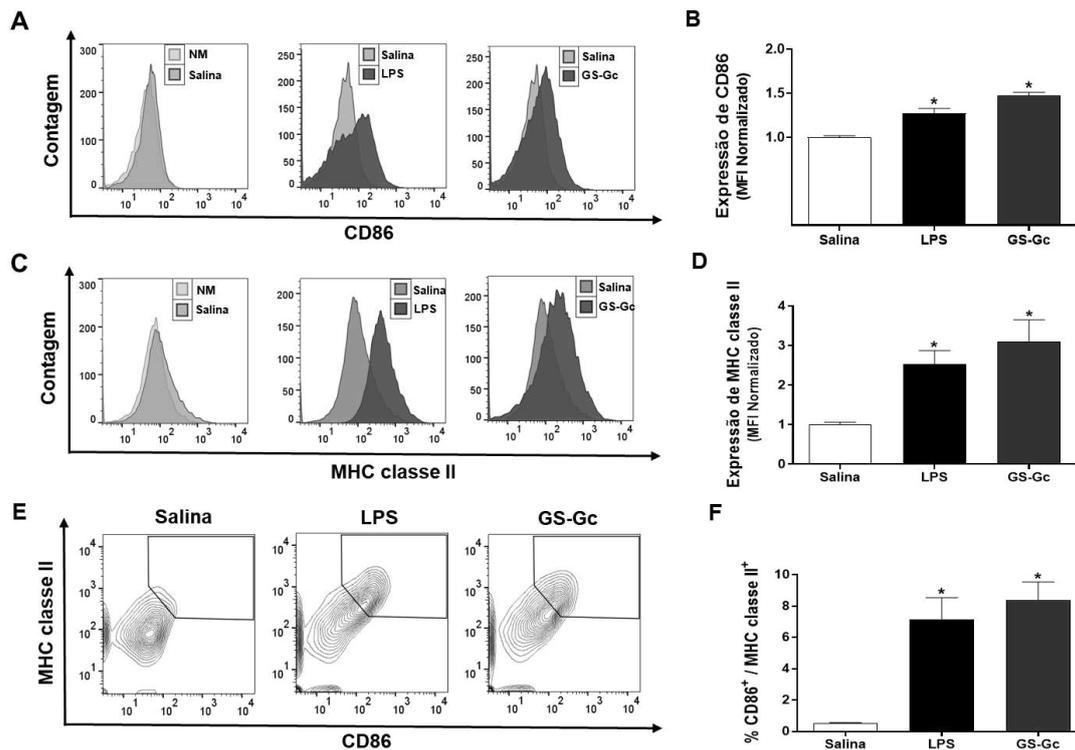
Figura 29 – GS-Gc induz em RAW 264.7 aumento da expressão de iNOS



Fonte: Elaborado pelo autor. RAW 264.7 foi incubada, em triplicata, com salina, como controle negativo, lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli* (100 ng/mL), como controle positivo ou GS-Gc (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 24h. Os histogramas representativos dos experimentos são mostrados em **A**. As médias dos valores de intensidade de fluorescência mediana (MFI) normalizados pela média do grupo salina são mostrados em **B**. Medição indireta dos níveis de óxido nítrico (NO) produzidos por RAW 264.7 por meio do teste de Griess é mostrada em **C**. Para o experimento de citometria foram adquiridos 10^4 eventos a partir de *single cells*. Células não marcadas (NM) foram usadas como controle de fluorescência basal. Para a avaliação da expressão de iNOS e para dosagem indireta de NO foram realizados três experimentos independentes. Os dados dos gráficos **B** e **C** foram apresentados como média \pm desvio-padrão. As médias entre os grupos foram comparadas por análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Dunnett. $*p < 0,05$ quando comparado ao grupo salina.

Além disso, GS-Gc, na concentração de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, induziu em RAW 264.7 o aumento da expressão de CD86 e MHC classe II em 3 e 1,5 vezes, respectivamente, quando comparado ao grupo salina (Figura 30 A-D). O percentual de células duplo-marcadas para CD86 e MHC classe II ($\text{CD86}^+/\text{MHCII}^+$) também aumentou no grupo estimulado com GS-Gc na concentração de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 30 E-F).

Figura 30 – GS-Gc induz em RAW 264.7 o aumento da expressão dos marcadores CD86 e MHC classe II



Fonte: Elaborado pelo autor. RAW 264.7 foi incubada, em triplicata, com salina, como controle negativo, lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli* (100 ng/mL), como controle positivo ou GS-Gc (250 µg/mL) por 24h. Os histogramas representativos dos experimentos são mostrados em **A** e **C**. As médias dos valores de intensidade de fluorescência mediana (MFI) normalizados pela média do grupo salina são mostrados em **B** e **D**. Gráficos do tipo *contourplot* (gráficos de contorno), representativos dos experimentos, com gates contendo populações de células duplo-marcadas para CD86 e MHC classe II (CD86⁺/MHCII⁺) são mostrados em **E**. Gráfico do percentual de células CD86⁺/MHC II⁺ é mostrado em **F**. Para o experimento de citometria foram adquiridos 10⁴ eventos de *single cells*. Células não marcadas (NM) foram usadas como controle de fluorescência basal. Para a avaliação da expressão de CD86 e MHC classe II foram realizados três experimentos independentes. Os dados dos gráficos B, D e F foram apresentados como média ± desvio-padrão. As médias entre os grupos foram comparadas por análise de variância (ANOVA), seguida do pós-teste de Dunnett. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo salina.

A óxido nítrico sintase (NOS) é a enzima responsável pela produção de óxido nítrico (NO) a partir do aminoácido L-arginina. Existem três isoformas de NOS: i) a NOS neuronal (nNOS ou NOS1), ii) NOS endotelial (eNOS ou NOS3) e iii) NOS induzível (iNOS ou NOS2) (Kashfi *et al.*, 2021).

A iNOS é notavelmente expressa em células imunes, como células dendríticas e Mfs e, ao contrário das outras isoformas, sua expressão requer a presença de estímulos externos, como citocinas pró-inflamatórias (ex: IFN- γ , TNF- α , IL-1 β), produtos

bacterianos como LPS, vírus e outros agentes infecciosos (Cinelli *et al.*, 2020; Xue *et al.*, 2018). O aumento da expressão de iNOS, bem como o aumento da produção de NO constituem evidências importantes da ativação de Mfs para um fenótipo semelhante ao M1 (Xue *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2015).

Além disso, Mfs com fenótipo semelhante ao M1 também exibem um aumento da expressão de MHC classe II, cuja função imunológica é apresentar antígenos para linfócitos T CD4⁺, também conhecidos como células T auxiliares devido à função de contribuir com outras células imunes para a eliminação de patógenos por meio da secreção de citocinas pró-inflamatórias (Rock *et al.*, 2016).

Durante o processo de apresentação de antígenos pelos Mfs, outras moléculas de superfície, como CD86, também tem um aumento na sua expressão. Essas moléculas, denominadas moléculas co-estimulatórias, interagem com receptores na superfície das células T, como CD28, fornecendo sinais secundários essenciais para a ativação completa desses linfócitos de modo a iniciar a montagem de uma resposta imune adaptativa robusta (Porta *et al.*, 2015).

Por fim, resultados anteriores obtidos por nosso grupo mostraram que *GS-Gc* induziu aumento estatisticamente significativo da produção da citocina pró-inflamatória TNF- α , em RAW 264.7, nas concentrações de 100 $\mu\text{g/mL}$ (média = 1.391,13; desvio-padrão = \pm 301,74) e 250 $\mu\text{g/mL}$ (média = 1.583,87; desvio-padrão \pm 251,55) quando comparado ao controle negativo salina (Teles, 2017). O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória produzida durante processos infecciosos e inflamatórios (Yunna *et al.*, 2020). Durante a década de 70, Carswell e colaboradores demonstraram que o TNF- α induz a regressão tumoral (Carswell *et al.*, 1975).

Resultados obtidos da literatura mostram que polissacarídeos de fontes diversas são capazes de ativar Mfs para o fenótipo M1. Um estudo com polissacarídeos obtidos do caule da planta *Tinospora cordifolia* aumentaram a produção de NO (juntamente com o aumento da expressão de iNOS) e dos marcadores MHC classe II e CD-86 na superfície de macrófagos obtidos da cavidade peritoneal de BALB/c (Gupta *et al.*, 2017).

Uma agarana sulfatada obtida da alga vermelha *Gracilaria lemaneiformis* induziu a superexpressão do mRNA de iNOS, IL-6 e TNF- α e aumentou a liberação de ROS, NO, IL-6 e TNF- α em RAW 264.7 (REN *et al.*, 2017). Polissacarídeos de uma cepa

fúngica isolada de *Cordyceps sinensis* promoveram a proliferação de RAW 264.7, aumentam a fagocitose, induziram aumento da liberação de NO e aumentam a secreção de IL-6, IL-1 α , IL-10, TNF- α , e aumentaram a expressão de MHC II e CD86 (Meng *et al.*, 2014). Fucoïdanas não citotóxicas obtidas de *Cladosiphon okamuranus*, espécie de alga parda muito consumida no Japão, polarizaram Mfs para um fenótipo antitumoral *in vitro* e exerceram efeito antitumoral *in vivo* (Takeda *et al.*, 2012).

5.2 Análises químicas de GS-Gc

Uma vez que GS-Gc foi selecionada com base no seu perfil de atividades biológicas, decidimos investigar o rendimento do seu processo de isolamento, sua composição química, bem como a possível presença de contaminantes proteicos. A caracterização química de GS-Gc é apresentada na Tabela 4.

Tabela 3 - Análises químicas de GS-Gc.

Amostra	Rendimento (%)	Teor de D-galactose (%)	Teor de sulfato livre (%)	Proteínas solúveis (%)
GS-Gc	18.2	62.2	11.8	ND

Fonte: Elaborado pelo autor. ND - Não detectado pelo método.

O rendimento percentual da extração enzimática das GS da espécie *G. cornea* foi 18,2%, valor que é comparável àqueles obtidos por outros pesquisadores para a mesma espécie. Melo e colaboradores obtiveram rendimento de 21,4% (Melo *et al.*, 2002). Coura e colaboradores obtiveram rendimento de 18% (Coura *et al.*, 2012a) e Sousa e colaboradores encontraram o valor de 21% para o rendimento da extração (Souza *et al.*, 2017). Se compararmos com o rendimento percentual de outras espécies de algas marinhas vermelhas, podemos constatar que o rendimento também foi semelhante àquele encontrado por Willer e colaboradores para a espécie *S. filiformis* (21,3%) (Sousa *et al.*, 2016) e superior àquele obtido por Pereira e colaboradores para a espécie *Gelidium crinale* (2,1%) (Pereira *et al.*, 2005) e por Farias e colaboradores para a espécie *Botryocladia occidentalis* (4%) (Farias *et al.*, 2000). Entretanto, o rendimento foi inferior àquele encontrados por Rodrigues e colaboradores para a espécie *Halymenia*

pseudofloresia (40,5%) que utilizou o mesmo protocolo, porém, com um maior tempo de extração (24h) e secagem em estufa (Rodrigues *et al.*, 2009).

Em relação ao teor de D-galactose e sulfato livre, encontramos os valores de 62,2% e 11,8%, respectivamente. Esses valores também são semelhantes àqueles descritos na literatura por Coura e colaboradores para a mesma espécie foi de 68,8% para o teor de D-galactose e 15,6%, para o teor de sulfato livre. Além disso, não encontramos nenhuma contaminação por proteínas pelo método utilizado.

Portanto, os resultados encontrados em nosso estudo foram semelhantes aos valores descritos na literatura, e essa pequena variação pode ser atribuída às condições ambientais que podem afetar o rendimento das GS e suas propriedades físicas e químicas (Bezerra & Marinho-Soriano, 2010).

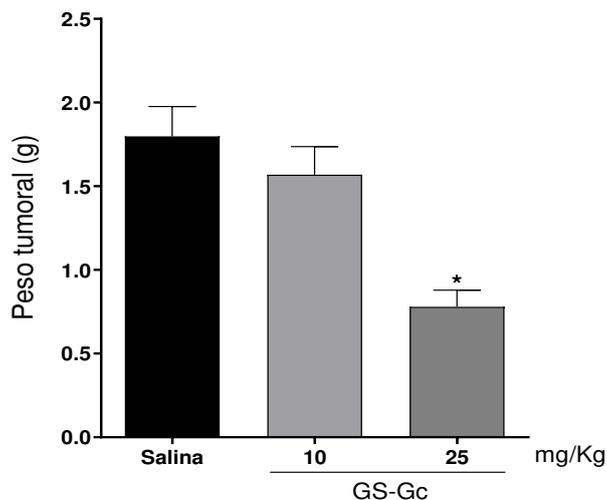
Considerando que nossos achados indicam que a agarana sulfatada de *G. cornea* apresenta potencial como um agente estimulante do sistema imune, decidimos investigar se GS-Gc seria capaz de inibir o crescimento tumoral em um modelo de melanoma murino.

5.3 Ensaio *in vivo*

5.3.1 Avaliação do potencial antitumoral de GS-Gc em um modelo de melanoma murino

O tratamento intraperitoneal (i.p.) com GS-Gc na dose de 25 mg/Kg inibiu o crescimento tumoral em animais transplantados com B16-F10. A média da massa tumoral do grupo salina foi de 1,8 g, enquanto a média do peso tumoral do grupo tratado com GS-Gc na dose de 10 mg/Kg foi de 1,57 g e de 0,78 g para o grupo tratado com GS-Gc na dose de 25 mg/Kg. Portanto, o percentual de inibição do crescimento tumoral no grupo tratado com *GS-Gc* na dose de 25 mg/kg foi de quase 60% em relação ao grupo salina. Este resultado merece ser enfatizado, uma vez que o GS-Gc não exibiu, *in vitro*, citotoxicidade direta contra B16-F10, linhagem celular que induz um modelo tumoral altamente agressivo quando inoculadas em animais (Figura 31).

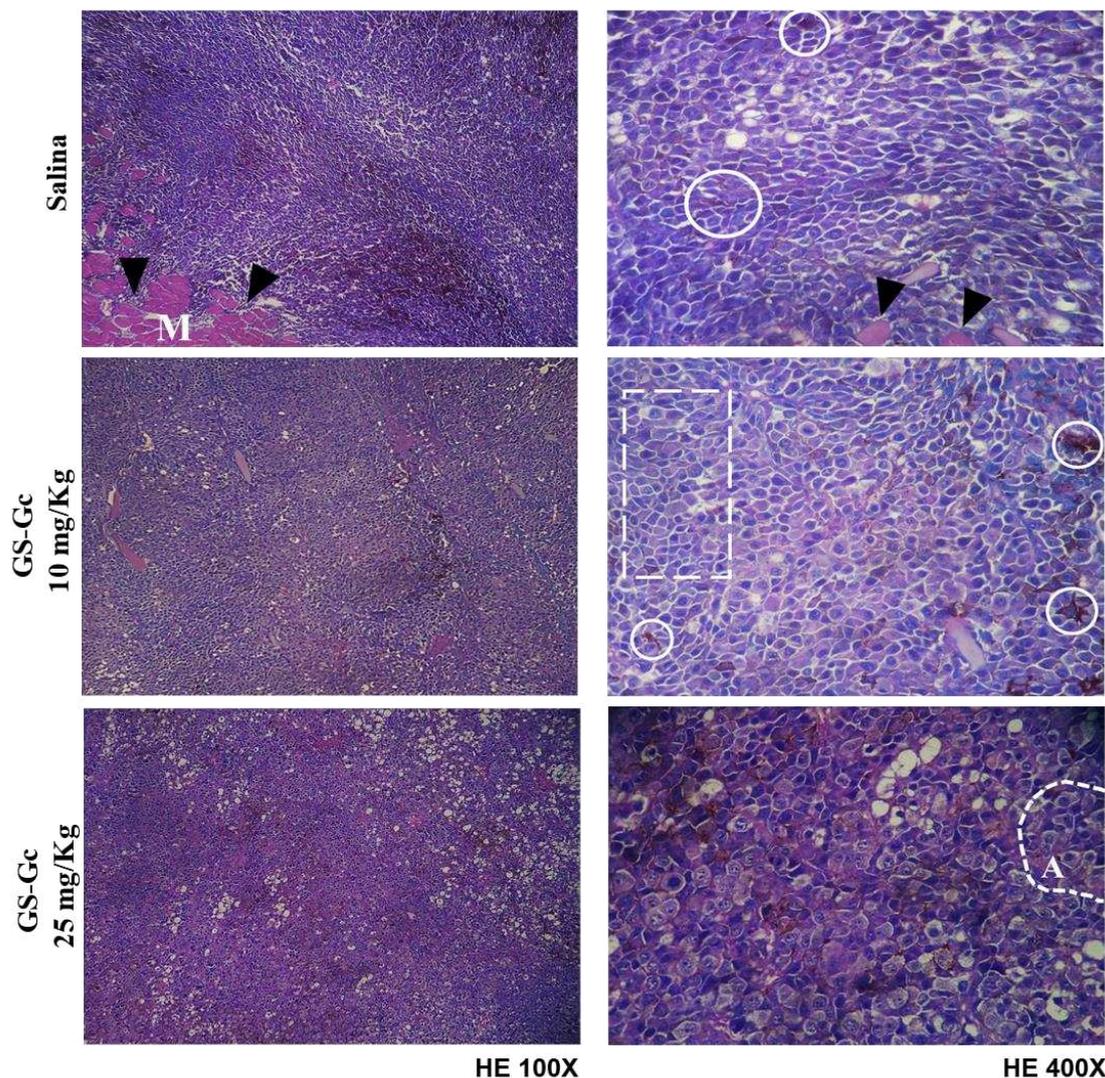
Figura 31 GS-Gc inibe na maior dose o crescimento tumoral em camundongos C57BL/6 transplantados com B16-F10.



Fonte: Elaborado pelo autor. Peso tumoral após tratamento com GS-Gc em diferentes doses. Os animais foram tratados, via intraperitoneal (i.p.), com GS-Gc 10 mg/Kg (N = 8), GS-Gc 25 mg/Kg (N = 8) ou salina, como controle negativo (N = 8), por 14 dias, começando um dia após o transplante do tumor. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. As médias dos grupos foram comparadas por análise de variância (ANOVA), seguido do pós-teste de Dunnett. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo salina.

A análise microscópica do tumor revelou, como esperado, a presença de células poligonais exibindo anisocitose e anisocariose em padrão de crescimento vertical com incontinência pigmentar e/ou manchas amelanóticas (Figura 32). Áreas de hemorragia, invasão muscular e vascular foram visualizadas em todos os grupos. Necrose de coagulação extensa foi observada no grupo tratado com 25 mg/kg de GS-Gc (dados não mostrados).

Figura 32 – GS-Gc não induziu alterações na arquitetura tumoral e nem foram encontrados achados significativos nos tumores de camundongos C57BL/6 transplantados com B16-F10.



Fonte: Elaborado pelo autor. Fotomicrografias do tumor. Seta preta indica invasão do tecido muscular (M). Círculos brancos indicam incontinência pigmentar. Retângulo tracejado indica manchas amelanóticas. O símbolo “A” indica anisonucleose. Os animais foram tratados, via intraperitoneal (i.p.), com GS-Gc 10 mg/Kg (N = 8), GS-Gc 25 mg/Kg (N = 8) ou salina, como controle negativo (N = 8), por 14 dias, começando um dia após o transplante do tumor.

Nos últimos anos, alguns trabalhos publicados na literatura têm relatado efeito antitumoral de polissacarídeos. Em um estudo utilizando fucoidana sulfatada da alga parda *Cladosiphon okamuranus*, os autores investigaram os efeitos da administração oral sobre o crescimento tumoral e sobre o tempo de sobrevivência em um modelo de câncer de cólon murino (camundongos BALB/c fêmeas). Foram utilizadas três frações de

fucoídana: as de baixo (LMWF: 6,5–40 kDa), médio (IMWF: 110–138 kDa) e alto peso molecular (HMWF: 300–330 kDa). Os camundongos foram alimentados por 28 dias com uma dieta em pó contendo fucoídana [5% (m/m)] ou sem fucoídana (controle negativo). Após a inoculação do tumor, os animais mantiveram a dieta por mais 14 dias. O grupo IMWF apresentou redução estatisticamente significativa no peso tumoral em comparação com o controle negativo. Além disso, o estudo revelou que o tempo de sobrevivência foi praticamente dobrado em todos os grupos em comparação com o controle negativo. Os autores sugeriram que o efeito antitumoral observado pode ter sido mediado pela imunidade inata do trato gastrointestinal, uma vez que no grupo IMWF houve aumento de células NK no baço, e o efeito antitumoral não foi reproduzido em camundongos nocaute para Myd-88 (molécula adaptadora essencial para receptores do tipo Toll) (Azuma *et al.*, 2012).

Outros estudos demonstraram que polissacarídeos sem atividade citotóxica *in vitro* foram capazes de inibir o crescimento tumoral *in vivo*. Um desses estudos utilizou polissacarídeos (goma) obtidos do cajueiro (*Anacardium occidentale*) testados contra diferentes linhagens tumorais *in vitro* (HL-60: leucemia promielocítica aguda; HCT-116: carcinoma colorretal humano; PC-3: adenocarcinoma de próstata humano; B16-F10: melanoma metastático murino e SF-295: glioblastoma humano), não exibiram citotoxicidade. Entretanto, em um modelo de melanoma murino (camundongos C57BL/6 fêmeas) com tratamento diário, ao longo de 15 dias, iniciando no dia seguinte ao transplante das células tumorais, os autores verificaram que a goma do cajueiro promoveu redução de 36,9% (50 mg/Kg) e 43% (100 mg/Kg) no peso tumoral em comparação ao grupo salina (Barros *et al.*, 2020).

Em um trabalho publicado por Lins e colaboradores (2009), utilizando PS da alga vermelha *Champia feldmannii*, os pesquisadores verificaram que a amostra não exibiu citotoxicidade *in vitro* significativa contra um conjunto de linhagens tumorais humanas (HL-60: leucemia promielocítica humana; MDA-MB-435: melanoma humano; SF-295: glioblastoma humano e HCT-8: câncer de cólon humano). Entretanto, em um modelo murino de sarcoma-180 (camundongos Swiss fêmeas) com tratamento diário, ao longo de sete dias, começando no dia seguinte à inoculação das células tumorais, o PS causou redução de 48,16% (10 mg/kg) e de 48,62% (25 mg/kg) no peso tumoral, quando comparado ao grupo salina. Além disso, os pesquisadores demonstraram efeito sinérgico entre a amostra e o quimioterápico 5-fluorouracil (5-FU), pois quando administrado de

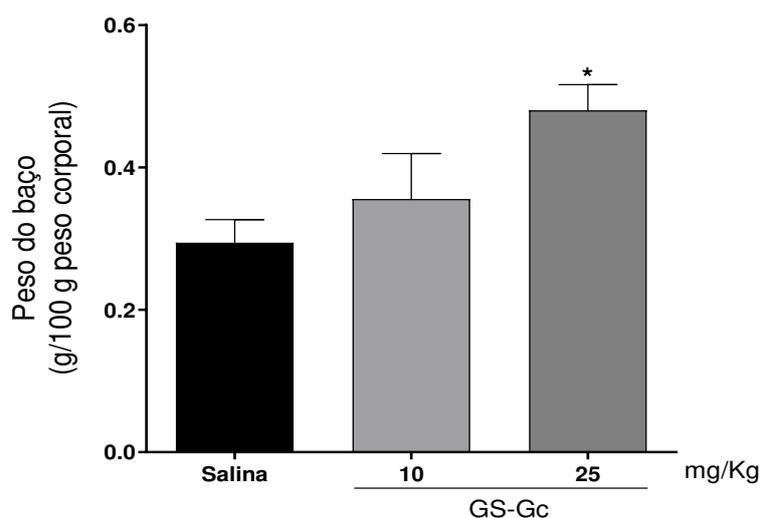
forma isolada, 5-FU (10 mg/Kg) reduziu o peso tumoral em 48,66%. Porém, quando associado à amostra (PS 10 mg/Kg + 5-FU 10 mg/kg), a inibição do peso tumoral aumentou para 68,32% (Lins *et al.*, 2009).

Nosso grupo publicou recentemente um estudo utilizando uma fucoidana sulfatada obtida da alga parda *Dictyota caribaea* demonstrando que, embora o PS não tenha exibido citotoxicidade *in vitro* contra duas linhagens tumorais (HCT 116 e B16-F10), em um modelo murino de Sarcoma-180 (camundongos Swiss fêmeas) com tratamento diário, ao longo de 7 dias, começando no dia seguinte à inoculação das células tumorais, o PS promoveu redução de 40% (25 mg/Kg) e 51% (50 mg/kg) do peso tumoral, quando comparado ao grupo salina (Assef *et al.*, 2021)

5.3.2 Avaliação do potencial imunoestimulante de GS-Gc *in vivo*

A administração de GS-Gc na dose de 25 mg/Kg resultou em um aumento de 65,5% no peso médio do baço dos camundongos em relação à média do grupo salina (Figura 33).

Figura 33 - GS-Gc induz na maior dose aumento do peso do baço em camundongos C57BL/6 transplantados com B16-F10 .

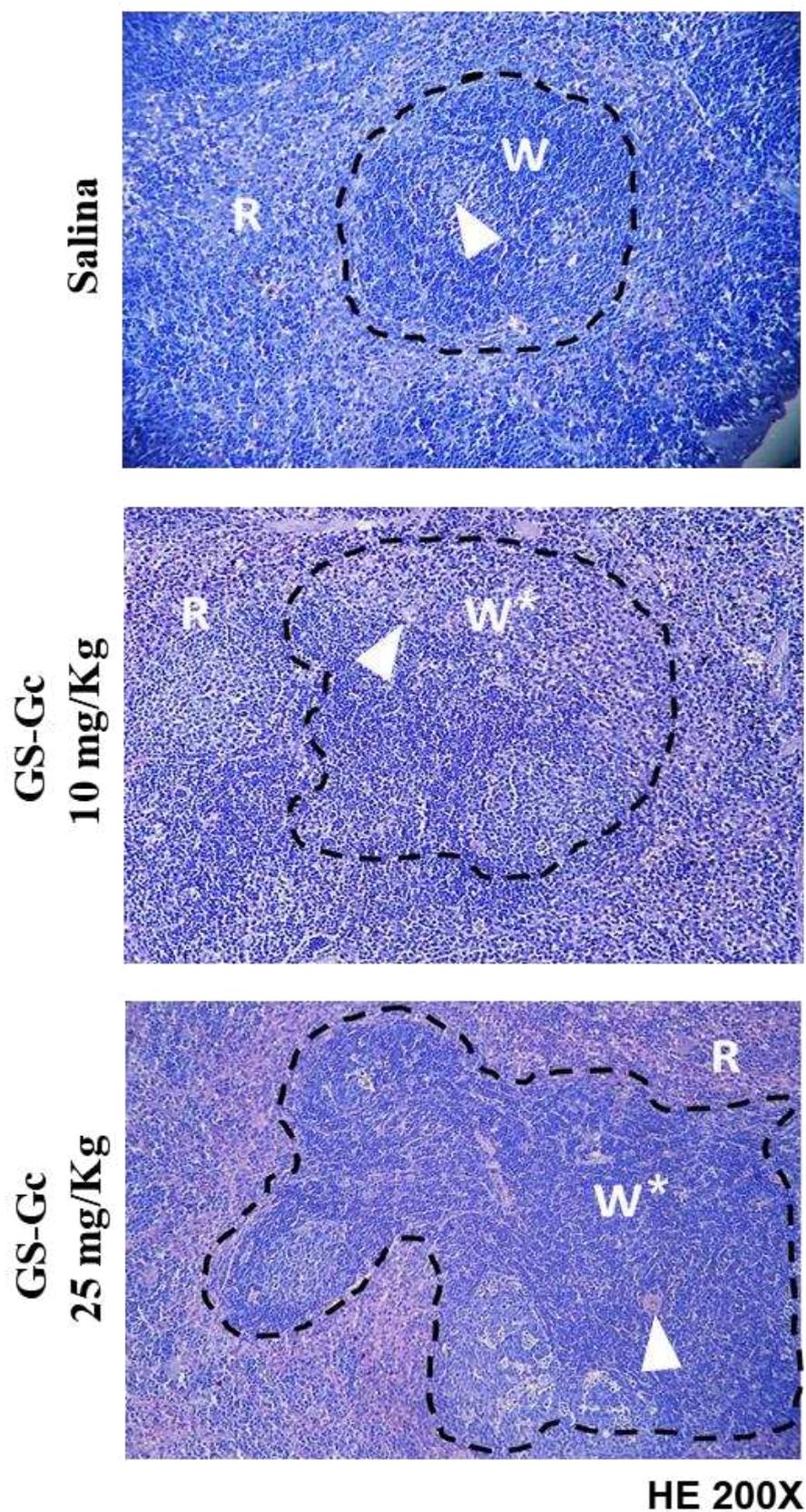


Fonte: Elaborado pelo autor. Peso do baço normalizado por 100 g do peso corporal de camundongos após tratamento com GS-Gc (10 ou 25 mg/Kg). Os animais foram tratados, via intraperitoneal (i.p.), com GS-Gc 10 mg/Kg (N = 8), GS-Gc 25 mg/Kg (N = 8) ou salina, como controle negativo (N = 8), por 14 dias, começando um dia após o transplante do tumor. Os resultados foram expressos como média \pm desvio

padrão. As médias dos grupos foram comparadas por análise de variância (ANOVA), seguido do pós-teste de Dunnett. $*p < 0,05$ quando comparado ao grupo salina.

Além disso, a análise histopatológica dos baços dos animais tratados revelou achados histológicas semelhantes entre os grupos experimentais, sendo representada por uma polpa branca contida por uma camada de linfócitos localizados excentricamente em relação às arteríolas centrais, às vezes sem visualização do centro germinativo. Porém, nos grupos tratados com GS-Gc na dose de 10 mg/Kg ou 25 mg/Kg a polpa branca apresentou-se irregular no limite com a polpa vermelha. Porém, a proporcionalidade entre polpa branca e vermelha foi mantida (Figura 34).

Figura 34 – Fotomicrografias do baço de camundongos C57BL/6 transplantados com B16-F10



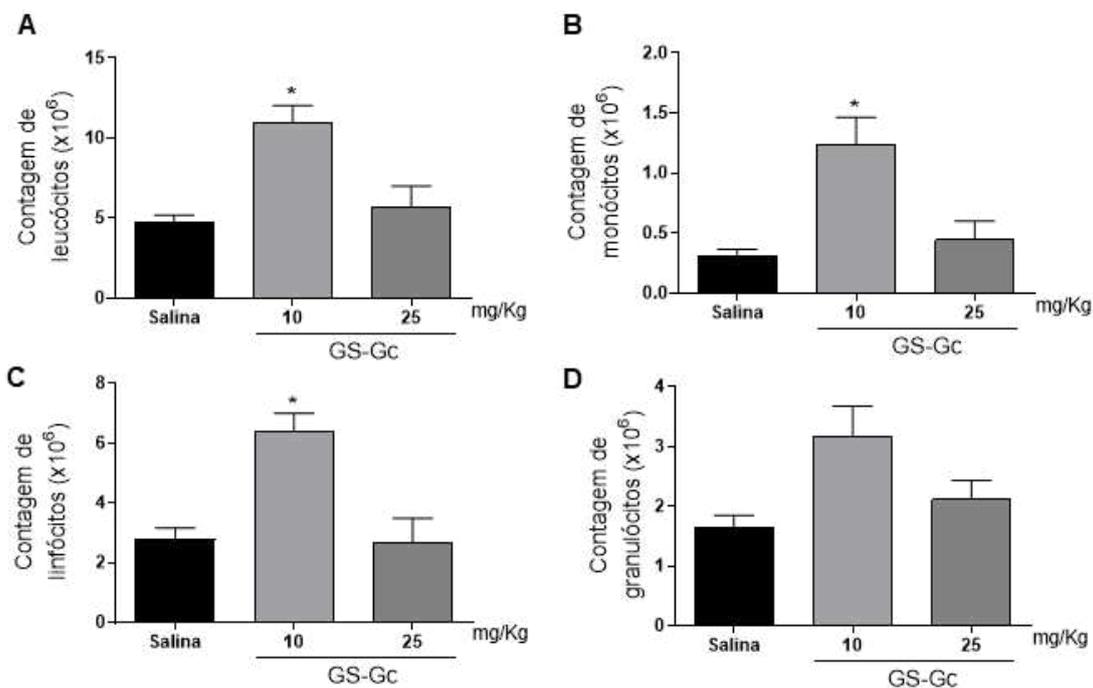
Fonte: Elaborado pelo autor. Seta branca indica arteríola central. O símbolo “R” indica polpa vermelha, O símbolo “W” indica polpa branca regular. O símbolo “W*” indica polpa branca irregular.

O baço é um órgão linfóide secundário composto por duas regiões principais: a polpa vermelha, responsável pela filtração do sangue e remoção de eritrócitos velhos e danificados, e a polpa branca, que é rica em células imunes, como os linfócitos, e desempenha um papel fundamental na resposta imune adaptativa. O aumento do peso do baço (esplenomegalia) ocorre por várias razões, incluindo infecções, inflamações e alguns tipos de câncer como leucemias e linfomas. A polpa branca contém folículos linfóides bem definidos. Entretanto, durante a ativação da resposta imune, pode haver uma expansão e desorganização desses folículos devido ao aumento da proliferação de células imunes e à formação de centros germinativos, onde os linfócitos B se diferenciam e amadurecem (Lewis *et al.*, 2019). Nesse sentido, o aumento do peso do baço acompanhado da desorganização da polpa branca nos animais tratados com *GS-Gc* são indícios da ativação da resposta imune do hospedeiro. Além disso, a atividade antitumoral observada pode ter sido mediada pelo sistema imunológico, uma vez que a galactana não exibiu citotoxicidade direta contra B16-F10 *in vitro*.

Fucoidanas da alga parda *Dictyota caribaea*, tiveram o efeito antitumoral *in vivo* atribuído à imunoestimulação, pois verificou-se que o tratamento levou a um aumento no peso do baço com hiperplasia da polpa branca (Assef *et al.*, 2021). A GS de *Gracilaria lemaneiformis* inibiu o crescimento tumoral em um modelo murino de hepatoma. Além disso, promoveu um efeito imunomodulador representado pelo aumento do peso do baço e do timo e pelo aumento da atividade fagocítica dos Mfs (Fan *et al.*, 2012). De Sousa e colaboradores (2007) demonstraram que alginatos da alga parda *Sargassum vulgare* foram capazes de inibir (via oral) o crescimento tumoral em um modelo de Sarcoma-180 murino e verificaram que a amostra também causava uma hiperplasia da polpa branca do baço dos animais tratados, sugerindo atividade imunoestimulante desse composto (De Sousa *et al.*, 2007). Outra evidência de PS com efeito antitumoral associado à imunoestimulação vem do trabalho com os PS de *C. feldmannii*, em virtude do fato de que os autores verificaram aumento do peso relativo do baço acompanhado de hiperplasia dos folículos linfóides, bem como aumento da produção de anticorpos em um modelo de vacinação utilizando o antígeno ovalbumina (OVA) (Lins *et al.*, 2009).

Em relação à análise hematológica, GS-Gc aumentou, na dose de 10 mg/Kg, a contagem de leucócitos totais, monócitos e linfócitos em relação ao grupo salina (Figura 35 A-C). Entretanto, a contagem de granulócitos não foi alterada pelos tratamentos (Figura 35 D).

Figura 35 – GS-Gc induz aumento na contagem de leucócitos em camundongos C57BL/6 transplantados com B16-F10.



Fonte: Elaborado pelo autor. **A.** Contagem de leucócitos totais. **B.** Contagem de monócitos. **C.** Contagem de granulócitos. **D.** Contagem de linfócitos. Os animais foram tratados via intraperitoneal (i.p.), em triplicata, com GS-Gc (10 ou 25 mg/Kg) ou salina, como controle negativo, por 14 dias, começando um dia após o transplante do tumor. Os animais foram tratados, via intraperitoneal (i.p.), com GS-Gc 10 mg/Kg (N = 8), GS-Gc 25 mg/Kg (N = 8) ou salina, como controle negativo (N = 8), por 14 dias, começando um dia após o transplante do tumor. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. As médias dos grupos foram comparadas por análise de variância (ANOVA), seguido do pós-teste de Dunnett. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo salina.

Visto que GS-Gc, na dose de 25 mg/Kg, reduziu o crescimento tumoral e promoveu aumento no peso do baço, acompanhado por desorganização da polpa branca, indicando um possível efeito antitumoral mediado pelo sistema imunológico, seria razoável supor que um eventual aumento na contagem de leucócitos também ocorreria nessa dose. Entretanto, isso não se confirmou.

Inicialmente, é importante ressaltar que alguns compostos estimulam efeitos imunológicos sem um perfil clássico de resposta dose-dependente devido a diferentes razões, como a afinidade pelo receptor e citotoxicidade. Com os dados de que dispomos não é possível chegar a alguma conclusão. Entretanto, nossa hipótese é de que *GS-Gc* induz hematopoiese estimulando (direta ou indiretamente) as células progenitoras da medula óssea em uma dose mais baixa (10 mg/kg). Por outro lado, na dose mais alta (25 mg/kg) o efeito em outros receptores com menor afinidade poderia alterar o efeito biológico final.

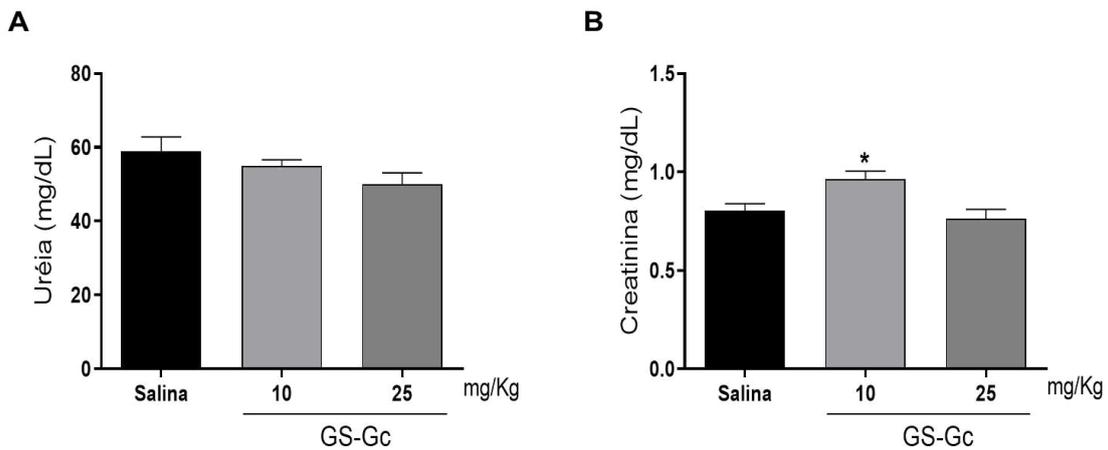
Todavia, independente do mecanismo subjacente, esse achado é de grande importância, sobretudo, quando se considera que uma das principais limitações da quimioterapia convencional é a leucopenia (Aboud *et al.*, 2022). Desse modo, a utilização de um produto natural não citotóxico, capaz de estimular a produção de leucócitos, pode ajudar os pacientes submetidos à quimioterapia citotóxica.

Resultados demonstrando que polissacarídeos de algas induzem a hematopoiese em modelos animais estão disponíveis na literatura (Anisimova *et al.*, 2018; Lins *et al.*, 2009; Niu *et al.*, 2019; Qin *et al.*, 2023; Shen *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2021).

5.3.3 Análise de toxicidade do *GS-Gc*

Os níveis séricos de uréia dos animais tratados com *GS-Gc* (em ambas as doses) não foram alterados (Figura 36 A). Entretanto, os níveis séricos de creatinina aumentaram na dose de 10 mg/Kg (Figura 36 B).

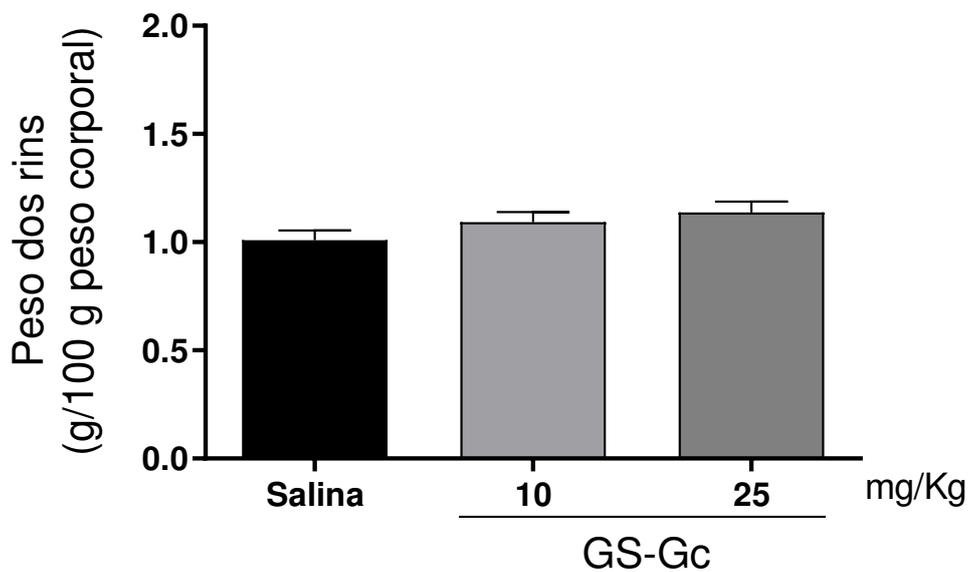
Figura 36 - GS-Gc não altera os níveis séricos de creatinina em camundongos C57BL/6 transplantados com B16-F10.



Fonte: Elaborado pelo autor. **A.** Concentração sérica de uréia. **B.** Concentração sérica de creatinina. Os animais foram tratados, via intraperitoneal (i.p.), com GS-Gc 10 mg/Kg (N = 8), GS-Gc 25 mg/Kg (N = 8) ou salina, como controle negativo (N = 8), por 14 dias, começando um dia após o transplante do tumor. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. As médias dos grupos foram comparadas por análise de variância (ANOVA), seguido do pós-teste de Dunnett. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo salina.

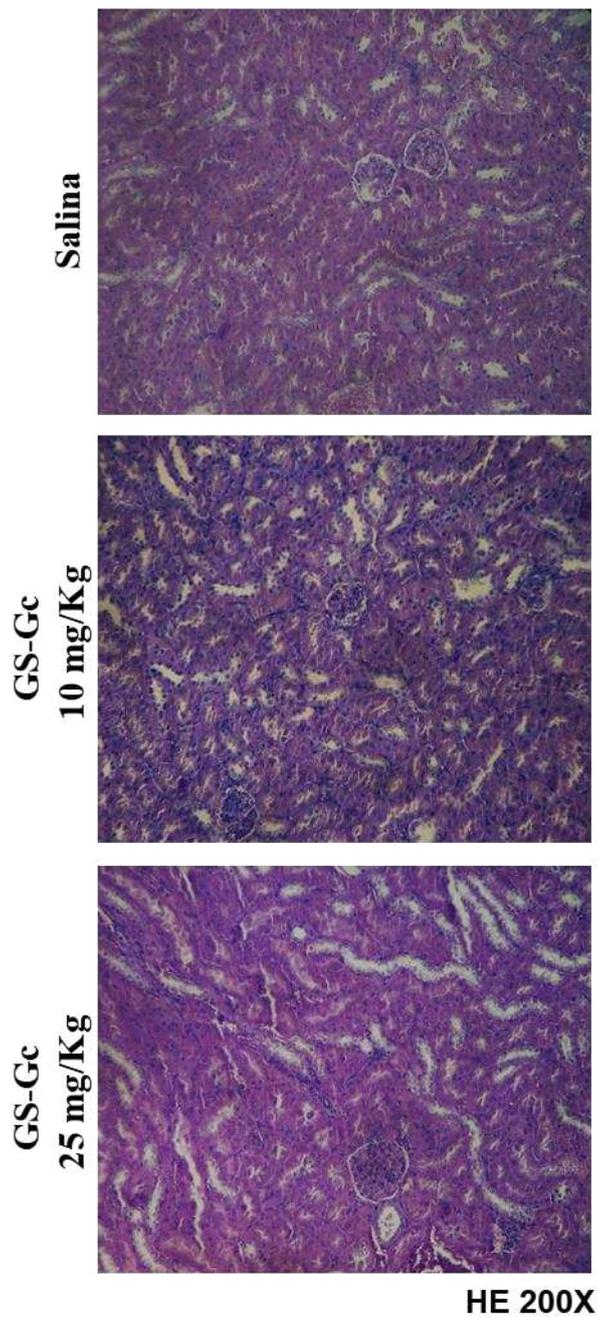
A uréia e a creatinina são marcadores da função renal e níveis séricos aumentados podem indicar disfunção renal (Gowda *et al.*, 2010). Porém, não houve diferença no peso dos rins entre os grupos (Figura 37) e a análise histopatológica não mostrou diferenças morfológicas entre os grupos havendo preservação das estruturas anatômicas (Figura 38).

Figura 37 - GS-Gc não altera o peso dos rins em camundongos C57BL/6 transplantados com B16-F10.



Fonte: Elaborado pelo autor. Peso dos rins normalizado por 100 g de peso corporal dos camundongos após tratamento com GS-Gc em diferentes doses. Os animais foram tratados, via intraperitoneal (i.p.), com GS-Gc 10 mg/Kg (N = 8), GS-Gc 25 mg/Kg (N = 8) ou salina, como controle negativo (N = 8), por 14 dias, começando um dia após o transplante do tumor. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. As médias dos grupos foram comparadas por análise de variância (ANOVA), seguido do pós-teste de Dunnett. $*p < 0,05$ quando comparado ao grupo salina.

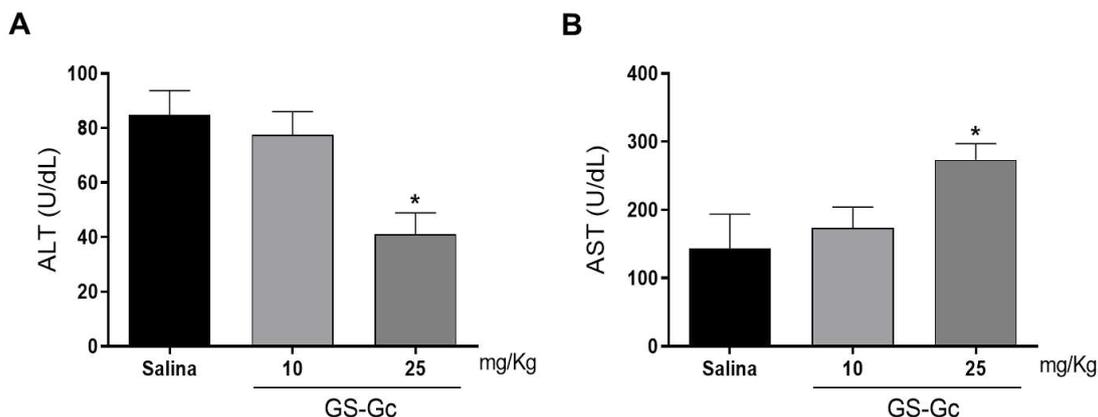
Figura 38 - GS-Gc não induz alterações morfológicas nos rins de camundongos C57BL/6 transplantados com B16-F10.



Fonte: Elaborado pelo autor. Fotomicrografias dos rins. Os animais foram tratados, via intraperitoneal (i.p.), com GS-Gc 10 mg/Kg (N = 8), GS-Gc 25 mg/Kg (N = 8) ou salina, como controle negativo (N = 8), por 14 dias, começando um dia após o transplante do tumor.

Em contrapartida, GS-Gc, na dose de 25 mg/Kg, reduziu os níveis séricos do marcador alanina aminotransferase (ALT) (Figura 39 A), porém, aumentou os níveis séricos da enzima aspartato aminotransferase (AST) (Figura 39 B), quando comparado ao grupo salina.

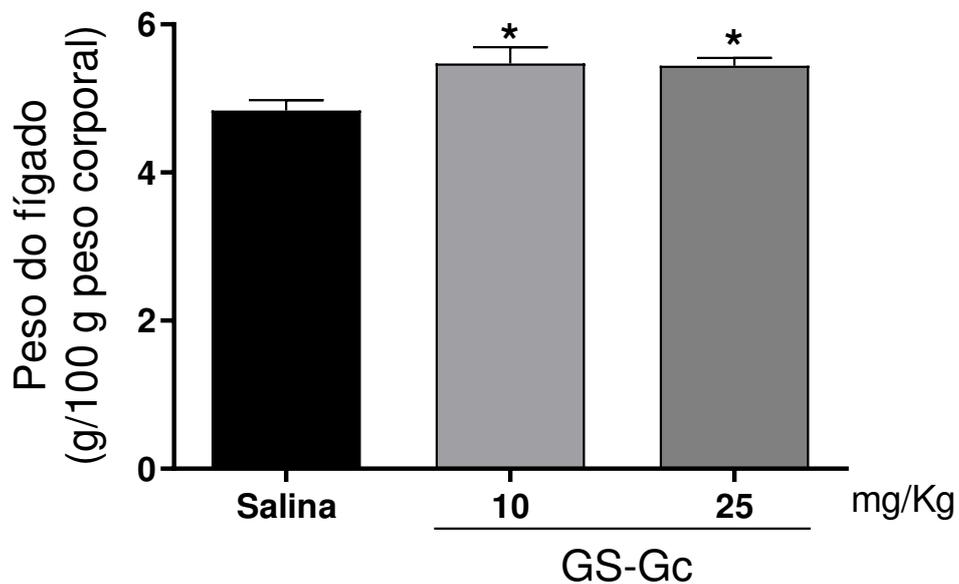
Figura 39 - GS-Gc altera os níveis séricos de ALT e AST em camundongos C57BL/6 transplantados com B16-F10.



Fonte: Elaborado pelo autor. **A.** Concentração sérica da enzima alanina aminotransferase (ALT). **B.** Concentração sérica da enzima aspartato aminotransferase. Os animais foram tratados, via intraperitoneal (i.p.), com GS-Gc 10 mg/Kg (N = 8), GS-Gc 25 mg/Kg (N = 8) ou salina, como controle negativo (N = 8), por 14 dias, começando um dia após o transplante do tumor. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. As médias dos grupos foram comparadas por análise de variância (ANOVA), seguido do pós-teste de Dunnett. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo salina.

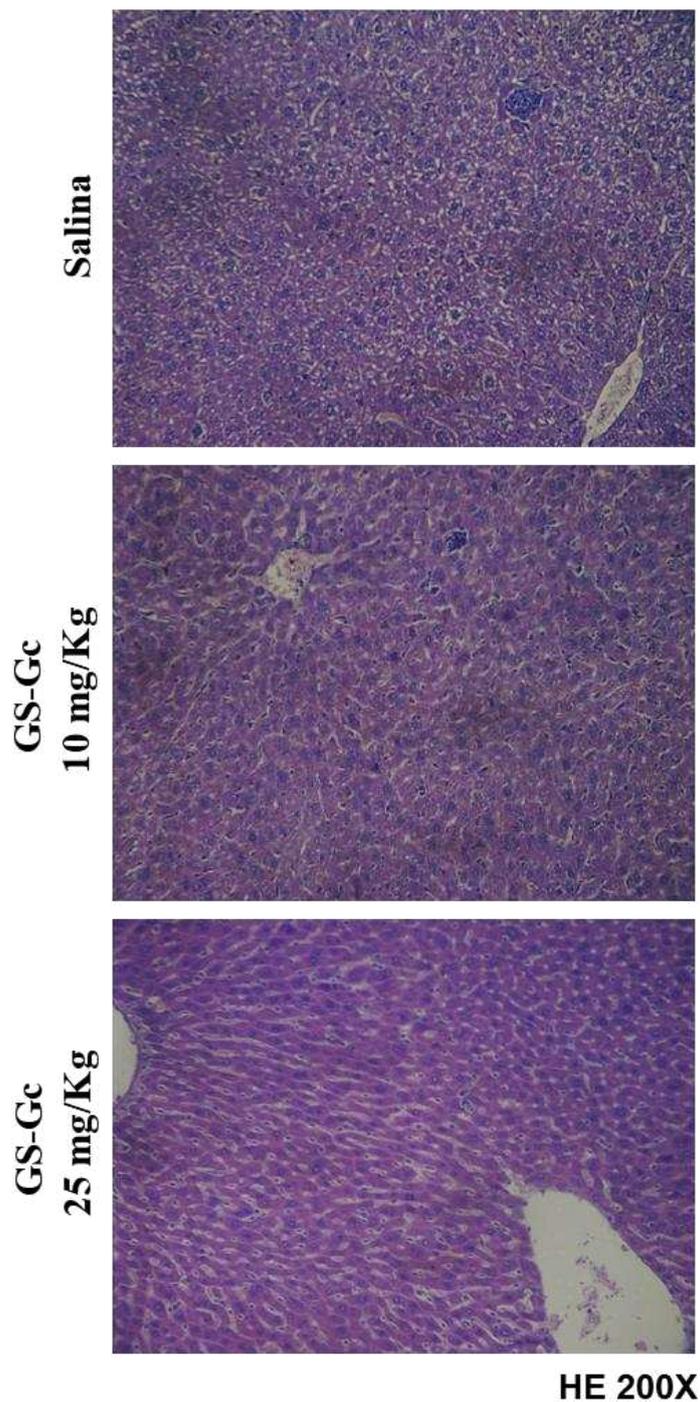
Em relação às enzimas AST e ALT, elas são os marcadores mais utilizados para o diagnóstico clínico de lesão hepática (McGill, 2016). No presente estudo, verificamos aumento no peso do fígado nos grupos tratados com GS-Gc em comparação ao grupo salina (Figura 40). Entretanto, a análise histopatológica não revelou diferenças morfológicas entre os grupos. Apenas foi evidenciada a presença de ninhos ou células inflamatórias dispersas em todos os grupos, mas sem presença de necrose hepatocelular focal (Figura 41).

Figura 40 - GS-Gc aumenta o peso do fígado de camundongos C57BL/6 transplantados com B16-F10.



Fonte: Elaborado pelo autor. Peso do fígado normalizado por 100 g de peso corporal de camundongos após tratamento com GS-Gc em diferentes doses. Os animais foram tratados, via intraperitoneal (i.p.), com GS-Gc 10 mg/Kg (N = 8), GS-Gc 25 mg/Kg (N = 8) ou salina, como controle negativo (N = 8), por 14 dias, começando um dia após o transplante do tumor. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. As médias dos grupos foram comparadas por análise de variância (ANOVA), seguido do pós-teste de Dunnett. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo salina.

Figura 41 - GS-Gc não induz alterações morfológicas no fígado de camundongos C57BL/6 transplantados com B16-F10.



Fonte: Elaborado pelo autor. Fotomicrografias do fígado.

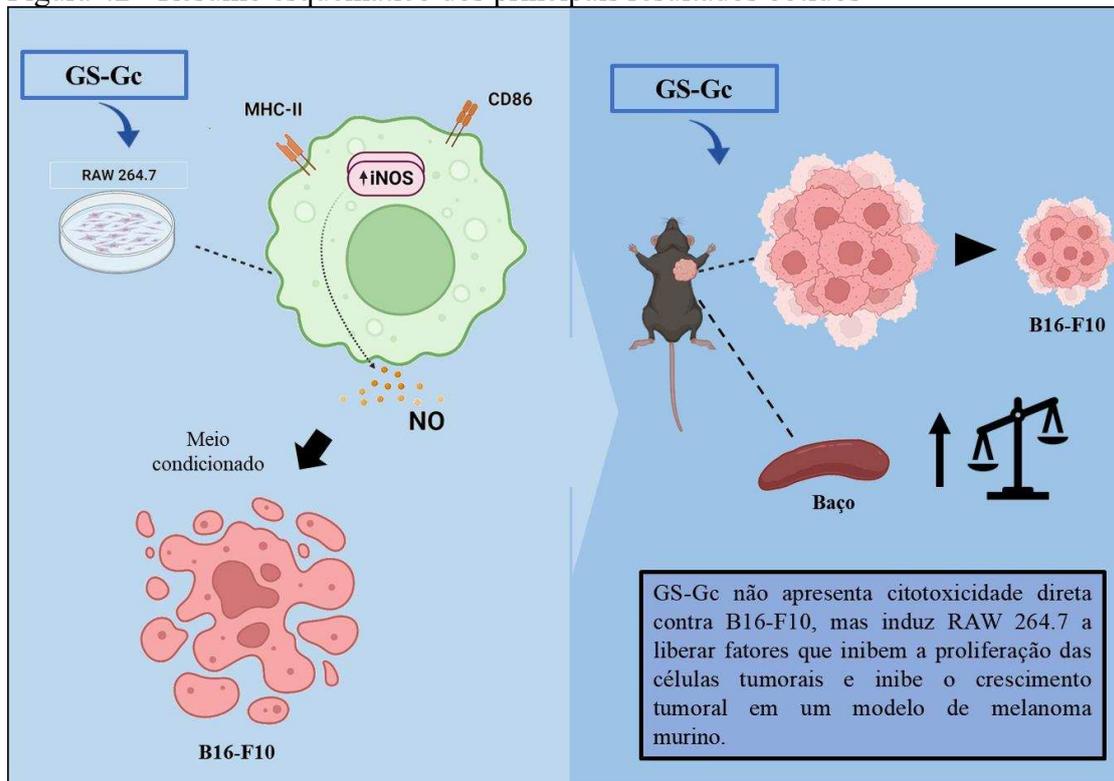
Embora o tratamento com GS-Gc na dose de 25 mg/Kg tenha alterado os níveis dos marcadores hepáticos analisados (redução de ALT e aumento de AST), associado a um aumento no peso do fígado em ambas as doses testadas, esses achados

podem não ter significado clínico importante. Assef e colaboradores (2021) também verificaram alteração nos níveis séricos de ALT e AST nos animais tratados com fucoidana de *D. caribaea* mas não encontraram aumento no peso do fígado (Assef *et al.*, 2021).

Condições como esteatose hepática (presença de gordura no fígado) podem alterar os níveis de marcadores hepáticos. Por outro lado, a ocorrência de hiperplasia (uma adaptação fisiológica em resposta a um estímulo que consiste no aumento do número de células em um tecido ou órgão) poderia explicar o aumento no peso do fígado sem haver necessariamente alterações na arquitetura histológica do órgão. No entanto, mais investigações devem ser realizadas para compreender melhor esse achado.

Uma visão geral dos principais resultados do presente estudo é apresentada na Figura 42.

Figura 42 - Resumo esquemático dos principais resultados obtidos



Fonte: Elaborado pelo autor com BioRender.com

6 CONCLUSÃO

Em síntese, nossa investigação revelou uma agarana sulfatada obtida da macroalga marinha vermelha *Gracilaria cornea* com potencial imunoestimulante que foi capaz de inibir o crescimento tumoral em um modelo de melanoma murino sem, no entanto, exercer atividade citotóxica direta contra essas células tumorais. Adicionalmente, observou-se *in vitro* que o polissacarídeo promoveu a ativação de macrófagos para um fenótipo pró-inflamatório (semelhante ao M1). Ainda mais importante, é constatar que essa macromolécula induziu uma mudança funcional nos macrófagos, conforme evidenciado pela inibição da proliferação de células de melanoma *in vitro* em resposta ao meio-condicionado produzido pelos macrófagos estimulados com a amostra.

REFERÊNCIAS

- ABOUD, K. *et al.* Cytotoxic chemotherapy: clinical aspects. **Medicine**, [S. l.], v. 51, n. 1, p. 23–27, 2022. DOI: 10.1016/j.mpmed.2022.10.005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2022.10.005>.
- ADAN, A. *et al.* Flow cytometry: basic principles and applications. **Crit Rev Biotechnol.**, 2017. DOI: 10.3109/07388551.2015.1128876. Disponível em: <http://informahealthcare.com/bty>. Acesso em: 1 mar. 2024.
- AKHTAR, M. *et al.* Paget’s “Seed and Soil” Theory of Cancer Metastasis. **Advances In Anatomic Pathology**, [S. l.], v. 26, n. 1, p. 69–74, 2019.
- ALBALASMEH, A. A., BERHE, A. A., & GHEZZEHEI, T. A. A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. **Carbohydrate Polymers**, v. 97(2), p. 253–261, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.04.072>
- ALLAVENA, P.; MANTOVANI, A. Immunology in the clinic review series; focus on cancer: tumour-associated macrophages: undisputed stars of the inflammatory tumour microenvironment. **Clinical and Experimental Immunology**, [S. l.], v. 167, n. 2, p. 195, 2012. DOI: 10.1111/J.1365-2249.2011.04515.X. Disponível em: </pmc/articles/PMC3278685/>. Acesso em: 18 fev. 2024.
- ANDERSON, N. M.; SIMON, M. C. The tumor microenvironment. **Current Biology**, [S. l.], v. 30, n. 16, p. R921–R925, 2020. DOI: 10.1016/j.cub.2020.06.081. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2020.06.081>.
- ANISIMOVA, N. Y. *et al.* Influence of modified fucoidan and related sulfated oligosaccharides on hematopoiesis in cyclophosphamide-induced mice. **Mar. Drugs**, [S. l.], v. 16, n. 9, 2018. DOI: 10.3390/md16090333. Disponível em: www.mdpi.com/journal/marinedrugs. Acesso em: 4 mar. 2024.
- ARATA, P. X. *et al.* Sulfated polysaccharides in the freshwater green macroalga *Cladophora surrera* not linked to salinity adaptation. **Frontiers in Plant Science**, [S. l.], v. 8, p. 303410, 2017. DOI: 10.3389/FPLS.2017.01927/BIBTEX. Disponível em: www.frontiersin.org. Acesso em: 14 fev. 2024.
- ARAÚJO, I. W. F. *et al.* Role of central opioid on the antinociceptive effect of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Solieria filiformis* in induced temporomandibular joint pain. **International Immunopharmacology**, v. 44, p. 160–167, 2017.
- ASSEF, A. N. B. *et al.* Antitumor and immunostimulating sulfated polysaccharides from brown algae *Dictyota caribaea*. **Carbohydrate Polymer Technologies and Applications**, [S. l.], v. 2, 2021. DOI: 10.1016/j.carpta.2021.100142.
- ASSREUY, A. M. S. Vascular Effects of a Sulfated Polysaccharide from the Red Marine Alga *Solieria filiformis*. **Natural Product Communications**, v. 5, n. 8, p. 1267 – 1272, 2010.
- AZUMA, K. *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**, [S. l.], v. 10, n. 10, p. 2337–2348, 2012. DOI: 10.3390/md10102337.

BARROS, A. B. *et al.* Evaluation of antitumor potential of cashew gum extracted from *Anacardium occidentale* Linn. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 154, p. 319–328, 2020. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.03.096. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.096>.

BAUDINO, T. Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment. **Current Drug Discovery Technologies**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 3–20, 2015. DOI: 10.2174/1570163812666150602144310. Disponível em: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1570-1638&volume=12&issue=1&spage=3>.

BEZERRA, A. F.; MARINHO-SORIANO, E. Cultivation of the red seaweed *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta) in tropical waters of northeast Brazil. **Biomass and Bioenergy**, [S. l.], v. 34, n. 12, p. 1813–1817, 2010. DOI: 10.1016/j.biombioe.2010.07.016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.07.016>.

BOCHENEK, M. *et al.* Transcriptome analysis of the sulfate deficiency response in the marine microalga *Emiliania huxleyi*. **New Phytologist**, [S. l.], v. 199, p. 650–662, 2013. DOI: 10.1111/nph.12303. Disponível em: <https://nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/nph.12303>. Acesso em: 14 fev. 2024.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248–254, 1976. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.

BROWN, J. S. *et al.* Updating the Definition of Cancer. **Mol Cancer Res.**, [S. l.], v. 21, n. 11, p. 1142–1147, 2023. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-23-0411.

BURNEY, S. *et al.* The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxy nitrite. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, [S. l.], v. 424, n. 1–2, p. 37–49, 1999. DOI: 10.1016/S0027-5107(99)00006-8.

CALVO, G. H. *et al.* Disaccharides obtained from carrageenans as potential antitumor agents. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 9, n. 1, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-43238-y.

CARSWELL, E. A. *et al.* An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors (activated macrophage). **Immunology**, v. 72(9), p. 3666–3670, 1975.

CASSETTA, L; POLLARD, J. W. A timeline of tumour-associated macrophage biology. **Nature Reviews Cancer**, [S. l.], v. 23, n. 4, p. 238–257, 2023. DOI: 10.1038/s41568-022-00547-1

CAZAP, E. *et al.* Structural Barriers to Diagnosis and Treatment of Cancer in Low- and Middle-Income Countries: The Urgent Need for Scaling Up. **J Clin Oncol.**, v. 34(1), 2016. doi:10.1200/JCO.2015.61.9189.

CENTENO, P.P.; PAVET, V.; MARAIS, R. The journey from melanocytes to melanoma. **Nat Rev Cancer**, Londres, v. 23, n 6, 372-390, Abr. 2023. DOI 10.1038/s41568-023-

00565-7. Disponível em <https://doi.org/10.1038/s41568-023-00565-7>. Acesso em: 4 mar. 2024.

CHEN, Y. *et al.* Tumor-recruited M2 macrophages promote gastric and breast cancer metastasis via M2 macrophage-secreted CHI3L1 protein. **Journal of Hematology and Oncology**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 1–13, 2017. DOI: 10.1186/s13045-017-0408-0.

CHEN, Y. *et al.* Tumor-associated macrophages: An accomplice in solid tumor progression. **Journal of Biomedical Science**, [S. l.], v. 26, n. 1, p. 1–13, 2019. DOI: 10.1186/s12929-019-0568-z.

CIANCIA, M.; MATULEWICZ, M. C.; TUVIKENE, R.. Structural Diversity in Galactans From Red Seaweeds and Its Influence on Rheological Properties. **Frontiers in Plant Science**, [S. l.], v. 11, n. September, p. 1–19, 2020. DOI: 10.3389/fpls.2020.559986.

CICHOREK, M. *et al.* Skin melanocytes: Biology and development. **Postep Derm Alergol**, Poznań, v. 30, n 1, 30-41, Fev. 2013. DOI 10.5114/pdia.2013.33376. Disponível em: <https://doi.org/10.5114/pdia.2013.33376>. Acesso em: 3 mar. 2024.

CINELLI, M. A. *et al.* Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition. **Medicinal Research Reviews**, 2020. DOI: 10.1002/med.21599.

COLEGIO, O. R. *et al.* Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. **Nature**, [S. l.], v. 513, n. 7519, p. 559–563, 2014. DOI: 10.1038/nature13490.

COURA, C. O. *et al.* Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of Sulphated Polysaccharides from the Red Seaweed *Gracilaria cornea*. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, [S. l.], v. 110, n. 4, p. 335–341, 2012. DOI: 10.1111/j.1742-7843.2011.00811.x.

COURA, C. O. *et al.* Mechanisms involved in the anti-inflammatory action of a polysulfated fraction from *Gracilaria cornea* in rats. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–18, 2015.

COURA, C. O. *et al.* Mechanisms involved in antinociception induced by a polysulfated fraction from seaweed *Gracilaria cornea* in the temporomandibular joint of rats. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 97, p. 76–84, 2017.

CUI, L. *et al.* Structural characterization and immunomodulatory activity of a heterogalactan from *Panax ginseng* flowers. **Food Research International**, [S. l.], v. 140, p. 109859, 2020. DOI: 10.1016/j.foodres.2020.109859.

CUNHA, L.; GRENHA, A. Sulfated seaweed polysaccharides as multifunctional materials in drug delivery applications. **Mar. Drugs**, v. 14, 2016. DOI: 10.3390/md14030042.

DE SOUSA, A. P. A. *et al.* *In vivo* growth-inhibition of Sarcoma 180 tumor by alginates from brown seaweed *Sargassum vulgare*. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 69, n. 1, p. 7–13, 2007. DOI: 10.1016/j.carbpol.2006.08.018.

DODGSON, K. S., & PRICE, R. G. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. **The Biochemical Journal**, v84, p. 106–110, 1962. <https://doi.org/10.1042/bj0840106>.

DONG, S. *et al.* Emerging role of natural products in cancer immunotherapy. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, 2022. DOI: 10.1016/j.apsb.2021.08.020.

EGGINTON, S.; BIROT, O. Angiogenesis: Growth points. **Microcirculation**, [S. l.], v. 21, n. 4, p. 276–277, 2014. DOI: 10.1111/micc.12131.

ENGSTRÖM, A. *et al.* Conditioned media from macrophages of M1, but not M2 phenotype, inhibit the proliferation of the colon cancer cell lines HT-29 and CACO-2. **International Journal of Oncology**, [S. l.], v. 44, n. 2, p. 385–392, 2014. DOI: 10.3892/ijo.2013.2203.

FALCONE, I. *et al.* Tumor microenvironment: Implications in melanoma resistance to targeted therapy and immunotherapy. **Cancers**, 2020. DOI: 10.3390/cancers12102870.

FAN, Y. *et al.* Partial characterization and anti-tumor activity of an acidic polysaccharide from *Gracilaria lemaneiformis*. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 88, n. 4, p. 1313–1318, 2012. DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.02.014.

FARIAS, W. R. L. *et al.* Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans. Isolation of a unique sulfated galactan from the red algae *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans from invertebrates. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 275, n. 38, p. 29299–29307, 2000. DOI: 10.1074/jbc.M002422200.

FEDOROV, S. N. *et al.* Anticancer and cancer preventive properties of marine polysaccharides: Some results and prospects. **Mar. Drugs**, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 11, p. 4876–4901, 2013. DOI: 10.3390/md11124876.

FENG, Y. *et al.* Structural characteristics and immunomodulatory effects of sulfated polysaccharides derived from marine algae. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [S. l.], v. 63, n. 24, p. 7180–7196, 2023. DOI: 10.1080/10408398.2022.2043823.

FIorentino, S. *et al.* Evaluation of the anti-tumoural and immune modulatory activity of natural products by flow cytometry. **Clinical Flow Cytometry - Emerging Applications**, M.Sc. Ingrid Schmid (Ed.), ISBN: 978- 953-51-0575-6, InTech, 2012.

FOLKMAN, J. Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. **N. Engl. J. Med.**, [S. l.], v. 285(21), p. 1182–1186, 1971. DOI: 10.1056/NEJM197111182852108.

FRANCO, P. I. R. *et al.* Tumor microenvironment components: Allies of cancer progression. **Pathology Research and Practice**, [S. l.], v. 216, n. 1, 2020. DOI: 10.1016/j.prp.2019.152729.

GAJEWSKI, T. F.; SCHREIBER, H.; FU, Y. X. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. **Nature immunology**, [S. l.], v. 14, n. 10, p. 1014, 2013. DOI: 10.1038/NI.2703.

- GOWDA, S. *et al.* Markers of renal function tests. **North American journal of medical sciences**, [*S. l.*], v. 2, n. 4, p. 170–173, 2010.
- GREEN, L. C. *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126(1), p. 131–138, 1982. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(82\)90118-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(82)90118-X).
- GUPTA, P. K.; RAJAN, M. G. R.; KULKARNI, S. Activation of murine macrophages by G1-4A, a polysaccharide from *Tinospora cordifolia*, in TLR4/MyD88 dependent manner. **International Immunopharmacology**, [*S. l.*], v. 50, n. March, p. 168–177, 2017. DOI: 10.1016/j.intimp.2017.06.025.
- GURPILHARES, D. B. *et al.* “Algae’s sulfated polysaccharides modifications: Potential use of microbial enzymes”. **Process Biochemistry**, 2015. DOI: 10.1016/j.procbio.2016.04.020.
- HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, American Association for Cancer Research, v. 12(1), p. 31-46, 2022. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, [*S. l.*], v. 100, p. 57–70, 2000. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, [*S. l.*], v. 144, p. 646–674, 2011. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- HENTATI, F. *et al.* Bioactive polysaccharides from seaweeds. **Molecules**, [*S. l.*], v. 25, n. 14, p. 1–29, 2020. DOI: 10.3390/molecules25143152.
- IGNARRO, L. J. *et al.* Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate: Comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [*S. l.*], v. 90, n. 17, p. 8103–8107, 1993. DOI: 10.1073/PNAS.90.17.8103.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2023: incidência do Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: **INCA**, 2022.
- JIAO, G. *et al.* Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. **Mar Drugs**, [*S. l.*], v. 9, n. 2, p. 196–233, 2011. DOI: 10.3390/md9020196.
- JIMENEZ, P. C.; WILKE, D. V; COSTA-LOTUFO, L. V.. Marine drugs for cancer: surfacing biotechnological innovations from the oceans. **Clinics**, [*S. l.*], v. 73, p. 1–7, 2018. DOI: 10.6061/clinics/2018/e482s.
- JINUSHI, M.; KOMOHARA, Y. Tumor-associated macrophages as an emerging target against tumors: Creating a new path from bench to bedside. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1855, n. 2, p. 123–130, 2015.
- KANG, Ji *et al.* Insights into the structure-bioactivity relationships of marine sulfated polysaccharides: A review. **Food Hydrocolloids**, [*S. l.*], v. 123, p. 107049, 2022. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2021.107049.

- KASHFI, K.; KANNIKAL, Jasmine; NATH, Niharika. Macrophage reprogramming and cancer therapeutics: Role of inos-derived NO. **Cells**, v. 10, n. 11, 2021. DOI: 10.3390/cells10113194.
- KHAROUF, N. *et al.* Tumor Microenvironment as a Therapeutic Target in Melanoma Treatment. **Cancers**, v. 15, n. 12, 2023.
- KHOTIMCHENKO, M. *et al.* Antitumor potential of carrageenans from marine red algae. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 246, p. 116568, 2020. DOI: 10.1016/j.carbpol.2020.116568.
- KIM, J.; BAE, J. S. Tumor-associated macrophages and neutrophils in tumor microenvironment. **Mediators of Inflammation**, [S. l.], v. 2016, p. 1–11, 2016. DOI: 10.1155/2016/6058147.
- KLAUNIG, J. E. Carcinogenesis. In: POPE, C. N. *et al.* (org). An Introduction to Interdisciplinary Toxicology: From Molecules to Man. Amsterdã: **Academic Press**, cap. 8, p. 97–110, 2020.
- KLOAREG, B.; QUATRANO, R. S. Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. **Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.**, v. 26, p. 259–315, 1988.
- KLOC, M. **Macrophages: Orgin, functions and biointervention.** [S. l.], 2017. E-book. 376 p. DOI 10.1007/978-3-319-54090-0.
- KNUTSEN, S. H. *et al.* A Modified System of Nomenclature for Red Algal Galactans. **Botanica Marina**, v. 37, n. 2, p. 163–170, 1994.
- KOVACEVIC, Z. *et al.* Regulation and control of nitric oxide (NO) in macrophages: Protecting the “professional killer cell” from its own cytotoxic arsenal via MRP1 and GSTP1. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1871, p. 995-999, 2017. DOI: 10.1016/j.bbagen.2017.02.021.
- KOWAL, J.; KORNETE, M.; JOYCE, J. A. Re-education of macrophages as a therapeutic strategy in cancer. **Immunotherapy**, v. 11, n. 8, p. 677–689, 2019.
- LASCOMBES, C. *et al.* Starch-carrageenan interactions in aqueous media: Role of each polysaccharide chemical and macromolecular characteristics. **Food Hydrocolloids**, [S. l.], v. 66, p. 176–189, 2017. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2016.11.025. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.11.025>. Acesso em: 29 fev. 2024.
- LEE, J. S. *et al.* Mechanism of macrophage activation induced by polysaccharide from *Cordyceps militaris* culture broth. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 120, p. 29–37, 2015. DOI: 10.1016/j.carbpol.2014.11.059. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.11.059>.
- LEE, W. K.; HO, C. Ling. Ecological and evolutionary diversification of sulphated polysaccharides in diverse photosynthetic lineages: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 277, 2022. DOI: 10.1016/j.carbpol.2021.118764.

- LEHNHARDT PIRES, C. *et al.* Evaluation of macroalgae sulfated polysaccharides on the *Leishmania (L.) amazonensis* promastigote. **Marine Drugs**, v. 11, n. 3, p. 934–943, mar. 2013.
- LEONARDI, G.C. *et al.* Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review). **Int J Oncol**, Atenas, v. 52, n. 4, p. 1071-1080, Fev. 2018. DOI 10.3892/ijo.2018.4287. Disponível em: <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4287>. Acesso em: 03 mar. 2024.
- LEWIS, S. M.; WILLIAMS, A.; EISENBARTH, S. C. Structure and Function of the Immune System in Vertebrates. **Science Immunology**, [S. l.], v. 6085, p. 1–55, 2019. DOI: 10.1007/978-1-59259-825-0_1.
- LI, Y. *et al.* Natural Polysaccharides and Their Derivates: A Promising Natural Adjuvant for Tumor Immunotherapy. **Frontiers in Pharmacology**, [S. l.], v. 12, n. April, 2021. DOI: 10.3389/fphar.2021.621813.
- LINS, K. O. A. L. *et al.* Antitumor properties of a sulfated polysaccharide from the red seaweed *Champia feldmannii* (Diaz-Pifferer). **Journal of Applied Toxicology**, [S. l.], v. 29, n. 1, p. 20–26, 2009. DOI: 10.1002/jat.1374. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18651721>.
- MANTOVANI, A. *et al.* Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. **Nature Reviews Clinical Oncology**, [S. l.], v. 14, n. 7, p. 399–416, 2017. DOI: 10.1038/nrclinonc.2016.217. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Federica_Marchesi2/publication/312662297_Tumour-associated_macrophages_as_treatment_targets_in_oncology/links/58d6e05ea6fdcc1bae9083e5/Tumour-associated-macrophages-as-treatment-targets-in-oncology.pdf.
- MANTOVANI, A.; VECCHI, A.; ALLAVENA, P. Pharmacological modulation of monocytes and macrophages. **Current Opinion in Pharmacology**, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 38–44, 2014. DOI: 10.1016/j.coph.2014.07.004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2014.07.004>.
- MANTRI, V. A.; KAVALE, M. G.; KAZI, M. A. Seaweed biodiversity of India: Reviewing current knowledge to identify gaps, challenges, and opportunities. **Diversity**, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 12, n. 1, 2020. DOI: 10.3390/d12010013. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1424-2818/12/1/13/htm>. Acesso em: 14 fev. 2024.
- MARINHO-SORIANO, E. Historical context of commercial exploitation of seaweeds in Brazil. **Journal of Applied Phycology**, [S. l.], v. 29, n. 2, p. 665–671, 2017. DOI: 10.1007/s10811-016-0866-8.
- MARTINEZ, F. O. *et al.* Macrophage activation and polarization. **Front. Biosci.**, v.13, p. 453–461, 2008.
- MCGILL, M. R. The past and present of serum aminotransferases and the future of liver injury biomarkers. **EXCLI journal**, [S. l.], v. 15, p. 817–828, 2016. DOI: 10.17179/excli2016-800. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28337112><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5318690>.

MELO, M. R. S. *et al.* Isolation and characterization of soluble sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria cornea*. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 49, n. 4, p. 491–498, 2002. DOI: 10.1016/S0144-8617(02)00006-1. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861702000061>.

MENG, L. Z. *et al.* Activation of mouse macrophages and dendritic cells induced by polysaccharides from a novel *Cordyceps sinensis* fungus UM01. **Journal of Functional Foods**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 242–253, 2014. DOI: 10.1016/j.jff.2014.04.029. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2014.04.029>.

MILLS, C. D. *et al.* M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 12, p. 6166–6173, 2000.

MONTEIRO, V. S. *et al.* Involvement of the GABAergic system in the anxiolytic effect of sulfated polysaccharides from the red seaweed *Gracilaria cornea*. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 3, p. 1997–2004, 2016.

MORÁN-SANTIBAÑEZ, K. *et al.* Synergistic effects of sulfated polysaccharides from Mexican seaweeds against measles virus. **BioMed Research International**, v. 2016, 2016.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Reviews Immunology**, [S. l.], v. 10, n. 6, p. 460, 2010. DOI: 10.1038/nri2788. Disponível em: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nri2788>.

MOURÃO, Paulo. Perspective on the Use of Sulfated Polysaccharides from Marine Organisms as a Source of New Antithrombotic Drugs. **Marine Drugs**, [S. l.], v. 13, n. 5, p. 2770–2784, 2015. DOI: 10.3390/md13052770. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1660-3397/13/5/2770/>.

MURAD, H. *et al.* Algal sulfated carrageenan inhibits proliferation of MDA-MB-231 cells via apoptosis regulatory genes. **Molecular Medicine Reports**, [S. l.], v. 11, n. 3, p. 2153–2158, 2015. DOI: 10.3892/mmr.2014.2915.

MURANO, E. *et al.* Investigation of the carrageenans extracted from *Solieria filiformis* and *Agardhiellia subulata* from Mar Piccolo, Taranto. **Marine Chemistry**, v. 58, n. 3–4, p. 319–325, 1997.

MUTHUKUMAR, J.; CHIDAMBARAM, R.; SUKUMARAN, S. Sulfated polysaccharides and its commercial applications in food industries—A review. **Journal of Food Science and Technology**, [S. l.], v. 58, n. 7, p. 2453–2466, 2021. DOI: 10.1007/s13197-020-04837-0. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04837-0>.

NGAMBENJAWONG, C.; GUSTAFSON, H. H.; PUN, S. H. Progress in tumor-associated macrophage (TAM)-targeted therapeutics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2017. DOI: 10.1016/j.addr.2017.04.010.

- NIU, Q. *et al.* Two different fucosylated chondroitin sulfates: Structural elucidation, stimulating hematopoiesis and immune-enhancing effects. **Carbohydrate polymers** [*S. l.*], v. 230, 2019. DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.115698. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115698>. Acesso em: 4 mar. 2024.
- NOY, R; POLLARD, J. W. Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy. **Immunity**, v. 41, p. 49-61, 2014. DOI: 10.1016/j.immuni.2014.06.010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.010>.
- NUNES, C. *et al.* Salt pan brine water as a sustainable source of sulphated polysaccharides with immunostimulatory activity. [*S. l.*], v. 133, p. 235-242, 2019. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.04.021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.021>. Acesso em: 13 fev. 2024.
- O'NEILL, C. H.; SCOGGINS, C. R. Melanoma. **Journal of Surgical Oncology**, [*S. l.*], v. 120, n. 5, p. 873–881, 2019. DOI: 10.1002/jso.25604. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/jso.25604>.
- ONUCHIC, A. C.; CHAMMAS, R. Câncer e o microambiente tumoral. **Revista de Medicina**, [*S. l.*], v. 89, n. 1, p. 21-31, 2010. DOI: 10.11606/issn.1679-9836.v89i1p21-31. Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/revistadc/article/view/46269>. Acesso em: 3 mar. 2024.
- PAINTER, T. J. Algal Polysaccharides. [*S. l.*]: **ACADEMIC PRESS, INC.**, 1983. DOI: 10.1016/b978-0-12-065602-8.50009-1.
- PERCIVAL, E. The polysaccharides of green, red and brown seaweeds: Their basic structure, biosynthesis and function. **British Phycological Journal**, [*S. l.*], v. 14, n. 2, p. 103–117, 1979. DOI: 10.1080/00071617900650121.
- 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**, [*S. l.*], v. 340, n. 12, p. 2015–2023, 2005. DOI: 10.1016/j.carres.2005.05.018.
- PIENIAZEK, M.; MATKOWSKI, R.; DONIZY, P. Macrophages in skin melanoma-the key element in melanomagenesis. **Oncology letters**, [*S. l.*], v. 15, n. 4, p. 5399–5404, 2018. DOI: 10.3892/ol.2018.8021. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29552183>.
- PITCOVSKI, J.; SHAHAR, E.; AIZENSHTAIN, E.; GORODETSKY, R. Melanoma antigens and related immunological markers. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, Elsevier Ireland Ltd, , 2017. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2017.05.001.
- PORTA, C. *et al.* Molecular and epigenetic basis of macrophage polarized activation. **Seminars in Immunology**, [*S. l.*], v. 27, n. 4, p. 237–248, 2015. DOI: 10.1016/j.smim.2015.10.003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smim.2015.10.003>.
- QUAIL, D. F.; JOYCE, J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. **Nature medicine**, [*S. l.*], v. 19, n. 11, p. 1423–1437, 2013. DOI:

10.1038/nm.3394. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3954707/pdf/nihms558590.pdf>.

REN, Y. *et al.* Structural characterization and macrophage immunomodulatory activity of a polysaccharide isolated from *Gracilaria lemaneiformis*. **Journal of Functional Foods**, [S. l.], v. 33, p. 286–296, 2017. DOI: 10.1016/j.jff.2017.03.062. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2017.03.062>.

REY-GIRAUD, F., HAFNER, M., & RIES, C. H. *In vitro* generation of monocyte-derived macrophages under serum-free conditions improves their tumor promoting functions. **PLoS ONE**, v. 7(8), 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042656>

ROBLEDO, D.; FREILE-PELEGRÍN, Y. Prospects for the cultivation of economically important carrageenophytes in Southeast Mexico. **Journal of Applied Phycology**, [S. l.], v. 23, n. 3, p. 415–419, 2011. DOI: 10.1007/s10811-010-9585-8.

ROCK, K. L.; REITS E., NEEFJES J. Present yourself! By mhc class i and mhc class ii molecules. **Physiology & behavior**, [S. l.], v. 176, n. 12, p. 139–148, 2016. DOI: 10.1016/j.it.2016.08.010.Present.

RODRIGUES, J. A. G. *et al.* Extraction and anticoagulant activity of sulfated polysaccharides from the red marine alga *Halymenia pseudofloresia*. **Revista Ciencia Agronomica**, [S. l.], v. 40, n. 2, p. 224–231, 2009.

SÁNCHEZ, R. A. R. *et al.* Complex sulfated galactans from hot water extracts of red seaweed *Asparagopsis taxiformis* comprise carrageenan and agaran structures. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 322, p. 121314, 2023. DOI: 10.1016/j.carbpol.2023.121314.

SANJAI, C. *et al.* A comprehensive review on anticancer evaluation techniques. **Bioorganic Chemistry**, [S. l.], v. 142, p. 106973, 2024. DOI: 10.1016/J.BIOORG.2023.106973.

SANTHOSH, S. *et al.* Evolution of targeted therapies in cancer: opportunities and challenges in the clinic. **Future Oncology**, [S. l.], v. 11, n. 2, p. 279–293, 2015. DOI: 10.2217/fon.14.198. Disponível em: <http://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/fon.14.198?src=reccsys%5Cnhttp://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/fon.14.198>.

SAWA-WEJKSZA, K.; KANDEFER-SZERSZEŃ, M.. Tumor-associated macrophages as target for antitumor therapy. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, [S. l.], p. 1–15, 2017. DOI: 10.1007/s00005-017-0480-8.

SHAPIRO, H. M. Flow cytometric estimation of DNA and RNA content in intact cells stained with hoechst 33342 and pyronin Y. **Cytometry**, [S. l.], v. 2, n. 3, p. 143–150, 1981. DOI: 10.1002/CYTO.990020302.

SINGH, Y. *et al.* Targeting tumor associated macrophages (TAMs) via nanocarriers. **Journal of Controlled Release**, v. 254, p. 92–106, 2017. DOI: 10.1016/j.jconrel.2017.03.395.

SKEHAN, P. *et al.* New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, [S. l.], v. 82, n. 13, p. 1107–1112, 1990. DOI: 10.1093/jnci/82.13.1107. Disponível em: <https://academic.oup.com/jnci/article-lookup/doi/10.1093/jnci/82.13.1107>.

SOUSA, W. M. *et al.* Sulfated polysaccharide fraction from marine algae *Solieria filiformis*: Structural characterization, gastroprotective and antioxidant effects. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 152, p. 140–148, 2016. DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.06.111. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.06.111>.

SOUZA, R. B. *et al.* Neuroprotective effects of sulphated agarans from marine alga *Gracilaria cornea* in rat 6-hydroxydopamine parkinson's disease model: behavioural, neurochemical and transcriptional alterations. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, [S. l.], v. 120, n. 2, p. 159–170, 2017. DOI: 10.1111/bcpt.12669.

SOUZA, R. B. *et al.* *In vitro* activities of kappa-carrageenan isolated from red marine alga *Hypnea musciformis*: Antimicrobial, anticancer and neuroprotective potential. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 112, p. 1248–1256, 2018. DOI: 10.1016/J.IJBIOMAC.2018.02.029.

SUNG, H.; *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, 2021. DOI: 10.3322/caac.21660.

TABARSA, M. *et al.* The activation of NF- κ B and MAPKs signaling pathways of RAW264.7 murine macrophages and natural killer cells by fucoidan from *Nizamuddiniana zanardinii*. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 148, p. 56–67, 2020. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.01.125. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.125>.

TAKEDA, K. *et al.* Anti-tumor activity of fucoidan is mediated by nitric oxide released from macrophages. **International Journal of Oncology**, [S. l.], v. 40, n. 1, p. 251–260, 2012. DOI: 10.3892/ijo.2011.1168.

TELES, F. B. Efeito antiproliferativo in vitro de macrófagos murinos (raw264.7) ativados por polissacarídeos sulfatados obtidos das algas marinhas vermelhas *Gracilaria cornea* j. Agardh e *Solieria filiformis* (kützing) p.w. Gabrielson.. Dissertação (Mestrado) – Bioquímica. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017. Disponível em: <http://repositorio.ufc.br/handle/riufc/29494>.

USOV, A. I. Polysaccharides of the red algae. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, 1. ed. [S.l.], v. 65, p. 115-217, 2011. DOI: 10.1016/B978-0-12-385520-6.00004-2. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-385520-6.00004-2>.

VÁRADI, L. *et al.* Evaluation of novel Griess-reagent candidates for nitrite sensing in aqueous media identified via molecular fingerprint searching. **RSC Advances**, [S. l.], v. 9, n. 7, p. 3994–4000, 2019. DOI: 10.1039/c8ra07656a.

VÉLIZ, K.; CHANDÍA, N.; RIVADENEIRA, M.; THIEL, M.. Seasonal variation of carrageenans from *Chondracanthus chamissoi* with a review of variation in the

carrageenan contents produced by Gigartinales. **Journal of Applied Phycology**, [S. l.], v. 29, n. 6, p. 3139–3150, 2017. DOI: 10.1007/s10811-017-1203-6.

WILKE, D. V. *et al.* Anticancer Potential of Compounds from the Brazilian Blue Amazon. **Planta Medica**, [S. l.], v. 87, n. 1–2, p. 49–70, 2021. DOI: 10.1055/a-1257-8402.

XIAO, R.; GRINSTAFF, M. W. Chemical synthesis of polysaccharides and polysaccharide mimetics. **Progress in Polymer Science**, [S. l.], v. 74, p. 78–116, 2017. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2017.07.009.

XIAO, Y.; YU, D. Tumor microenvironment as a therapeutic target in cancer. **Pharmacology and Therapeutics**, [S. l.], v. 221, 2021. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2020.107753.

XUE, Q. *et al.* Regulation of iNOS on immune cells and its role in diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 19, n. 12, 2018. DOI: 10.3390/ijms19123805.

YANG, L.; ZHANG, Y. Tumor-associated macrophages: from basic research to clinical application. **Journal of Hematology & Oncology**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 58, 2017. DOI: 10.1186/s13045-017-0430-2.

YANG, Y. *et al.* Structural characterization and effect on leukopenia of fucoidan from *Durvillaea antarctica*. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 256, p. 117529, 2021. DOI: 10.1016/j.carbpol.2020.117529.

YUNNA, C. *et al.* Macrophage M1/M2 polarization. **European Journal of Pharmacology**, v. 877, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173090>.

ZAITSEVA, O. O. Seaweed sulfated polysaccharides and their medicinal properties. **Algal Research**, [S. l.], v. 68, p. 102885, 2022. DOI: 10.1016/j.algal.2022.102885.

ZHANG, Y.; ZHANG, Z. The history and advances in cancer immunotherapy: understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications. **Cellular and Molecular Immunology**, [S. l.], v. 17, n. 8, p. 807–821, 2020. DOI: 10.1038/s41423-020-0488-6.

ZHU, L. *et al.* Cellular metabolism and macrophage functional polarization. **International Reviews of Immunology**, [S. l.], v. 34, n. 1, p. 82–100, 2015. DOI: 10.3109/08830185.2014.969421.