



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

FELIPE BARROS TELES

**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.**

FORTALEZA
2017

FELIPE BARROS TELES

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 de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, da
Universidade Federal do Ceará, como requisito
parcial para obtenção do Título de Mestre em
Bioquímica.

Orientador: Profa. Dra. Norma Maria Barros
Benevides

Coorientador: Prof. Dr. Diego Veras Wilke

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

T272e Teles, Felipe Barros.

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* (Kützinger) P.W. Gabrielson / Felipe Barros Teles. – 2017.
72 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2017.

Orientação: Profa. Dra. Norma Maria Barros Benevides.

Coorientação: Prof. Dr. Diego Veras Wilke.

1. *Gracilaria cornea*. 2. *Gracilaria birdiae*. 3. *Solieria filiformis*. 4. Microambiente tumoral.
5. Macrófagos antitumorais. I. Título.

CDD 572

FELIPE BARROS TELES

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 de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-graduação em
Bioquímica, da Universidade Federal
do Ceará, como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em
Bioquímica.

Orientador: Prof. Dra. Norma Maria
Barros Benevides

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dra. Norma Maria Barros Benevides (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará

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

Prof^º Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior
Universidade Federal do Ceará

Prof^ª Dra. Natássia Albuquerque Ribeiro
Faculdade Nordeste – DeVry Fanor

À minha tia Eugênia, exemplo de
resiliência.

À minha avó Judite (*In memoriam*).

“Se queres ser universal, começa por pintar a tua aldeia.” (Liev Tolstoi)

“(…) realizamos assim o universal pelo regional.” (Antônio Martins Filho)

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Norma Maria Barros Benevides por toda generosidade, paciência e respeito ao longo dos últimos seis anos de convivência. Eternamente grato!

Ao professor Dr. Diego Wilke por toda a colaboração ao longo do desenvolvimento deste trabalho e pela orientação científica que, sem dúvidas, tornou-me um aluno mais maduro, rigoroso e independente.

Aos professores Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior, Dra. Natássia Albuquerque Ribeiro, Dr. Danilo Damasceno Rocha e Dr. André Luiz dos Reis Barbosa por gentilmente aceitarem compor minha banca de mestrado.

À minha ex-aluna de iniciação científica Helaynne Gomes do Nascimento e aos colegas e ex-colegas do Laboratório de Carboidratos e Lectinas de Algas (CarboLec) Andressa Alexandre de Oliveira, Annyta Fernandes Frota, Edna Maria Cordeiro, George Meredith Cunha de Castro, Luzia Gabrielle Zeferino, Pedro Nonato da Silva Júnior, Ramon Mota de Sousa, Raquel Caminha Dantas, Renato Martins Andrade, Ticiane de Brito Lima, Renata Line da Conceição Rivanor, Ticiane Monteiro Abreu, Valdécio Silvano Monteiro, Vitória Virgínia Magalhães Soares pelas contribuições em alguma etapa da realização deste trabalho e pelos incontáveis momentos de alegria vividos ao longo do mestrado.

Aos colegas e ex-colegas do Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia Marinha (LaBBMar), especialmente, Katharine Gurgel Dias Florêncio, Erlânia Alves de Siqueira, Kayanny Queiroz Ferreira, Thaís Lima de Brito e os alunos de iniciação científica Larissa Santana Belizário Duarte, Clara Norões Nogueira, Danilo Maciel Araújo, Felipe Rhaynan da Silva Andrade pela intensa e agradável convivência nos últimos semestres.

À Adelânia Roque Marinho Guedes e à Camila Roque Marinho Guedes pelo otimismo e espírito solidário, duas características que lhes são inerentes.

Ao médico veterinário Wesley Lyeverton Correa Ribeiro pelos ensinamentos sobre bioterismo e bioética.

Ao Carlos Roberto Koscky Paier, Giovanna Riello Barbosa e à Deiziane Viana da Silva Costa pelo auxílio com metodologias completamente novas para mim.

Aos renomados pesquisadores, servidores técnico-administrativos e

funcionários terceirizados que fazem do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da UFC um centro de excelência em pesquisa no qual tive o privilégio de desenvolver meus experimentos.

À minha tia Eugênia pela preocupação constante com minha saúde e bem-estar e por todos os sacrifícios realizados no passado e, principalmente, no presente.

À minha mãe por todo amor e carinho.

À minha irmã e sobrinhos que, mesmo distantes, torcem pelo meu sucesso.

À minha noiva Alexia Assef pelo amor, companheirismo dentro e fora do laboratório, apoio material e imaterial e, sobretudo, por aceitar conviver com todas as minhas idiossincrasias.

À Andrea Brígido por me acolher em seu lar diversas vezes durante o mestrado.

Aos amigos Francisco Dalton Barreto de Oliveira e José Roberto da Silva Nascimento pelos momentos de alegria e dor compartilhados nos últimos anos.

Aos amigos Antônio Alves Willame da Silva e Antônio Silva Neto pelas noites etílicas e boêmias que ajudaram a esquecer dos problemas da vida.

Aos professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, sempre tão dedicados ao ensino e à pesquisa científica.

Finalmente, agradeço aos meus ídolos cientistas, cujas biografias me encantaram desde cedo e influenciaram a minha escolha pelo árduo, porém, gratificante caminho da ciência. Ainda hoje sinto o imenso prazer em contemplar a beleza do desconhecido.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Este trabalho foi realizado com apoio das seguintes instituições:

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ (UFC) - Laboratório de Carboidratos e Lectinas de algas (CarboLec), coordenado pela prof^a Dra. Norma Maria Barros Benevides e Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia Marinha (LaBBMar), coordenado pelo prof. Dr. Diego Veras Wilke.

CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO (CNPq), por meio da concessão da bolsa de mestrado.

CORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO PESSOAL E DE ENSINO SUPERIOR (CAPES), por meio da concessão de auxílio financeiro para a realização do presente trabalho.

RESUMO

As algas marinhas são fontes de compostos com diversas atividades biológicas já descritas na literatura. Entre esses compostos, destacam-se os Polissacarídeos Sulfatados (PS). Estudos com as algas marinhas vermelhas *Gracilaria cornea*, *Gracilaria birdiae* e *Solieria filiformis* demonstraram que seus PS apresentam atividades: antinociceptiva, antiinflamatória, antioxidante, antiviral, entre outras. Entretanto, não existem estudos investigando o potencial dos PS dessas algas em estimular células do sistema imune para promover inibição de crescimento tumoral *in vitro*. Embora o câncer seja caracterizado pela proliferação descontrolada de células transformadas, os tumores malignos são formados por um sistema complexo de diferentes células (tumorais e não tumorais) que interagem entre si formando um microambiente tumoral (MAT), o qual favorece o crescimento e desenvolvimento das células malignas. Dentre as células não-tumorais presentes no MAT, destacam-se os macrófagos. Os macrófagos associados ao tumor (TAMs) possuem alta plasticidade fenotípica podendo exibir um perfil antitumoral (semelhantes a M1) ou pró-tumoral (semelhantes a M2). A ativação de TAMs para fenótipos semelhantes a M1 é uma estratégia que visa auxiliar no tratamento de tumores malignos. Nesse contexto os PS de algas podem atuar como modificadores da resposta biológica potencializando a resposta imune contra células tumorais. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito estimulante dos PS de *G. cornea* (Gco-SP), *G. birdiae* (Gbi- SP) e *S. filiformis* (Sfi-SP) sobre uma linhagem de macrófagos murinos (RAW264.7), através do ensaio de Griess, e investigar o potencial antiproliferativo *in vitro* dos sobrenadantes de RAW264.7 estimulados com esses PS contra uma linhagem de melanoma metastático murino (B16-F10) por meio do ensaio do SRB. Com exceção de Gbi-SP, todas as amostras foram capazes de ativar RAW264.7, o que foi evidenciado pelo aumento da produção de nitrito (NO^-), e os sobrenadantes desses macrófagos ativados foram capazes de inibir a proliferação de B16-F10. Além disso, foi detectado nos sobrenadantes de RAW264.7 um aumento, em relação ao controle negativo, de $\text{TNF-}\alpha$, uma citocina pró-inflamatória associada a fenótipos antitumorais de macrófagos. A análise do efeito antiproliferativo por citometria de fluxo revelou uma diminuição da contagem de B16-F10, bem como uma redução do percentual dessas células na fase G2/M do ciclo celular, em relação ao controle negativo. Foram verificadas também alterações na morfologia (elevação das populações de células com tamanho reduzido e com granulosidade aumentada) de B16-F10 sem, no entanto, haver comprometimento da integridade da membrana plasmática. Dessa forma, concluímos que os PS das algas vermelhas *G. cornea* e *S. filiformis* apresentam efeito estimulante de macrófagos *in vitro* apresentando potencial para atuar sobre os TAMs no MAT ativando-os para fenótipos antitumorais. Mais estudos são necessários para compreender os mecanismos de ação envolvidos na ativação de macrófagos por PS e no efeito antiproliferativo destes contra células B16-F10.

Palavras-chave: *Gracilaria cornea*. *Gracilaria birdiae*. *Solieria filiformis*. Microambiente tumoral. Macrófagos antitumorais

ABSTRACT

Marine seaweeds are sources of compounds with several biological activities described in the literature. Among these compounds, the most prominent are Sulfated Polysaccharides (SP). Studies with SP from red seaweeds *Gracilaria cornea*, *Gracilaria birdiae* and *Solieria filiformis* have demonstrated antinociceptive, anti-inflammatory, antioxidant, antiviral and other activities. However, there are no studies investigating the stimulating potential of these SP in cells of the immune system to promote inhibition of tumor growth *in vitro*. Although cancer is characterized by the uncontrolled proliferation of transformed cells, malignant tumors are formed by a complex system of different cells (tumor and non-tumoral) that interact with each other to form a tumor microenvironment (MAT), which allows the growth and development of malignant cells. Among the non-tumor cells present in the MAT, the macrophages are highlighted. Tumor-associated macrophages (TAMs) have high phenotypic plasticity and may exhibit an antitumor (M1-like) or pro-tumor (M2-like) profile. The activation of TAMs for M1-like phenotypes is a strategy that aims to assist in the treatment of malignant tumors. In this context, the SP of seaweeds can act as modifiers of the biological response potentiating the immune response against tumor cells. The aims of this work was to evaluate the stimulating effect of SP from *G. cornea* (Gco-SP), *G. birdiae* (Gbi-SP) and *S. filiformis* (Sfi-SP) on a murine macrophages strain RAW264.7, through the Griess assay, and investigate the *in vitro* antiproliferative potential of SP-stimulated macrophages supernatants against a murine metastatic melanoma (B16-F10) line by the SRB assay. Except for Gbi-SP, all samples were able to activate RAW264.7 (evidenced by increased nitrite production), and the SP-stimulated macrophages supernatants were able to inhibit the proliferation of B16-F10. In addition, an increase of TNF- α , a proinflammatory cytokine associated with antitumor macrophage phenotypes, was detected in RAW264.7 supernatants when compared with negative control. Analysis of the antiproliferative effect by flow cytometry showed a decrease in the B16-F10 count, as well as a reduction of the percentage of these cells in the G2/M of the cell cycle phase, when compared with negative control. Changes in morphology (elevation of the cell populations with reduced size and with increased granularity) of B16-F10 were also observed, however, without compromising plasma membrane integrity. In this way, we conclude that the SP from red seaweeds *G. cornea* and *S. filiformis* showed macrophages stimulating effect *in vitro* presenting potential to act on TAMs activating them for antitumor phenotypes. Further studies are needed to understand the mechanisms of action involved in the activation of macrophages by SP and in the antiproliferative effect of SP-stimulated macrophages supernatants against B16-F10 cells.

Keywords: *Gracilaria cornea* *Gracilaria birdiae*. *Solieria filiformis*. Tumor microenvironment. Antitumor Macrophages

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho esquemático da estrutura linear das galactanas sulfatadas.....	20
Figura 2 - Diversidade estrutural das galactanas sulfatadas do grupo ágar	22
Figura 3 - Diversidade estrutural das galactanas sulfatadas do grupo carragenana	24
Figura 4 - Localização geográfica da praia de Flecheiras situada município de Trairi, Ceará.....	25
Figura 5 - Classificação taxonômica da alga <i>Solieria filiformis</i>	26
Figura 6 – Classificação taxonômica da alga <i>Gracilaria birdiae</i>	27
Figura 7 - Classificação taxonômica da alga <i>Solieria filiformis</i>	29
Figura 8 - Quantidade de artigos dedicados às atividades biológicas das galactanas sulfatadas de <i>Gracilaria cornea</i> expressa em porcentagem.....	30
Figura 9 - Distribuição das atividades biológicas das galactanas sulfatadas de <i>Gracilaria cornea</i> por áreas do conhecimento expressa em porcentagem	31
Figura 10 - Quantidade de artigos dedicados às atividades biológicas das galactanas sulfatadas de <i>Gracilaria cornea</i> expressa em porcentagem.....	31
Figura 11 - Distribuição das atividades biológicas das galactanas sulfatadas de <i>Gracilaria birdiae</i> por áreas do conhecimento expressa em porcentagem	32
Figura 12 - Percentual de artigos da literatura dedicados às atividades biológicas dos galactanas sulfatadas de <i>Solieria filiformis</i>	33
Figura 13 - Distribuição das atividades biológicas das galactanas sulfatadas de <i>Solieria filiformis</i> por áreas de conhecimento expressa em porcentagem	33
Figura 14 – Os dez tipos de câncer (exceto pele não melanoma) mais incidentes no Brasil para o biênio 2016-2017 divididos por gênero	35
Figura 15 - Comparação entre a incidência de melanoma e demais tipos de câncer no Brasil para o biênio 2016-2017 expressa em porcentagem	36
Figura 16 - Capacidades funcionais adquiridas por células tumorais que permitem a sobrevivência, proliferação e disseminação	37
Figura 17 – Heterogeneidade celular verificada no microambiente tumoral.....	38
Figura 18 - Desenho esquemático do paradigma de polarização de macrófagos em dois estados funcionais.....	40
Figura 19 – Analogia entre o amplo espectro dos fenótipos funcionais dos macrófagos e uma roda de cores	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição de polissacarídeos sulfatados nos três filos de macroalgas	19
Tabela 2 - Código desenvolvido para diferentes açúcares encontrados nas carragenanas	24
Tabela 3 - Resumo de dados da literatura para as galactanas sulfatadas de <i>Gracilaria cornea</i>	27
Tabela 4 - Resumo de dados da literatura para as galactanas sulfatadas de <i>Gracilaria birdiae</i>	28
Tabela 6 - Resumo de dados da literatura para as galactanas sulfatadas de <i>Solieria filiformis</i>	29

LISTA DE ABREVIATURAS

APAFG	Associação dos Produtores de Algas de Flecheiras e Guajiru
CSF	Fator Estimulador de Colônias Células
DSHEA	Lei de Saúde e Educação de Produtos Dietéticos
Gbi-SP	Polissacarídeos Sulfatados de <i>Gracilaria birdiae</i>
Gco-SP	Polissacarídeos Sulfatados de <i>Gracilaria cornea</i>
GM-CSF	Fator Estimulador de Crescimento de Granulócitos-Macrófagos
GS	Galactanas Sulfatadas
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
INCA	Instituto Nacional do Câncer
INF- α	Interferon Alfa
INF- γ	Interferon Gama
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível
LPS	Lipopolissacarídeo
M1	Macrófagos Classicamente Ativados
M2	Macrófagos Alternativamente Ativados
MAT	Microambiente Tumoral
M-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos
MMP	Metaloproteases de Matriz
MRB	Modificadores da Resposta Biológica
M Φ	Macrófagos
NK	Células Assassinas Naturais
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
PS	Polissacarídeos Sulfatados
PSK	Polissacarídeos Ligados à Proteína K
RAW264.7	Linhagem de Macrófagos Murinos
Sfi-SP	Polissacarídeos Sulfatados de <i>Solieria filiformis</i>
TAMs	Macrófagos Associados ao Tumor
TGF- β	Fator de Transformação do Crescimento Beta
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
2.1	Polissacarídeos Sulfatados de algas.....	18
2.1.1	<i>Galactanas sulfatadas do grupo ágar</i>	20
2.1.2	<i>Galactanas sulfatadas do grupo carragenana</i>	22
2.1.3	<i>Caracterização bioquímica e classificação das galactanas sulfatadas obtidas de algas cultivadas em litoral cearense</i>	25
2.2	Classificação taxonômica e informações gerais da alga <i>Gracilaria cornea</i>	26
2.3	Classificação taxonômica e informações gerais da alga <i>Gracilaria birdiae</i>	27
2.4	Classificação taxonômica e informações gerais da alga <i>Solieria filiformis</i>	28
2.5	Atividades biológicas das galactanas sulfatadas de <i>Gracilaria cornea</i> , <i>Gracilaria birdiae</i> e <i>Solieria filiformis</i>	29
2.5.1	<i>Resultados obtidos para a alga Gracilaria cornea</i>	30
2.5.2	<i>Resultados obtidos para a alga Gracilaria birdiae</i>	31
2.5.3	<i>Resultados obtidos para a alga Solieria filiformis</i>	32
2.6	O Câncer.....	34
2.6.1	<i>O microambiente tumoral e os macrófagos associados ao tumor</i>	37
2.6.2	<i>Estratégias antitumorais que utilizam os TAMs como alvo</i>	42
2.6.3	<i>Os polissacarídeos podem auxiliar o sistema imune a combater células tumorais</i>	43
3	OBJETIVOS	46
3.1.	Geral.....	46
3.2	Específicos.....	46
4	ARTIGO DA DISSERTAÇÃO	47
	REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

O termo “*algas*” não possui valor taxonômico, uma vez que se refere a organismos que formam um grupo polifilético, isto é, não descendem diretamente do mesmo ancestral, apresentando linhagens evolutivas múltiplas e independentes. Algumas características marcantes compartilhadas pelas algas incluem a realização de fotossíntese, ausência de tecidos altamente especializados, como folhas, raízes e vasos condutores, e a existência de representantes unicelulares (microalgas) e multicelulares (macroalgas) (Barsanti & Gualtieri, 2014).

Existem, aproximadamente, 10.000 espécies de macroalgas marinhas, podendo ser encontradas em todos os ecossistemas costeiros do mundo com papéis essenciais na manutenção da biodiversidade do ambiente marinho. Do ponto de vista da coloração dos pigmentos fotossintetizantes, podem ser classificadas em três grupos principais: verdes (Chlorophyta), pardas (Phaeophyta) e vermelhas (Rhodophyta). Em geral, vivem presas a rochas e outros substratos duros nas zonas entremarés, embora determinadas macroalgas pardas e vermelhas possam viver a vários metros de profundidade da superfície dos oceanos ou serem flutuantes como as espécies dos gêneros *Sargassum* e *Ulva*. (SANGHA et al., 2014) (KALASARIYA et al., 2016; LIN et al., 2014)

Os registros do consumo de macroalgas na alimentação humana datam de 2.700 a.C. na China. Atualmente, essa prática continua generalizada em países orientais, como Japão, Coreia do Sul, China, entre outros. Entretanto, em países ocidentais, o consumo humano na dieta é incomum por razões culturais e o principal uso das algas é para a obtenção de hidrocolóides e sua posterior aplicação como agentes espessantes e gelificantes na indústria de alimentos (CIAN, 2015).

A busca por compostos bioativos de organismos marinhos nas últimas décadas produziu uma grande abundância de extratos com aplicações farmacêuticas e industriais. Somente no ano de 2013, mais de mil compostos farmacologicamente ativos de origem marinha foram caracterizados em todo o mundo, com potencial eficácia contra câncer, vírus, bactérias, fungos, hipertensão, hipercolesterolemia e outras doenças (SHANNON et al., 2016). Entre os compostos com atividades biológicas estão os polissacarídeos sulfatados (PS) de algas marinhas, uma família de macromoléculas que contém grupos éster de sulfato ligados a resíduos de açúcar. (RAPOSO et al, 2015) (SEEDEVI et al., 2017).

Nas espécies de algas vermelhas, os PS consistem em polímeros de galactose (ou resíduos de galactose modificados), denominados galactanas sulfatadas (GS). Essas macromoléculas tem atraído bastante atenção por causa da sua abundância e de suas atividades biológicas (LIANG et al., 2014; SEEDEVI et al., 2017). As GS das espécies *Gracilaria birdiae*, *Gracilaria cornea* e *Solieria filiformis*, cultivadas experimentalmente em Flecheiras, Trairi-CE, por exemplo, possuem várias atividades descritas voltadas para a área de imunologia como: antiinflamatória, antiedematogênica, pró-inflamatória, entre outras. Entretanto, não existem estudos investigando o potencial antitumoral de células imunes quando estimuladas por GS dessas espécies.

O câncer é o principal problema de saúde pública do mundo e a segunda principal causa de morte nos países em desenvolvimento, onde se encontram as maiores taxas de incidência da doença (OMS, 2016). No Brasil, a estimativa para o biênio 2016-2017 é de mais de 600 mil novos casos de câncer (INCA, 2016)

Embora, o câncer de pele não melanoma seja o mais frequente do país e corresponda a 30% de todos os tumores malignos registrados, o melanoma representa, aproximadamente, apenas 1% das neoplasias malignas, apesar de ser o mais grave devido à sua alta possibilidade de metástase (INCA, 2016).

Nas últimas décadas, o câncer tem deixado de ser visto como apenas uma coleção homogênea de células mutantes, mas sim como um conjunto complexo de tecidos que formam uma rede dinâmica que inclui, não só as células do parênquima tumoral, mas sim células estromais como: fibroblastos, tecido vascular e células do sistema imune, formando um microambiente tumoral (MAT) que influencia o comportamento das células malignas (MARKS et al., 2016) (NORTHCOTT et al., 2015).

Entre as células imunes encontradas no MAT, os macrófagos associados ao tumor (TAMs) são a população celular mais abundante em tumores sólidos e têm sido alvo de estudos no contexto da inflamação crônica do MAT. Cada vez mais existem evidências sugerindo um papel importante dos TAMs em eventos relevantes para a progressão tumoral como, por exemplo, a regulação da angiogênese, metástase, imunossupressão e resistência à quimioterapia (CHANMEE et al., 2014; FANG et al., 2014; SUN et al., 2014). No MAT, os macrófagos ($M\Phi$), após a estimulação, são convertidos em fenótipos que podem ser classificados em dois tipos: semelhante a M1 e semelhante a M2 (TANIGUCHI et al., 2015). Aqueles que são semelhantes a M1 são ativados por citocinas como IFN- γ sozinha ou associada a lipopolissacarídeos (LPS) e passam a secretar citocinas pró-inflamatórias, entre as quais o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), e promovem a resposta imune contra infecções bacterianas, protozoárias e virais e células tumorais. Em contraste, o $M\Phi$ semelhante a M2 é ativado por citocinas,

como IL-4, IL-13, e apresentam função anti-inflamatória e pró-tumoral, regulando a remodelação de tecidos e promovendo angiogênese (TARIQ, M. et al., 2017).

A manipulação do MAT pode ser vista como alvo de novas terapias para o tratamento do câncer. Nesse contexto, os TAMs parecem ser candidatos atraentes de futuras estratégias terapêuticas como: a depleção de TAMs em tumores, inibição do recrutamento de monócitos circulantes (leucócitos precursores de MΦ) e a "reeducação" dos TAMs para fenótipos anti-tumorais por meio de substâncias estimulantes (ALLAVENA & MANTOVANI, 2012)

A estratégia de tratamento do câncer que promove a estimulação do sistema imunológico do indivíduo por meio do uso de substâncias modificadoras da resposta biológica é denominada imunoterapia e dependendo das substâncias utilizadas e dos seus mecanismos de ação, podem ser classificadas em: ativa, quando o indivíduo recebe vacinas contendo células tumorais ou citocinas que irão estimular o sistema imune a combater as células tumorais e passiva, quando o indivíduo recebe anticorpos ou células mononucleares exógenas com o objetivo de otimizar a capacidade imunológica de combate à doença (INCA, 2015; ACS, 2016).

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Polissacarídeos Sulfatados de Algas

As algas marinhas são ricas em moléculas bioativas com grande potencial para auxiliar na promoção da saúde humana. Alguns estudos epidemiológicos realizados na Ásia Oriental relacionam a menor incidência de doenças crônicas, como câncer e doenças cardiovasculares ao consumo regular de algas marinhas na dieta (BROWN et al., 2014). Outros efeitos benéficos para a saúde incluem: redução da pressão arterial e dos níveis de açúcar na corrente sanguínea (ação hipoglicêmica), efeito anti-inflamatório pela modulação da resposta imune e neuroproteção (CIAN et al., 2015a).

As algas contêm uma grande diversidade de compostos biologicamente ativos como: ácidos graxos poli-insaturados, vitaminas, carotenóides, polifenóis, fibras dietéticas, proteínas e carboidratos. Entre essa última classe de compostos, destacam-se os polissacarídeos devido às atividades biológicas e abundância nos organismos marinhos (MICHALAK et al., 2015; VASCOSCELOS et al., 2015). De acordo com a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), polissacarídeos são macromoléculas (polímeros naturais) constituídas por um grande número de resíduos de

monossacarídeos unidos entre si por ligações glicosídicas (DELATTRE et al., 2011). Entre esses biopolímeros, encontram-se os Polissacarídeos Sulfatados (PS) - macromoléculas polianiônicas ricas em ésteres de sulfato que substituem os grupos hidroxila dos resíduos de açúcares. Os PS estão amplamente distribuídos na Natureza ocorrendo em uma grande variedade de organismos. Nas algas marinhas, são o principal componente da parede celular (PÉREZ-RECALDE et al., 2014).

Dependendo da classificação das algas, os PS variam em relação ao monossacarídeo mais abundante, peso molecular, posição de ligações glicosídicas, grau de esterificação e posição dos grupos sulfato e de outros substituintes (GURPILHARES et al., 2016). Nas algas verdes, os PS encontrados são denominados ulvanas, ramnanas e arabinogalactanas (WANG et al., 2014). Nas algas pardas, são representados pelas fucoidanas (também conhecidas como fucanas) (RAPOSO et al., 2015) e nas algas vermelhas, pelas galactanas (Tabela 1) (PÉREZ-RECALDE et al., 2014).

Tabela 1 - Distribuição de polissacarídeos sulfatados nos três filios de macroalgas

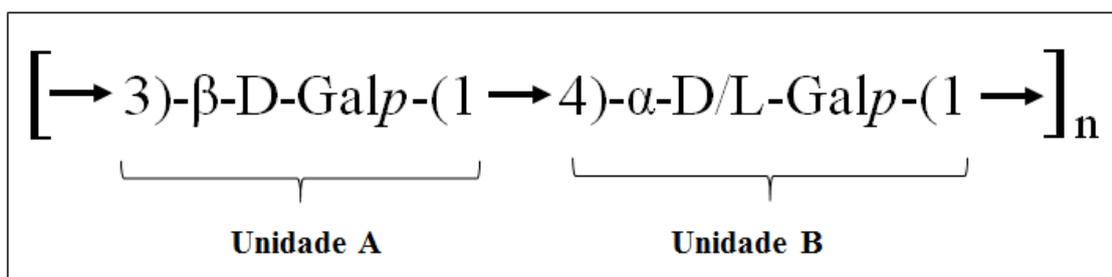
Filo	Polissacarídeos Sulfatados	Exemplos de monossacarídeos encontrados (resíduos)	Exemplos de espécies
Chlorophyta	Ulvanas	Ramnose e ácido glicurônico	<i>Ulva rigida</i> , <i>U. pertusa</i> , <i>Enteromorpha prolifera</i>
	Ramnanas	Ramnose, glucose e ácido glicurônico	<i>Monostroma nitidum</i> , <i>M. latissimum</i>
	Arabinogalactanas	Arabinose e galactana	<i>Codium vermilara</i> , <i>C. fragile</i>
Phaeophyta	Fucoidana (fucana)	Fucose, galactose e glucose	<i>Dictyota caribaea</i> , <i>Lobophora variegata</i> , <i>Laminaria japonica</i> , <i>Padina perindusiata</i>
Rhodophyta	Galactanas	Galactose	<i>Cryptopleura ramosa</i> , <i>Gracilaria cornea</i> , <i>G. birdiae</i> , <i>Solieria filiformis</i>

Fonte: adaptado de Raposo e colaboradores, 2015.

A parede celular de algas vermelhas representa até 65% (p/p) de matéria seca e compreende três domínios: parede fibrilar, matriz amorfa e domínio glicoproteína. A matriz amorfa é formada por galactanas sulfatadas (GS), biopolímeros com grande uso prático. Estes polissacarídeos são também chamados de ficocolóides por sua capacidade de formam géis (CIAN et al., 2015a; USOV, 2011).

As GS geralmente têm uma estrutura linear constituída de resíduos alternados de β -D-galactopiranosose 3-ligada (*unidade A*) e α -D/L-galactopiranosose 4-ligada (*unidade B*). Estes últimos resíduos apresentam a configuração enantiomérica absoluta L para as GS do grupo ágar e configuração enantiomérica absoluta D para as GS do grupo carragenana. Além disso, resíduos derivados da galactopiranosose, como 3,6 anidro- α -D/L-galactopiranosose 4-ligada podem estar presentes em ambos os grupos (Figura 1) (MOURÃO, 2015; USOV, 2011).

Figura 1 - Desenho esquemático da estrutura linear das galactanas sulfatadas



Fonte: adaptado de Aspinall, 1983.

A nomenclatura das GS adotada na maioria dos artigos é bastante arbitrária. Uma terminologia abreviada para as galactanas baseada em suas estruturas químicas foi sugerida em 1994. Foi proposto também um sistema de notação em códigos, especialmente útil para a designação de estruturas híbridas contendo várias unidades repetitivas diferentes (USOV et al., 2011). No entanto, como muitos trabalhos não tem adotado essa nomenclatura, preferindo denominações antigas, as GS serão divididas aqui em dois grandes grupos com base na configuração enantiomérica absoluta da unidade B: grupo ágar (configuração L) e grupo carragenana (configuração D).

2.1.1 Galactanas sulfatadas do grupo ágar

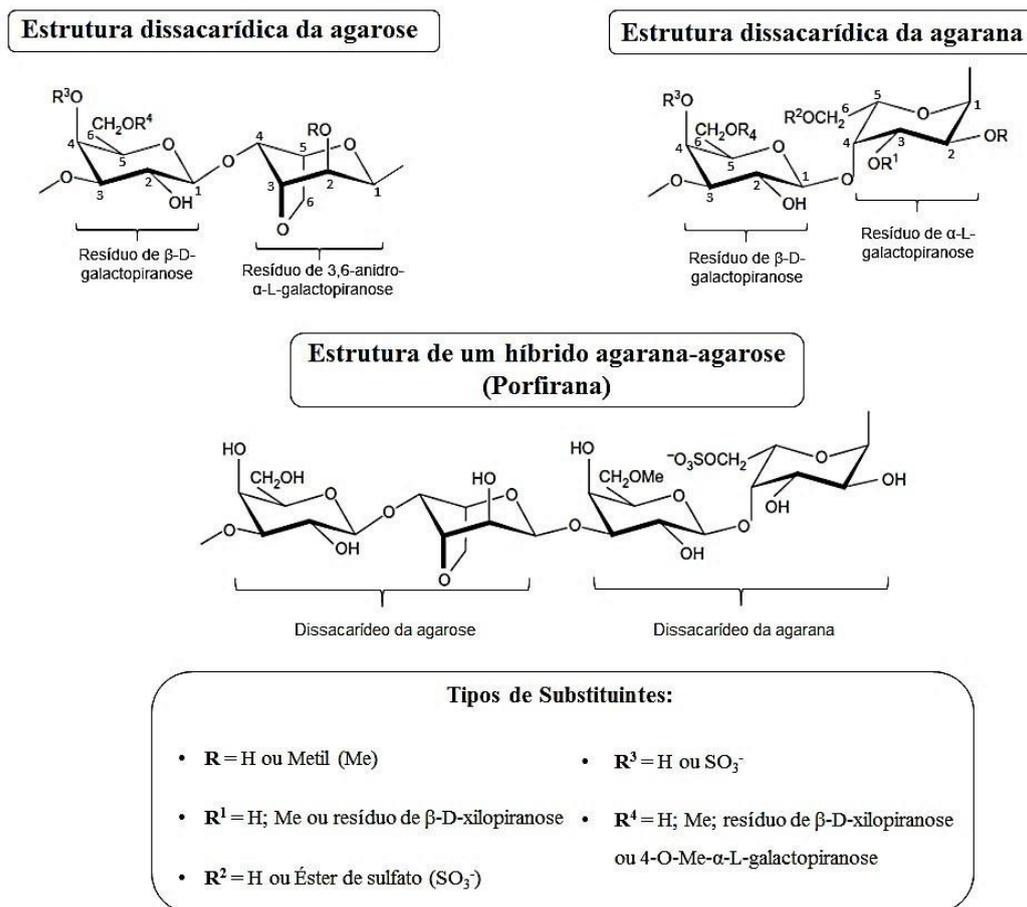
O ágar, também conhecido como "ágar-ágar" - um nome malaio que se refere às algas marinhas - é um hidrocolóide (substância capaz de formar gel na presença de água) produzido exclusivamente na parede celular de espécies de algas vermelhas das famílias Gracilariaceae, Gelidiaceae, Pterocladaceae e Gelidiellaceae. Existe uma alta demanda no mercado por ágar. O ágar possui um preço de varejo mais alto (US\$ 18/Kg), em comparação com outros hidrocolóides de algas marinhas, como alginatos (US\$ 12/Kg) e carragenanas (US\$ 10,4/Kg). Devido às suas características físico-químicas, o ágar tem sido comercialmente utilizado como agente gelificante e espessante nas indústrias de alimentos, produtos farmacêuticos e cosméticos, bem como um meio sólido

para o crescimento de bactérias na pesquisa biomédica e biotecnológica. Ao longo dos anos, as fontes naturais de algas agarófitas foram amplamente exploradas, levando a uma escassez desses organismos para a produção de ágar (ARMISEN, 1995; BIXLER & PORSE, 2011; LEE et al., 2016; RHEIN-KNUDSEN et al., 2015). Como alternativa, o cultivo de agarófitas especialmente do gênero *Gracilaria* foi iniciado em muitos países, como Tailândia (TRONO, 1989), Chile (SANTELICES et al., 1993), Vietnã (TRA; 1989), China (WU et al., 1993), Portugal (MATOS et al., 2006), Austrália (CORDOVER, 2007), Brasil (BEZERRA & MARINHO-SORIANO, 2010) e Índia (GANESAN et al., 2011).

Estruturalmente, o ágar é constituído por uma série complexa de heteropolissacarídeos que, do ponto de vista da carga elétrica, podem ser tanto neutros quanto a altamente carregados devido à presença, por exemplo, de substituintes como éster de sulfato e piruvato (DELATTRE et al., 2011).

As algas vermelhas da Ordem Gracilariales apresentam GS do grupo ágar, como agaranas e agaroses que possuem vários grupos substituintes (grupos sulfato e piruvato, por exemplo) e por híbridos agarana-agarose que apresentam alternância entre os dissacarídeos presentes nas agaroses e das agaranas (Figura 2). Do ponto de vista econômico, o gênero *Gracilaria* tornou-se de grande importância como fonte de ágar devido à sua abundância na Natureza e ao cultivo bem-sucedido, particularmente no Chile e em países asiáticos. O sulfato dessas GS está presente principalmente ligado ao carbono C-6 do resíduo derivado da 3,6 anidro- α -L-galactopiranosose 4-ligada (USOV, 2011).

Figura 2 - Diversidade estrutural das galactanas sulfatadas do grupo ágar



Fonte: adaptado de Usov, 2011.

2.1.2 Galactanas sulfatadas do grupo carragenana

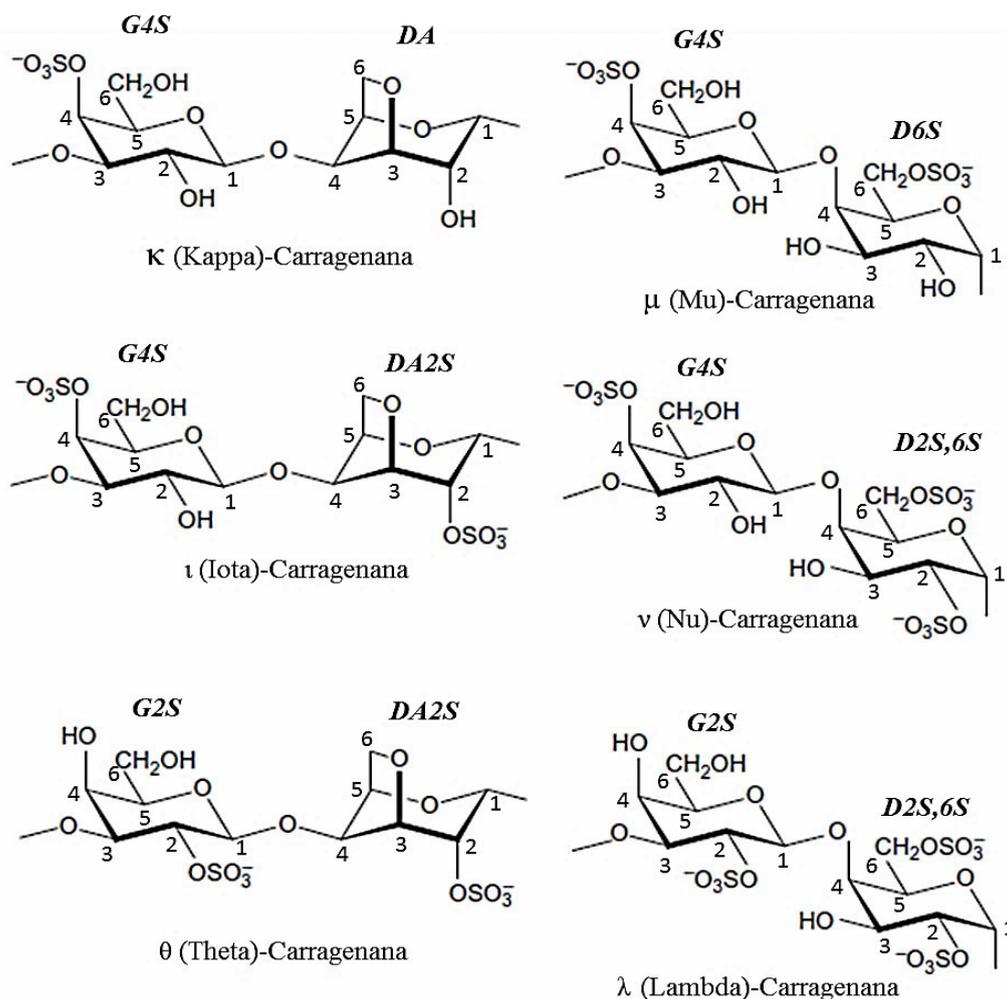
A indústria de hidrocolóides oriundos de algas marinhas cresce na ordem de 2 a 3% ao ano, com a região Ásia-Pacífico dominando cada vez mais a matéria-prima e os aspectos de manufatura envolvidos no processo industrial. A produção anual de carragenana é a que consome a maior quantidade de macroalgas marinhas tendo alcançado o valor de 205.000 t de peso seco em 2014 (PORSE & RUDOLPH, 2017).

As carragenanas estão presentes nas algas vermelhas da ordem Gigartinales e pertencem à família das GS lineares e hidrofílicas. Do ponto de vista da estrutura química, consistem principalmente em resíduos de β -D-galactopirranose 3-ligada (unidades G) e resíduos de α -D-galactopirranose 4-ligada (unidades D) ou 3,6-anidro- α -D-galactopirranose 3-ligada (unidade DA), formando, então, um dissacarídeo repetitivo (FIGURA 3). Os códigos atribuídos aos resíduos (Tabela 2) correspondem à denominação simplificada desenvolvida por Knutsen e colaboradores em 1994. As carragenanas são

classificadas de acordo com a presença da unidade DA na estrutura e a posição e quantidade de grupos sulfato. Tradicionalmente, existem seis tipos básicos: Iota (ι), Kappa (κ), Lambda (λ), Mu (μ), Nu (ν) e Teta (θ) carragenana. Esta nomenclatura é relevante tanto para a sua classificação química quanto para a produção comercial, uma vez que os diferentes subtipos de carragenanas são extraídos de diferentes algas. As carragenanas comerciais têm uma massa molecular média que varia entre 100 e 1000 kDa. Além da galactose e de grupos sulfato, outros resíduos de carboidratos como xilose, glicose e ácidos urônicos e alguns substituintes como éteres metilados e grupos piruvato podem estar presentes em algumas carragenanas (CAMPO et al., 2009; USOV, 2011).

Algumas carragenanas são utilizadas para induzir inflamação em modelos experimentais (LI et al., 2015) e apresentam potencial para serem utilizadas em pacientes com infecção ou câncer, uma vez que estimulam o sistema imune quando administradas por via local ou sistêmica (STEPHANIE et al., 2010). Além disso, alguns trabalhos relatam atividade antitumoral *in vitro* (JAZZARA et al., 2016; PRASEDYA et al., 2016a).

Figura 3 - Diversidade estrutural das galactanas sulfatadas do grupo carragenana



Fonte: Adaptado de Usov, 2011.

Tabela 2 - Código desenvolvido para diferentes açúcares encontrados nas carragenanas

Código	Carragenana	Nome da IUPAC
DA	Kappa (κ)	3,6-anidro- α -D-galactopiranosose 4-ligada
S	Kappa (κ), Iota (ι), Lambda (λ), Mu (μ), Nu (ν) e Teta (θ)	Éster de sulfato (O-SO_3^-)
G2S	Lambda (λ) e Teta (θ)	β -D-galactopiranosose 2-sulfato 3-ligada
G4S	Kappa (κ), Iota (ι), Mu (μ) e Nu (ν)	β -D-galactopiranosose 4-sulfato 3-ligada
DA2S	Iota (ι) e Lambda (λ)	3,6-anidro- α -D-galactopiranosose 2-sulfato 4-ligada

<i>D2S,6S</i>	Lambda (λ) e Nu (ν)	α -D-galactopiranosse 2,6-dissulfato 4-ligada
<i>D6S</i>	Mu (μ)	α -D-galactopiranosse 6-sulfato 4-ligada

Fonte: adaptado de Campos e colaboradores, 2009.

2.1.3 Caracterização bioquímica e classificação das galactanas sulfatadas obtidas de algas cultivadas em litoral cearense

O Laboratório de Carboidratos e Lectinas de Algas (CarboLec) da Universidade Federal do Ceará em parceria com a Associação dos Produtores de Algas de Flecheiras e Guajiru (APAFG) vem desenvolvendo um projeto de cultivo experimental de algas marinhas vermelhas, entre as quais estão as espécies: *Gracilaria cornea*, *Gracilaria birdiae* e *Solieria filiformis*, diminuindo com isso a coleta predatória e otimizando a obtenção de GS, uma vez que a ocorrência de algas no ambiente natural podem ser influenciada pela sazonalidade. A região do cultivo localiza-se a 200 m da costa da praia de Flecheiras (03°13'06''S 39°16'47''W), no município de Trairi-Ce (Figura 4) (RODRIGUES et al., 2010).

Figura 4 - Localização geográfica da praia de Flecheiras situada município de Trairi, Ceará



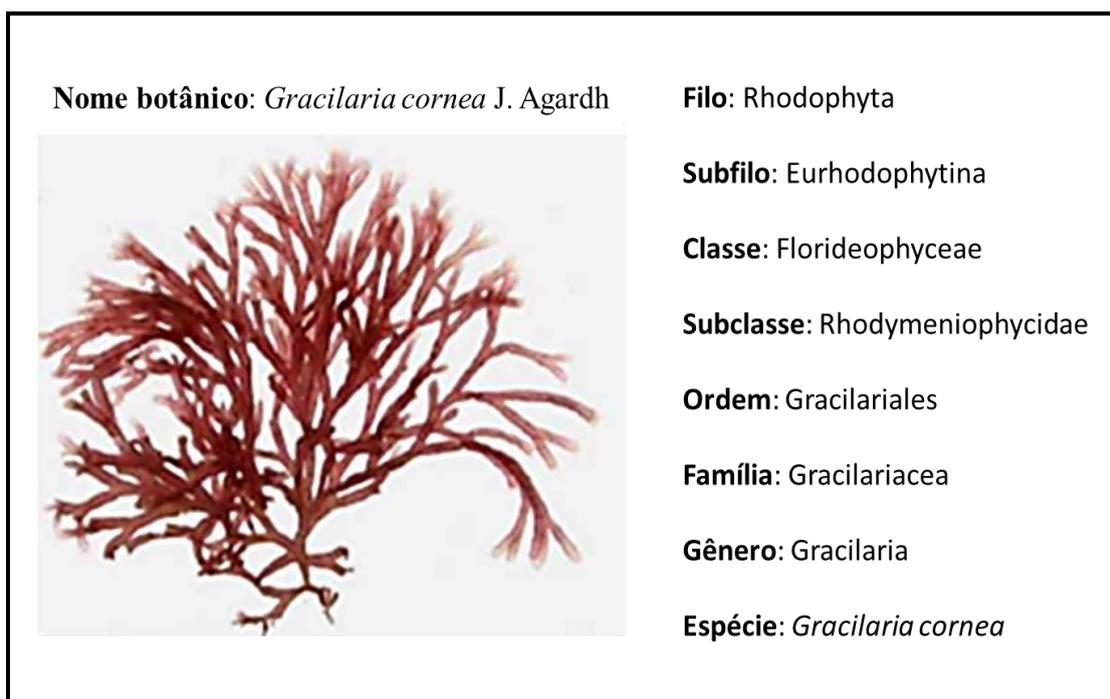
Fonte: elaborado pelo autor a partir de imagens do Google Maps e Google Imagens.

2.2 Classificação taxonômica e informações gerais da alga *Gracilaria cornea*

A alga *Gracilaria cornea* (Figura 5) é uma das espécies de agarófitas de maior relevância econômica para o Brasil, ao lado da *Gracilaria birdiae*, devido ao seu bom rendimento de ágar (ROBLEDO & FREILE-PELEGRÍN, 2011).

A distribuição espacial da alga marinha vermelha *G. cornea* abrange: América do Norte (EUA), América Central (Cuba, Martinica e outras ilha do Caribe), América do Sul (Brasil, Venezuela, Colômbia) e África (Tanzânia, incluindo Zanzibar) (Guiry, M.D. & Guiry, G.M, 2017).

Figura 5 - Classificação taxonômica da alga *G. cornea*



Fonte: elaborado pelo autor a partir da base de dados Algaebase. Imagem obtida de Algaebase.

Os dados a cerca da classificação das GS de *G. cornea* com base em estudos estruturais, bem como o rendimento e os teores percentuais de açúcares totais, proteínas contaminantes e sulfato livre do extrato bruto encontram-se disponíveis na literatura (MELO, 2002; SOUZA et al., 2015). No presente trabalho, essas informações foram resumidas na Tabela 3.

Tabela 3 - Resumo de dados da literatura para as galactanas sulfatadas de *G. cornea*

Classificação das GS com base na estrutura química		GS do grupo ágar
Rendimento percentual do extrato bruto		21,17 %
Açúcares totais (%)	Proteínas contaminantes (%)	Sulfato livre (%)
69 %	Indetectável pelo método	25,97 %

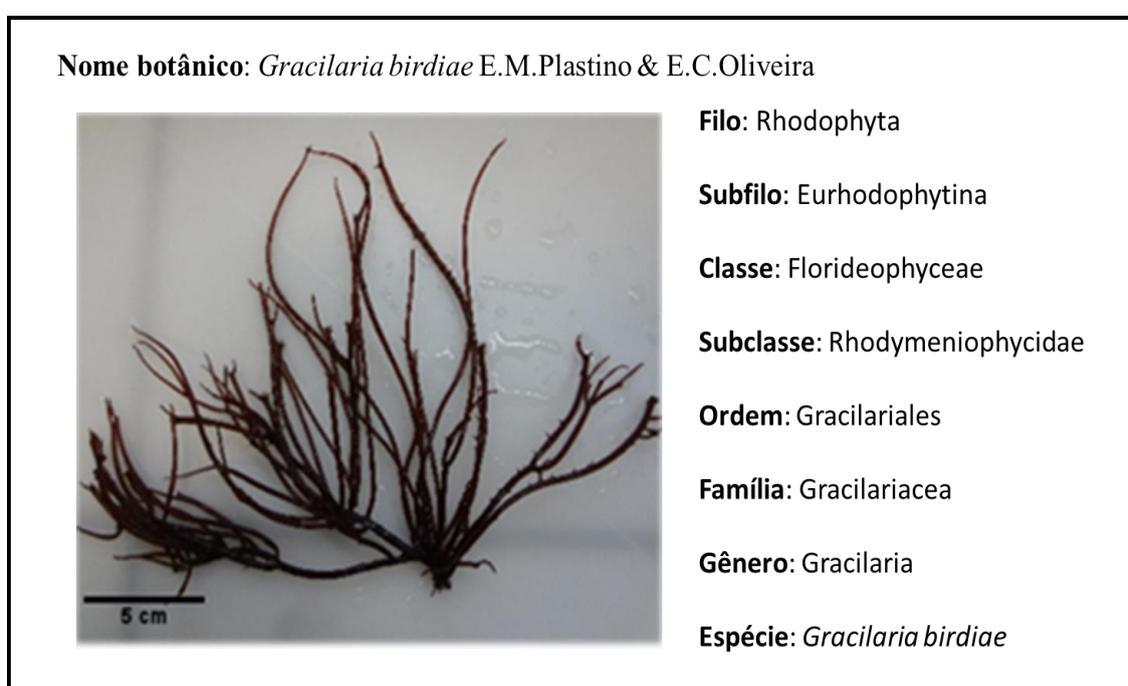
Fonte: elaborado pelo autor a partir de dados publicados por Melo e colaboradores, 2002 e Souza e colaboradores 2015.

2.3 Classificação taxonômica e informações gerais da alga *Gracilaria birdiae*

A alga marinha vermelha *Gracilaria birdiae* (Figura 6) é uma importante fonte de ágar, sendo uma das agarófitas mais explorada economicamente no Brasil (FERNANDES et al., 2016).

Em um artigo publicado em 2002, Plastino e Oliveira descreveram *G. birdiae* como uma nova espécie de alga tropical com ampla distribuição ao longo da zona entremarés da costa brasileira - da costa do Ceará até o Espírito Santo (PLASTINO & OLIVEIRA, 2002). Além disso, essa espécie também pode ser encontrada em outros locais ao longo do Atlântico Ocidental (Guiry, M.D. & Guiry, G.M, 2017).

Figura 6 - Classificação taxonômica da alga *G. birdiae*



Fonte: elaborado pelo autor a partir da base de dados Algaebase. Imagem obtida de Ticiania de Brito Lima.

Os dados a cerca da classificação das GS de *G. birdiae* com base em estudos estruturais, bem como o rendimento e os teores percentuais de açúcares totais, proteínas contaminantes e sulfato livre do extrato bruto encontram-se disponíveis na literatura (MACIEL et al., 2008; VANDERLEI et al., 2016). No presente trabalho, essas informações foram resumidas na Tabela 4.

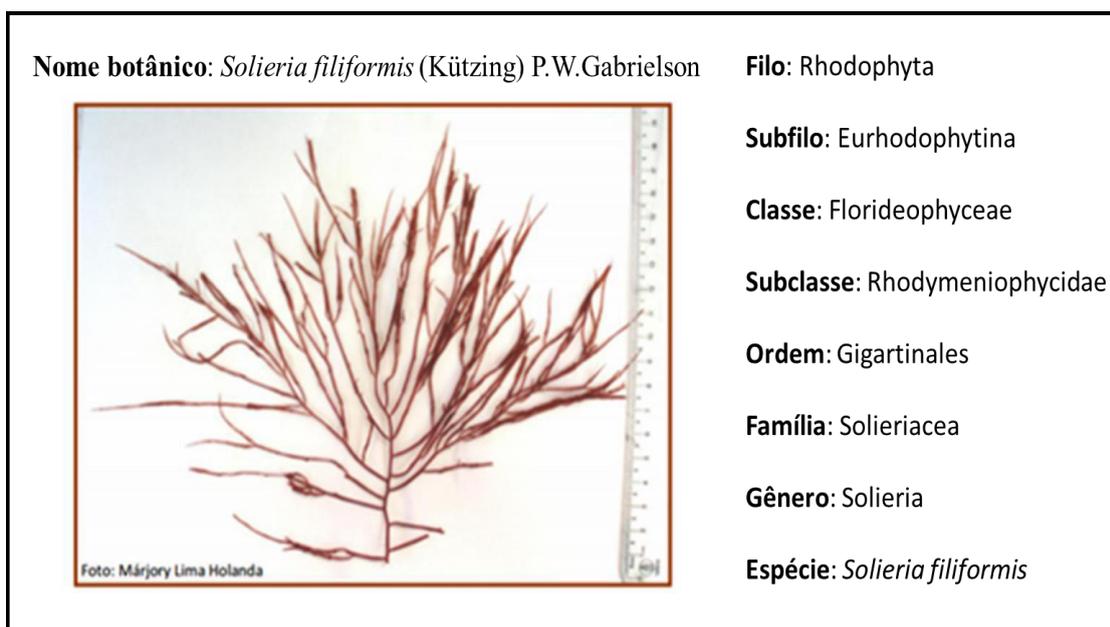
Tabela 4 - Resumo de dados da literatura para as galactanas sulfatadas de *G. birdiae*

Classificação das GS com base na estrutura química			GS do grupo ágar
Rendimento percentual do extrato bruto			4,66 %
Açúcares totais (%)	Proteínas contaminantes (%)	Sulfato livre (%)	
68,2 %	Indetectável pelo método	8,38 %	

Fonte: elaborado pelo autor a partir de dados publicados por Maciel e colaboradores, 2008 e Vanderlei e colaboradores, 2016.

2.4 Classificação taxonômica e informações gerais da alga *Solieria filiformis*

A alga *Solieria filiformis* (Figura 7) é uma das fontes mais promissoras para obtenção de carragenanas destinadas à atender a demanda do mercado mundial (ROBLEDO & FREILE-PELEGRÍN, 2011). A distribuição geográfica dessa alga inclui diversos países em todos os continentes do globo exceto a Antártida (Guiry, M.D. & Guiry, G.M, 2017).

Figura 7 - Classificação taxonômica da alga *S. filiformis*

Fonte: elaborado pelo autor a partir da base de dados Algaebase. Imagem obtida de Marjory Lima Holanda.

Os dados a cerca da classificação das GS de *S. filiformis* com base em estudos estruturais, bem como o rendimento e os teores percentuais de açúcares totais, proteínas contaminantes e sulfato livre do extrato bruto encontram-se disponíveis na literatura (ARAÚJO et al., 2011; MURANO et al., 1997). No presente trabalho, essas informações foram resumidas na tabela 5.

Tabela 5 - Resumo de dados da literatura para as galactanas sulfatadas de *S. filiformis*

Classificação das GS com base		GS do grupo carragenana	
na estrutura química			
Rendimento percentual do extrato bruto		19,14 %	
Açúcares totais (%)	Proteínas contaminantes (%)	Sulfato livre (%)	
29,21 %	0,03%	27,75 %	

Fonte: elaborado pelo autor a partir de dados publicados por Araújo e colaboradores, 2011 e Murano e colaboradores, 1997.

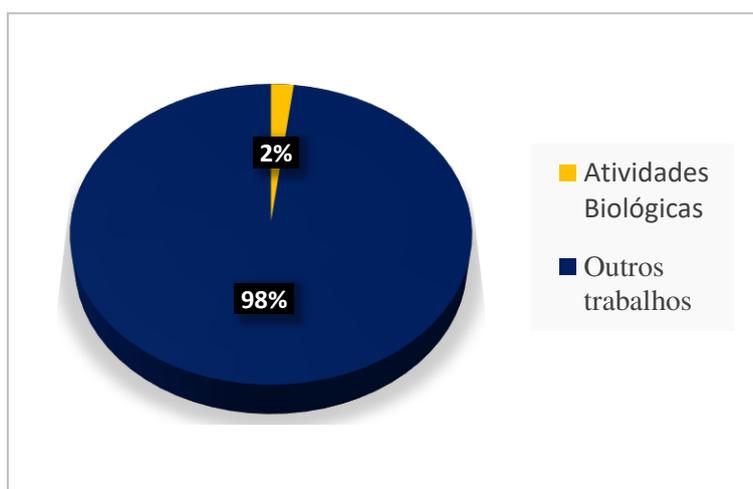
2.5 Atividades biológicas das galactanas sulfatadas de *Gracilaria cornea*, *Gracilaria birdiae* e *Solieria filiformis*

Um levantamento bibliográfico realizado por meio das plataformas de pesquisa Portal Periódicos CAPES e PubMed, para o período de 2007 a 2017, revelou uma quantidade reduzida de artigos científicos dedicados ao estudo de atividades biológicas das GS das algas *G. cornea*, *G. birdiae* e *S. filiformis*.

2.5.1 Resultados obtidos para a alga *Gracilaria cornea*

A busca por artigos contendo as palavras-chave “*Gracilaria cornea*” no Portal Periódico CAPES e no PubMed gerou, ao todo, 253 resultados (242 e 11, respectivamente). Destes, apenas 5 eram referentes a artigos dedicados ao estudo de atividades biológicas. Os dados do levantamento foram expressos em termos percentuais e organizados na forma de gráfico (Figura 8).

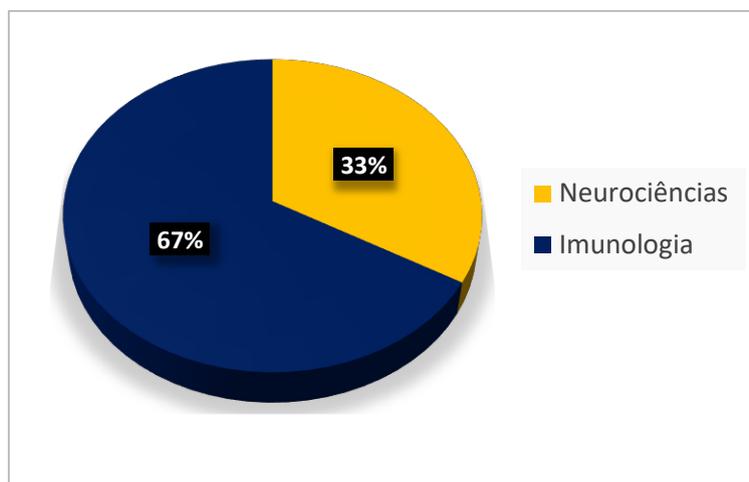
Figura 8 - Quantidade de artigos dedicados às atividades biológicas das galactanas sulfatadas de *G. cornea* expressa em percentagem



Fonte: elaborado pelo autor a partir de dados obtidos em portais de pesquisa.

As atividades biológicas descritas foram, então, classificadas em áreas do conhecimento biológico, de acordo com a natureza dos experimentos e dos resultados obtidos. Assim, nos 5 artigos havia 4 resultados relacionados à área de Imunologia: atividade antinoceptiva e anti-inflamatória (COURA et al., 2012a), investigação dos mecanismos de ação anti-inflamatório (COURA et al., 2015) e antinociceptivo (COURA et al., 2017) e 2 relatos na área de Neurociências: atividade neuroprotetora em modelo de Parkinson (SOUZA et al., 2016) e ansiolítica (MONTEIRO et al., 2016) (Figura 9).

Figura 9 - Distribuição das atividades biológicas das galactanas sulfatadas de *G. cornea* por áreas do conhecimento expressa em porcentagem

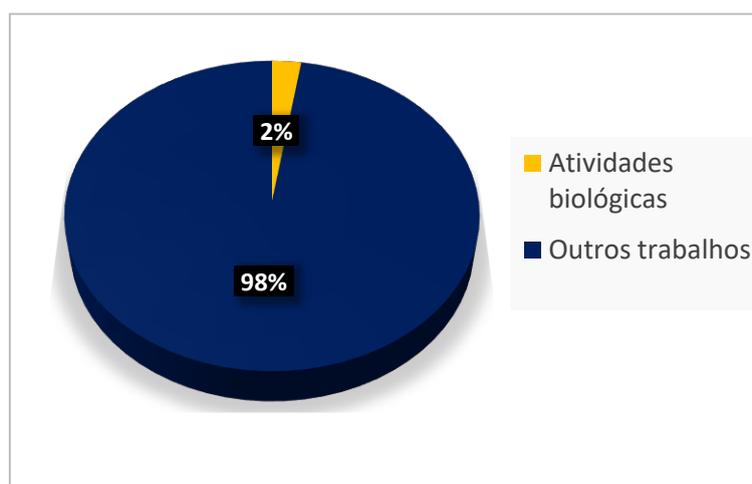


Fonte: elaborado pelo autor a partir de dados obtidos em portais de pesquisa.

2.5.2 Resultados obtidos para a alga *Gracilaria birdiae*

A busca por artigos contendo as palavras-chave “*Gracilaria birdiae*” no Portal Periódico CAPES e no PubMed gerou, ao todo, 161 resultados (156 e 5, respectivamente). Destes, apenas 4 eram referentes a artigos dedicados ao estudo de atividades biológicas. Os dados do levantamento foram expressos em termos percentuais e organizados na forma de gráfico (Figura 10).

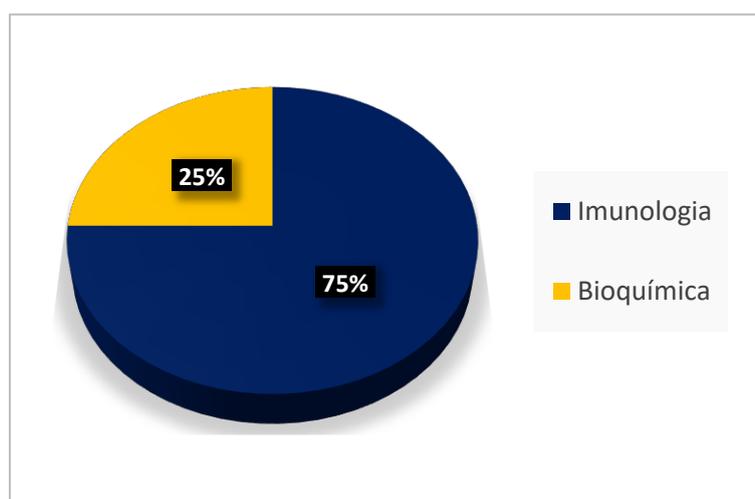
Figura 10 - Quantidade de artigos dedicados às atividades biológicas das galactanas sulfatadas de *G. birdiae* expressa em porcentagem



Fonte: elaborado pelo autor a partir de dados obtidos em portais de pesquisa.

As atividades biológicas descritas foram, então, classificadas em áreas do conhecimento biológico, de acordo com a natureza dos experimentos e dos resultados obtidos. Assim, nos 4 artigos selecionados havia 3 resultados relacionados à área de Imunologia: efeito anti-inflamatório em modelo de colite (BRITO et al., 2014), dano gastrointestinal (SILVA et al., 2012) e estudo do mecanismo anti-inflamatório (VANDERLEI et al., 2011) e 1 resultado ligado à área de Bioquímica: efeito antioxidante *in vitro* (SOUZA et al., 2012b) (Figura 11).

Figura 11 - Distribuição das atividades biológicas das galactanas sulfatadas de *G. birdiae* por áreas do conhecimento expressa em percentagem

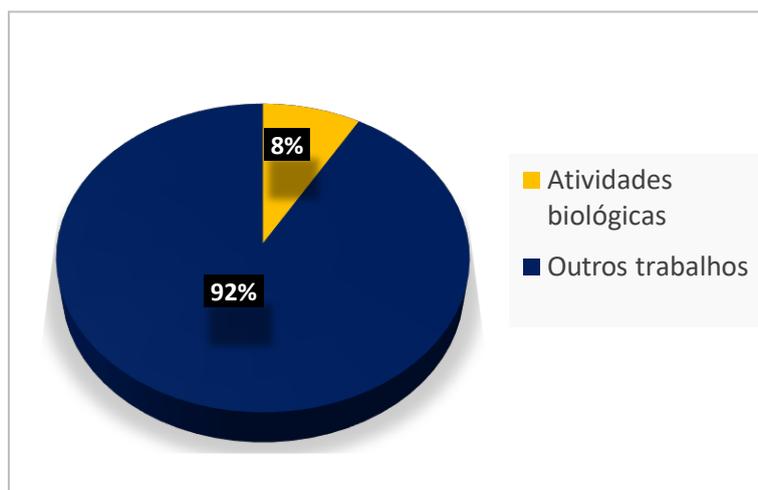


Fonte: elaborado pelo autor a partir de dados obtidos em portais de pesquisa.

2.5.3 Resultados obtidos para a alga *Solieria filiformis*

A busca por artigos contendo as palavras-chave “*Solieria filiformis*” no Portal Periódico CAPES e no PubMed gerou, ao todo, 95 resultados (86 e 9, respectivamente). Destes, apenas 8 eram referentes a artigos dedicados ao estudo de atividades biológicas. Os dados do levantamento foram expressos em termos percentuais e organizados na forma de gráfico (Figura 12).

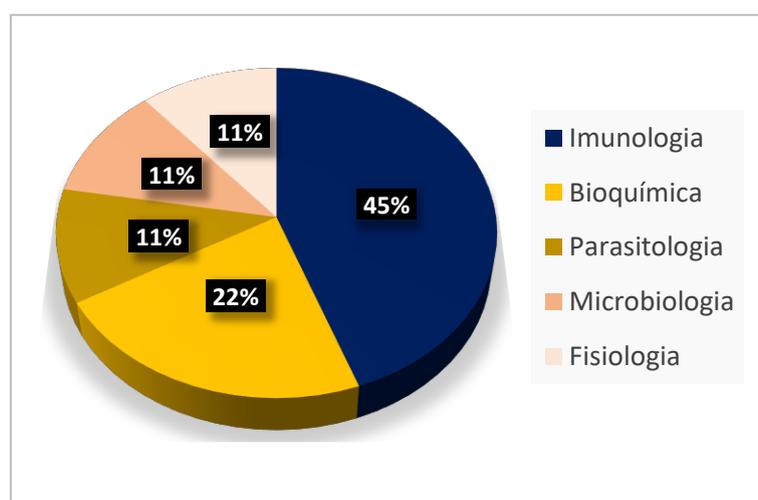
Figura 12 - Percentual de artigos da literatura dedicados às atividades biológicas dos galactanas sulfatadas de *S. filiformis*



Fonte: elaborado pelo autor a partir de dados obtidos em portais de pesquisa.

As atividades biológicas descritas foram, então, classificadas em áreas do conhecimento biológico, de acordo com a natureza dos experimentos e dos resultados obtidos. Assim, nos 8 artigos selecionados havia 3 resultados relacionados à área de Imunologia: pró-inflamatório (ASSREUY et al., 2010), anti-inflamatório (ARAÚJO et al., 2012) e estudo do mecanismo antinoceceptivo (ARAÚJO et al., 2017); 3 resultados ligados à área de Bioquímica: anticoagulante (RODRIGUES et al., 2010), gastroprotetor e antioxidante (SOUSA et al., 2016); 1 resultado ligado à área de Parasitologia: anti-leishmaniose (LEHNHARDT PIRES et al., 2013); 1 resultado ligado à área de Microbiologia: antiviral (MORÁN-SANTIBAÑEZ et al., 2016) e 1 resultado ligado à área de Fisiologia: vasodilatador (ASSREUY et al., 2010).

Figura 13 - Distribuição das atividades biológicas das galactanas sulfatadas de *S. oleria filiformis* por áreas de conhecimento expressa em percentagem



Fonte: elaborado pelo autor a partir de dados obtidos em portais de pesquisa.

Entre os artigos que relatavam atividades biológicas de GS das espécies *G. cornea*, *G. birdiae* e *S. filiformis*, identificados no levantamento bibliográfico, a maioria estava relacionada à área de Imunologia. Entretanto, não foi encontrado nenhum trabalho *in vitro* ou *in vivo* investigando o potencial imunoestimulante das GS dessas espécies em um contexto antitumoral.

2.6 O Câncer

De acordo com o relatório da World Cancer Report 2014 ligada à International Agency for Research on Cancer (IARC), da Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é, indubitavelmente, um grande problema de saúde pública, especialmente nos países em desenvolvimento, onde estima-se que, nas próximas décadas, o impacto na população corresponda a 80% dos mais de 20 milhões de novos casos estimados para 2025 em todo o mundo. A estimativa mundial realizada no ano de 2012 pelo projeto GLOBOCAN/IARC apontou que, dos 14 milhões de casos novos estimados (exceto câncer de pele não melanoma), mais de 60%, de fato, ocorreram em países em desenvolvimento. Em relação à mortalidade, a situação agrava-se quando se constata que, dos 8 milhões de óbitos previstos, 70% ocorreram nesses mesmos países. Os tipos de câncer mais incidentes no mundo, em ordem decrescente de número de casos, foram: câncer de pulmão, mama, intestino e próstata. Em relação ao Brasil, a estimativa para o biênio 2016-2017 aponta a ocorrência de cerca de 600 mil casos novos de câncer, dos quais, aproximadamente, 180 mil serão de câncer de pele (não melanoma) e 420 mil de outros tipos neoplasias malignas. O perfil epidemiológico observado no Brasil (Figura 14) assemelha-se ao da América Latina e do Caribe. Apesar de o câncer de pele ser o mais frequente no Brasil, correspondendo a, aproximadamente, 30% de todos os tumores malignos registrados, o melanoma cutâneo representa somente 1% (Figura 15). Apesar disso, é o tipo de câncer de pele mais grave devido à alta probabilidade de metástase. Esse tipo de câncer tem origem em células produtoras de melanina denominadas melanócitos e predomina em adultos brancos. Se detectado em estágios iniciais, o prognóstico desse tipo de câncer pode ser considerado bom. Além disso, houve uma grande melhora na sobrevivência dos pacientes com melanoma, principalmente devido à detecção precoce do tumor nos últimos anos (INCA, 2016).

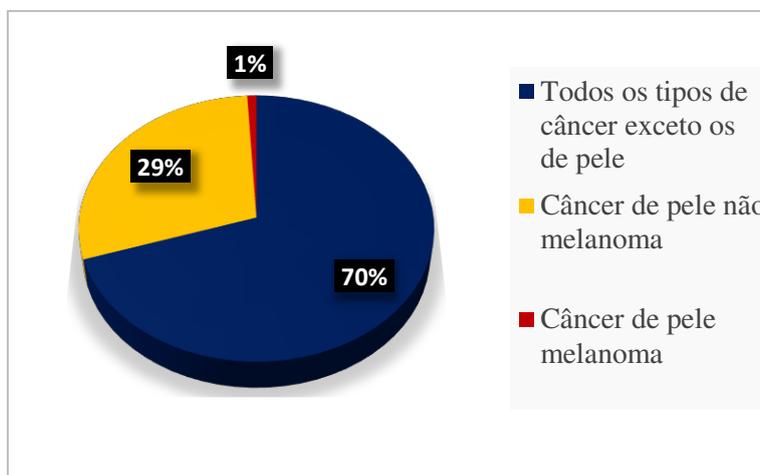
Figura 14 – Os dez tipos de câncer (exceto pele não melanoma) mais incidentes no Brasil para o biênio 2016-2017 divididos por gênero

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

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: adaptado do Relatório INCA 2016-2017.

Figura 15 - Comparação entre a incidência de melanoma e demais tipos de câncer no Brasil para o biênio 2016-2017 expressa em porcentagem



Fonte: elaborado pelo autor com base nos dados do Relatório INCA 2016-2017.

Na verdade, o câncer não é uma doença única, mas sim um conjunto de mais de cem tipos de doenças relacionadas que podem ocorrer em praticamente qualquer lugar do corpo. No câncer, as células tumorais se dividem sem controle, podendo invadir tecidos próximos e também se espalhar para outras partes do corpo através dos vasos sanguíneos e linfáticos (NCI, 2017).

A forma como os cientistas abordam o câncer tem mudado nas últimas décadas. Em 2000, Hanahan e Weinberg propuseram que a notável diversidade de doenças neoplásicas e de seus mecanismos moleculares subjacentes pudessem ser racionalizadas em seis processos biológicos que, em conjunto, representariam as características marcantes (hallmarks) do câncer. Para os seis processos iniciais de hallmarks (insensibilidade a fatores antiproliferativos, autossuficiência em fatores de crescimento, evasão da apoptose, potencial replicativo ilimitado, indução de angiogênese e invasão tecidual e metástase), os avanços na última década adicionaram ainda quatro processos biológicos, incluindo instabilidade genômica, reprogramação do metabolismo energético, promoção da inflamação, e escape da destruição imune. Esses conceitos são um guia poderoso para a pesquisa translacional com o objetivo de melhorar e desenvolver a detecção precoce, triagem, tratamento e qualidade de vida de pacientes com cancer (Figura 16) (HANAHAN & WEINBERG, 2011).

Figura 16 - Capacidades funcionais adquiridas por células tumorais que permitem a sobrevivência, proliferação e disseminação



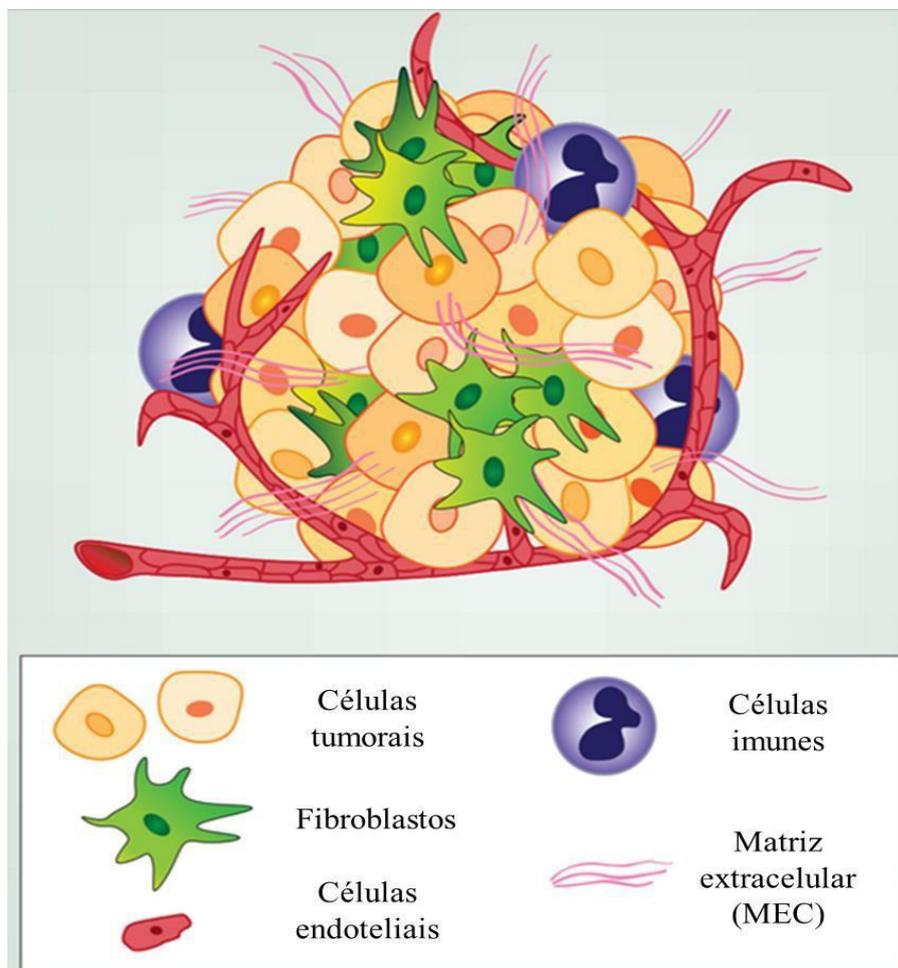
Fonte - Adaptado de Hanahan & Weinberg, 2011.

2.6.1 O microambiente tumoral e os macrófagos associados ao tumor

O estudo da iniciação, crescimento e metástase do câncer tem sido tradicionalmente centrado nas células tumorais e em seus aspectos genéticos. Esta visão postula que as células do câncer se proliferam devido ao descontrole nas vias de sinalização de crescimento em decorrência de alterações tanto em oncogenes quanto em genes supressores tumorais. Apesar das contribuições significativas dessas vias na transformação metastática das células, o crescimento descontrolado que ocorre nos tumores não pode ser explicado apenas por alterações nas células malignas. Para entender completamente o comportamento biológico dos tumores, é essencial considerar o ambiente no qual as células malignas estão inseridas e como elas manipulam e são manipuladas pelos tecidos circundantes para promover o fenótipo maligno. De fato, os tumores são tecidos complexos compostos tanto por células tumorais, como por um estroma constituído de vasos sanguíneos e linfóides, nervos, fibroblastos e proteínas da matriz extracelular, células endoteliais, pericitos e células imunes, formando, coletivamente, um microambiente tumoral (MAT) (Figura 17). Em todos os tumores, embora em extensões variáveis, os M ϕ contituem um importante componente imune do infiltrado leucocitário presente no MAT, onde desempenham um papel dominante como

orquestradores da inflamação relacionada ao câncer (HANSEN et al., 2016; MANTOVANI et al., 2017).

Figura 17 – Heterogeneidade celular verificada no microambiente tumoral



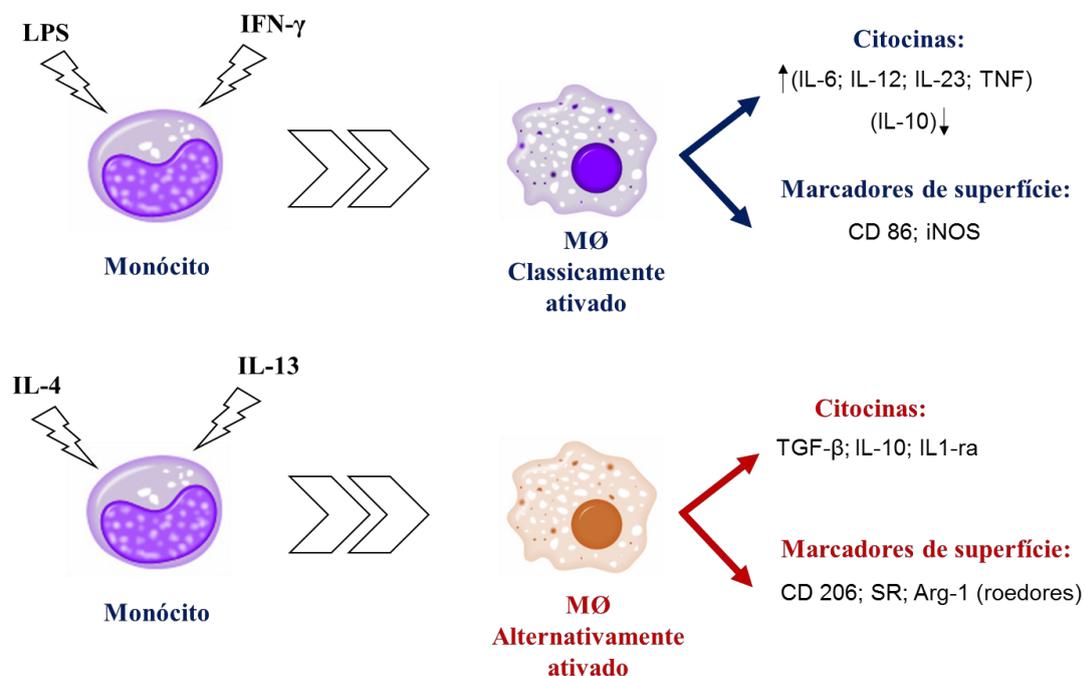
Fonte: adaptado de Marks e colaboradores, 2016.

Os M ϕ são as células mais versáteis e ainda pouco compreendidas do sistema imune. Do ponto de vista fenotípico e funcional, os M ϕ são células excepcionalmente únicas que combinam atributos evolutivamente antigos, unicelulares e com características amebóides (como a capacidade de se mover ativamente e fagocitar partículas) com habilidades evolutivamente modernas para funcionar como sentinelas e efetores imunes dentro do ambiente multicelular. Na sua atividade imunológica benéfica, os M ϕ ajudam a garantir a homeostase dos tecidos e dos órgãos e desempenham um papel ativo na cicatrização de feridas, e na imunidade inata e adaptativa. Entretanto, também podem ser prejudiciais pela promoção da inflamação, doenças vasculares e auto-imunes e metástases tumorais. Descobriu-se recentemente que, pelo menos em mamíferos, não só as funções, mas também a origem dos M ϕ é multifacetada: alguns descendem do saco

vitelino embrionário e do fígado fetal e alguns descendem de precursores da medula óssea de adultos e dos monócitos circulantes (KLOC et al., 2017).

Quando expostos a sinais derivados de microorganismos, tecidos danificados e linfócitos ativados, os monócitos e os M ϕ são funcionavelmente reprogramados exibindo um espectro de fenótipos distintos. Em um esforço para imitar o paradigma Th1/Th2 dos linfócitos, os macrófagos são submetidos aos dois estados de ativação diferentes. O IFN- γ sozinho ou em conjunto com estímulos microbianos como lipopolissacarídeos (LPS) da membrana externa de bactérias Gram-negativas ou citocinas como fator de necrose tumoral (TNF) e fator estimulante do crescimento de granulócito-macrófago (GM-CSF) induz os macrófagos ao estado M1, ou classicamente ativado, que passa a secretar óxido nítrico (NO) e citocinas como IL-6, IL-12, IL-23, TNF em quantidades elevadas e IL-10 em baixas quantidades, além de apresentarem marcadores de superfície como óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e uma proteína de membrana (CD86) expressa em células apresentadoras de antígenos. Em contraste, a ativação alternativa é promovida por citocinas como IL-4 e IL-13 que, por sua vez, induzem o M ϕ ao estado M2, ou alternativamente ativado, que produz citocinas como IL-10, TGF- β e IL-1ra e apresentam marcadores de superfície como receptor de manose (CD 206), receptor de varredura (SR) e arginase-1 (Arg-1, expressa em murinos) (Figura 18). Os M ϕ M1 estão envolvidos como células indutoras e efetoras nas respostas imunes polarizadas para Th1 e como efetores de resistência contra parasitas intracelulares e tumores. Em contraste, os M ϕ M2 são apresentadores de antígeno precários que suprimem a imunidade adaptativa mediada por Th1, eliminam ativamente os debris, contribuem para o abrandamento da inflamação, promovem a cicatrização de feridas, angiogênese e remodelação de tecidos e acompanham a progressão tumoral (MANTOVANI et al., 2014; MARTINEZ & GORDON, 2014).

Figura 18 - Desenho esquemático do paradigma de polarização de macrófagos em dois estados funcionais.

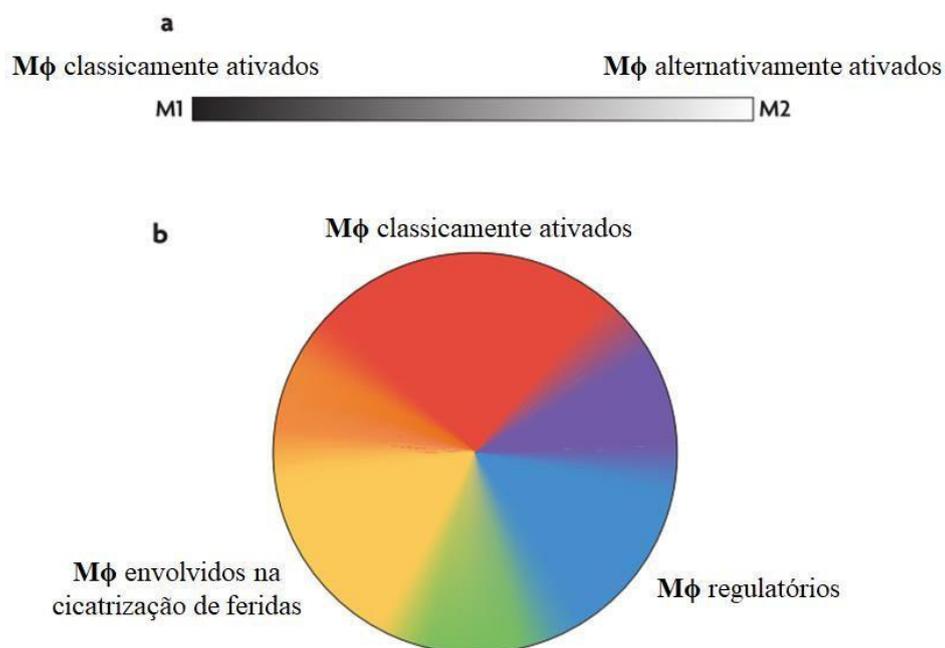


Fonte: adaptado de Martinez, 2014.

Os fenótipos M1 e M2 são extremos em uma ampla faixa de estados funcionais de modo que M Φ verdadeiramente polarizados são raros. Na verdade, o conceito de ativação clássica e alternativa (M1 e M2), imitando a nomenclatura de células Th, tem dificultado a compreensão da patogênese e as possíveis intervenções. Embora existam evidências de que muitos estímulos se combinem para determinar o fenótipo dos macrófagos, a visão deste processo complexo tem se tornado muito bipolar (KIM & BAE, 2016; MARTINEZ & GORDON, 2014). Tendo em vista que a designação M2 engloba células com diferenças dramáticas em sua bioquímica e fisiologia, Mosser e Edwards propuseram em 2010 uma ampliação da classificação dos M Φ com base nas funções fundamentais de macrófagos que estão envolvidas na manutenção da homeostase que são: defesa do hospedeiro, cicatrização de feridas e regulação imune. A classificação de macrófagos de acordo com essas funções fornece três populações macrofágicas básicas, análogas às três cores primárias em uma roda de cores (Figura 19). Esta classificação também ajuda a ilustrar como os macrófagos podem evoluir para apresentar características que são compartilhadas por mais de uma população de macrófagos, análogo a cores secundárias em uma roda de cores. Além disso, traz os macrófagos

classicamente ativados (ou defesa do hospedeiro) mais próximos dos outros dois tipos de células, permitindo o desenvolvimento de macrófagos 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 macrófagos com base em sua função (MOSSER & EDWARDS, 2010).

Figura 19 – Analogia entre o amplo espectro dos fenótipos funcionais dos macrófagos e uma roda de cores



Fonte: adaptado de Mosser & Edwards, 2010.

No contexto do câncer, existem evidências de que, embora os M Φ residentes e de outras origens possam coexistir com células tumorais, os M Φ recrutados representam, provavelmente, a maioria dos macrófagos associados ao tumor (TAMs). Os monócitos do sangue periférico oriundos da medula óssea são recrutados localmente e diferenciam-se em TAMs em resposta a quimiocinas e fatores de crescimento produzidos por células tanto do estroma quanto das células tumorais do MAT. Nesse contexto, o fator estimulante de colônia de macrófagos (M-CSF) é o regulador mestre e fator quimiotático para a maioria das populações de M Φ , sejam eles provenientes do saco vitelino ou da medula óssea. Os TAMs podem representar até 50% da massa tumoral e na grande maioria dos cânceres humanos, uma alta densidade de TAMs no microambiente

correlaciona-se a um mau prognóstico (VINOGRADOV et al., 2014; YANG & ZHANG, 2017). O fenótipo de M Φ pode ser modulado durante a transição de lesões benignas para o tumor maligno: na fase inicial da progressão tumoral, os TAMs podem ter funções imunoestimulantes, mas em estágios posteriores o MAT se torna rico em fatores de crescimento e mediadores inflamatórios, como CSF-1, IL-4, IL-10 e TGF- β e ácido láctico, que causam uma mudança na polarização de macrófagos para que eles adquiram um fenótipo semelhante a M2 com funções pró-tumorais. No microambiente, os TAMs podem influenciar diferentes aspectos da progressão tumoral. Em particular, eles promovem o crescimento e a disseminação do tumor, sustentam a angiogênese por meio da secreção de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de transformação do crescimento (TGF- β), contribuem para a degradação da matriz extracelular pela produção de metaloproteases de matriz (MMPs) e reprimem as respostas imunes adaptativas anti-tumorais. O TAM é uma importante fonte de mediadores reativos como citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e enzimas proteolíticas. Entre os fatores solúveis produzidos por TAM, as citocinas IL-6 e TNF- α são de primordial importância. A IL-6 está envolvida com a regulação das vias de proliferação e sobrevivência nas células tumorais. O TNF- α é uma citocina primária inflamatória que, em altas concentrações, provoca reações destrutivas de tecido, mas em baixas concentrações, como aquelas normalmente produzidas por TAMs, estimula o crescimento tumoral e angiogênese. Além disso, o TNF- α induz a produção de quimiocinas (por exemplo, CCL2) que recrutam mais células mieloides. Os TAMs são os principais indutores do "interruptor angiogênico", ou seja, promovem a aquisição de uma nova vasculatura que suporta o crescimento tumoral, fornecendo oxigênio e nutrientes. A depleção genética ou farmacológica de M Φ em tumores de ratos experimentais resulta na inibição da angiogênese em tumores. No microambiente, os TAMs se localizam preferencialmente em áreas de hipóxia. Colegio e colaboradores demonstraram em 2010 que o ácido láctico, derivado do metabolismo de células tumorais em condições hipóxicas, tem um importante papel sinalizador na indução de diversas características fundamentais dos TAMs e na promoção do crescimento tumoral (COLEGIO et al., 2014; SICA et al., 2015).

2.6.2 Estratégias antitumorais que utilizam os TAMs como alvo

Uma vez que os TAMs desempenham papéis fundamentais no MAT, contribuindo para a progressão tumoral, a escolha dessas células como alvo terapêutico é

considerada uma estratégia promissora. Nesse contexto, estudos clínicos têm avaliado abordagens que incluem: I) a depleção de TAMs. Essa estratégia tem sido considerada bem-sucedida em contextos experimentais para limitar o crescimento tumoral e a disseminação metastática, bem como para obter melhores respostas à quimioterapia convencional e à terapia anti-angiogênica. A trabectedina, um fármaco antitumoral de origem marinha utilizado para tratamento de sarcomas de tecidos moles e câncer de ovário, é um exemplo de molécula com citotoxicidade altamente seletiva para fagócitos mononucleares, incluindo os TAMs; II) inibição do recrutamento de monócitos circulantes. Essa abordagem consiste na inibição dos receptores para o M-CSF (M-CSFR), expresso exclusivamente por monócitos-macrófagos, e do bloqueio da proteína quimiotática para monócitos (CCL2) com anticorpos e III) ativação de TAMs para fenótipos antitumorais. Nesta abordagem o objetivo é “reeducar” os TAMs para exercer respostas antitumorais protetoras para o hospedeiro, idealmente usando substâncias capazes de reverter os TAMs para fenótipos semelhantes a M1. Os MΦ são flexíveis e capazes de mudar de um estado de ativação para outro. Modelos experimentais de tumor de rato que testaram a citocina IL-12, fundamental para a simulação de circuitos Th1 da imunidade adaptativa levando à produção de IFN-g, demonstraram haver redução das atividades pró-tumorais dos TAMs, sugerindo uma ativação para o estado M1. O uso dessa citocina em pacientes com câncer está agora em investigação clínica. Na mesma linha, as terapias que inibem a citocina IL-6, principal citocina pró-inflamatória dos TAMs, com anticorpos monoclonais específicos, podem resultar na redução de fenótipos semelhantes a M2 (ALLAVENA & MANTOVANI, 2012).

2.6.3 Os polissacarídeos podem auxiliar o sistema imune a combater células tumorais

A estimulação do sistema imunológico de indivíduos por meio do uso de substâncias endógenas e exógenas, conhecidas como modificadores da resposta biológica (MRBs), é denominada imunoterapia. De acordo com a utilização dos MRBs e dos seus mecanismos de ação, a imunoterapia pode ser classificada em: passiva e ativa. A imunoterapia passiva utiliza anticorpos antitumorais ou células mononucleares com o objetivo de proporcionar capacidade imunológica de combate à doença. A imunoterapia ativa, por sua vez, pode utilizar vacinas contendo células tumorais que são administradas com a finalidade de intensificar a resistência ao crescimento tumoral, sendo denominada imunoterapia ativa específica ou utilizar substâncias estimulantes e restauradoras da função imunológica como as citocinas IL-2 e interferon alfa (IFN-alfa), sendo

denominada imunoterapia ativa inespecífica. Além dessas funções, os MRBs também podem diminuir a tendência das células tumorais de metastizar e aumentar a tolerância dos pacientes à citotoxicidade da quimioterapia (INCA, 2015; ACS, 2016) (OLDHAM et al., 2017).

Nos últimos anos, diversos polissacarídeos imunomoduladores tem sido isolados de cogumelos, sendo homoglicanos (polissacarídeos que contêm resíduos de um único tipo de monossacarídeo) ou heteroglicanos (polissacarídeos que contêm resíduos de dois ou mais monossacarídeos) capazes de se ligar à proteínas produzindo peptidoglicanos ou complexos protéico-polissacarídicos. O primeiro polissacarídeo a ser relatado com potencial imunomodulador e anticancerígeno foi a lentinana, um β -glucano ramificado extraído de *Lentinus edodes*, que induz citotoxicidade não específica para macrófagos e aumenta a produção de citocinas, no final da década de 1960 no Japão. Até o final da década de 1980, apenas dois polissacarídeos do tipo β -glucano foram identificados com a estrutura química completa e atividades biológicas descritas: o esquizofilano de *Schizophyllum commune* e o polissacarídeo conjugado à proteína (PSK) Krestin[®] de *Coriolus versicolor*. Ambos foram introduzidos com sucesso no mercado nutracêutico e farmacêutico de vários países asiáticos como MRBs com base na capacidade de restaurar ou melhorar as respostas imunes em modelos *in vitro* e *in vivo*. Entretanto, de modo geral, a compreensão dos efeitos imunomoduladores dos extratos de cogumelos em termos de estrutura química e efeitos sobre o sistema imune permanecem incompletos (EL ENSHASY et al., 2013).

Os medicamentos ocidentais e orientais adotam diferentes sistemas de regulamentação para preparações de ervas e cogumelos. A maioria dos países ocidentais segue as regras da OMS e da Lei de Saúde e Educação dos Suplementos Dietéticos (DSHEA) em que extratos de plantas e cogumelos medicinais são definidos como suplementos alimentares e estudos clínicos não são necessários antes de serem introduzidos no mercado. A China e vários outros países asiáticos, entretanto, definem muitas das mesmas ervas e cogumelos medicinais como drogas e, portanto, estudos clínicos são necessários. A medicina ocidental tem feito pouco uso de produtos derivados

de cogumelos em parte devido à sua estrutura química complexa e à falta de purificação farmacologicamente aceitável. O ideal seria adotar os regulamentos padrões e práticas tanto da medicina ocidental quanto da oriental que provarem ser os mais valiosos na busca de benefícios para a saúde humana no século 21 (WASSER, 2014).

Além dos polissacarídeos dos fungos, existem outras moléculas potenciais em avaliação que podem ser utilizadas como adjuvantes devido às suas características imunomoduladoras. Os polissacarídeos de algas marinhas têm sido descritos como reguladores imunológicos que podem ativar as células imunes, melhorando a resposta imunológica do organismo (COSTA et al., 2010; YENDE et al., 2014). Além disso, os PS modificados têm recebido grande atenção. Um estudo utilizando uma carragenana comercial (λ -carragenana) exibiu um eficiente efeito adjuvante quando administrado em camundongos na forma de vacinas preventiva e terapêutica para tratar um linfoma (E.G7-OVA) quando inoculado subcutaneamente em camundongos (LUO et al., 2015).

Tomados em conjunto, esses estudos evidenciam que o sistema imune é um importante aliado no combate a células tumorais e que a busca por compostos na natureza com baixa toxicidade e estimulantes de células imunitárias representa uma estratégia promissora. Em relação aos PS de algas, uma vez que os trabalhos nessa área são escassos, experimentos conduzidos *in vitro* investigando o potencial estimulante de células da imunidade inata por essas macromoléculas, bem como o potencial antiproliferativo dos humores produzido pelas células imunes sobre as células tumorais, representam importantes estudos iniciais.

3 OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar a atividade antiproliferativa de sobrenadantes de macrófagos estimulados por polissacarídeos sulfatados das algas marinhas vermelhas *G. cornea*, *G. birdiae* e *S. filiformis*.

3.2 Específicos

- Avaliar a ativação de macrófagos murinos RAW264.7 estimulados pelos polissacarídeos sulfatados de *G. cornea* (Gco-SP), *G. birdiae* (Gbi-SP) e *S. filiformis* (Sfi-SP) por meio da dosagem indireta de NO⁻,
- Avaliar o potencial antiproliferativo *in vitro* de Gco-SP, Gbi-SP e Sfi-SP e dos sobrenadantes dos macrófagos murinos RAW264.7 ativados por estes PS contra a linhagem de melanoma metastático murino B16-F10;
- Caracterizar fenotipicamente, por meio da dosagem de citocinas, os macrófagos murinos RAW264.7 cujos sobrenadantes apresentaram efeito antiproliferativo contra a linhagem de melanoma metastático murino B16-F10;
- Avaliar os possíveis mecanismos de ação dos sobrenadantes de macrófagos RAW264.7 que apresentaram efeito antiproliferativo contra a linhagem de melanoma metastático murino B16-F10.

4. MACROPHAGES STIMULATED BY SULPHATED POLYSACCHARIDES FROM RED SEAWEEDS *Gracilaria cornea* AND *Solieria filiformis* INDUCE ANTIPROLIFERATIVE EFFECTS *in vitro*

Felipe Barros Teles^{1*}, Alexia Nathália Brígido Assef, Renato Martins Andrade, Vitória Virgínia Magalhães Soares, Antônio Willame da Silva Alves, Norma Maria Barros Benevides, Diego Veras Wilke^{**}

ABSTRACT

Sulfated polysaccharides (SP) from seaweeds have many biological activities. In this study, we investigated the activation of murine macrophages (RAW264.7) to an antitumor phenotype triggered by SP from red seaweeds *Gracilaria cornea* (Gco-SP), *Gracilaria birdiae* (Gbi-SP) and *Solieria filiformis* (Sfi-SP). SP were obtained for protease digestion. Gco-SP, Gbi-SP and Sfi-SP were capable of activate RAW264.7 increasing levels of nitric oxide. RAW264.7 stimulated with only Gco-SP and Sfi-SP were able to inhibit proliferation of murine metastatic melanoma B16-F10 and increased the levels of TNF- α . This samples were used for analysis of the antiproliferative effect. A decrease in cells counting and changes in morphology of B16-F10 were observed without compromising membrane integrity. Moreover, was observed a decrease of cell percentage in G2/M phase of cell cycle when B16-F10 was treated with Sfi-SP-stimulated macrophages supernants. Taken together, these results indicate that Gco-SP and Sfi SP can direct macrophage towards an antitumor phenotype.

Keywords: *Gracilaria cornea*. *Gracilaria birdiae*. *Solieria filiformis*. Tumor microenvironment. Anti-tumor macrophages

Introduction

Among the various compounds from seaweeds, polysaccharides are notable for applications in the food, cosmetic and pharmaceutical industries. Sulfated polysaccharides (SP), a kind of biological macromolecules with high negative charge,

*Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Ceará. felipe.barros2009@gmail.com

** Doutor em Farmacologia pela Universidade Federl do Ceará. diegowilke@gmail.com

have potential pharmacological applications due to their different biological activities, such as anticoagulant, antiviral, antioxidant and anti-cancer (BEDINI et al., 2017; RUOCCO et al., 2016).

The red seaweeds *Gracilaria cornea* and *Gracilaria birdiae* are agarophytes species very economically important for Brazil, due to its good yield of agar (ROBLEDO; FREILE-PELEGRÍN, 2011). The chemical analysis of agar derived from *G. cornea* and *G. birdiae* were previously obtained. The structural components of this SP from *G. cornea* are mainly 3,6-anhydro- α -L-galactose (3,6 AG). The minor components such as 6-*O*-methyl-galactose, glucose, xylose and sulfated groups were also detected (COURA et al., 2015; MELO et al., 2002). In other hand, the SP derived from *G. birdiae*, are composed of galactose (65.4%) and methyl derivatives 6-*O*-methyl-galactose (9.2%) and in smaller quantities 3-*O*- and 4-*O*-methyl-galactose (0.33%). This polysaccharide also presents a high content of 3,6-anhydrogalactose (25.1%) and has a sulfate content of 8.4% (SOUZA et al., 2012).

The red seaweed *Solieria filiformis*, in your turn, is a promising source of carrageenan that satisfy world market demand (ROBLEDO; FREILE-PELEGRÍN, 2011). The chemical analysis of carrageenans derived from *S. filiformis* were previously obtained. In general, these carrageenan seem to contain a higher number of different structural elements. The main structural component is a 3,6-anhydrogalactose 2-sulfate-galactose 4-sulfate (DA2S-G4S)-type structure, which is characteristic of gelling carrageenans with a dominant ι (iota) repeating structure. Additionally, a resonance typical of κ -carrageenan was detected in *S. filiformis*, although with a very low intensity (MURANO et al., 1997).

These three species have been experimentally cultivated on the Ceará coast. Some studies with SP of these species has reported biological activities as antiinflammatory, antinociceptive and pro-inflammatory. However, there are no studies with SP of these seaweeds that evaluate the antitumor potential through an immunostimulatory effect.

Cancer is the world's leading public health problem and the second leading cause of death in developing countries, where the highest rates of cancer incidence are found (WHO, 2016). Although melanoma is not the most frequent skin câncer type in Brazil, it is considered the most serious because of its high probability of metastasis (INCA, 2016).

Tumors are complex tissues that form a dynamic network that includes not only tumor parenchyma cells, but also stromal cells such as fibroblasts, vascular

tissue, and immune system cells, forming a tumor microenvironment (TME) that defines the malignant cells behaviour (HANAHAN & WEINBERG, 2011; MARK et al., 2016; NORTHCOTT et al., 2015). Among the immune cells found in the tumor microenvironment, macrophages are the most abundant cell population in solid tumors and have been the subject of studies in the context of chronic inflammation of the tumor microenvironment. Macrophages (M ϕ) depict tremendous phenotypic plasticity. After stimulation by endogenous or exogenous stimuli, macrophages (M ϕ) are converted into M1 and or M2 phenotype. The M ϕ M1 secrete proinflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor alpha (TNF- α), IL-1 β IL-12 and high levels of nitric oxide and promotes the immune response against pathogens and tumor cells. In contrast, M ϕ M2 exhibit antiinflammatory profile, promoting tissue remodeling and angiogenesis (TARIQ, M. et al., 2017).

Tumor-associated macrophages (TAMs) depict M2-like phenotype and play an important role in tumor angiogenesis and progression, invasion and metastasis of malignant cells. Then, TAMs have been targeted by new anticancer therapies. The use of substances capable of reverting TAMs to a state of M1 -like activation, which plays antitumor responses, is a strategy known as "re-education of TAMs" and has received much attention today (ALLAVENA; MANTOVANI, 2012; CHANMEE et al., 2014; FANG et al., 2014; SUN et al., 2014). In this context, screening of SP from seaweeds capable to stimulate naive macrophages to M1-like phenotype is the first step in advancing the immunomodulation studies of TAMs from TME.

In this study, we aimed to evaluate the activation of murine macrophages RAW264.7 by SP from *G. cornea*, *G. birdiae* and *S. filiformis* toward the antiproliferative phenotype against a murine metastatic melanoma (B16-F10) cells line.

Experimental

Reagents

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Fetal Bovine Serum (FBS), antibiotics (penicillin and streptomycin) and trypsin-EDTA were purchased from Gibco BRL Co. (Grand Island, NY, USA). Lipopolysaccharide from *Escherichia coli* (LPS), Acetic acid, Triton X-100, Propide iodet, Doxorubicin, Sulphanilamide and NED reagents were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Sodium nitrite (NaNO₂) was purchased from Dinâmica (Diadema, São Paulo, Brazil). ELISA kits for IL-10, and TNF- α were purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA).

Isolation and characterization of Sulfated Polysaccharides

The seaweeds *G. cornea*, *G. birdiae* and *S. filiformis* were obtained during sampling procedures from an experimental culture located at 200 m from the coastal zone of Flecheiras Beach- Trairi, Ceará (03 ° 13'06 "S; 039 ° 16'47" W). One voucher of each specie (no. 34739 to *G. cornea*, 40781 to *G. birdiae* and 35682 to *S. filiformis*) was deposited in the Herbarium Prisco Bezerra in the Department of Biological Sciences, Federal University of Ceará, Brazil. According to the Brazilian laws a specific permissions is not required for use of seaweeds *G. cornea*, *G. birdiae* and *S. filiformis* in this study. The seaweeds were washed with distilled water, separated from epiphytes and/or other fouling organisms and stored at -20 °C until use. SP derived from *G. cornea* (Gco-SP) and *S. filiformis* (Sfi-SP) were obtained by protease digestion (60°C, 6 h) in 100 mM sodium acetate buffer (pH 5,0) containing EDTA and cysteine (both 5 mM), with some modifications as previously described by Coura and Araújo (COURA et al., 2012a) (ARAÚJO et al., 2011). In other hand, SP derived from *G. birdiae* (Gbi-SP) was obtained by non-enzymatic aqueous extraction at 85 °C accordind Bezerra and colleagues (BEZERRA & MARINHO-SORIANO, 2010) with some modifications.

Cell lines, culture procedures and treatments

RAW264.7, a murine macrophage cell line, and B16-F10, a murine metastatic melanome, were purchased from the Rio de Janeiro Cell Bank (BCRJ), Brazil. The cells were cultivated in DMEM containing 10% heat-inactivated FBS and 1% penicillin/streptomycin at 37 °C in 5% CO₂ humidified atmosphere. RAW264.7 cells were seeded at $1,5 \times 10^5$ cells/mL in a 48-well plates for 24 h. B16-F10 cells were seeded at 4×10^4 cells/mL in 96-well plates for 24 h. Then, RAW264.7 cell line was used to evaluate the NO production by Griess assay and the B16 -F10 cells line was used in antiproliferative assays by SRB and flow cytometry assays.

NO analysis

RAW264.7 cells were treated with sulfated polysaccharide of *G. cornea* (Gco-SP), sulfated polysaccharide of *S. filiformis* (Sfi-SP), sterile saline (as negative control) and LPS (as positive control) for 24h. The levels of oxide nitric (NO) formed in the supernatant of macrophages RAW264.7 was indirectly measured by colorimetric assays with Griess reagent wich determines the nitrite (NO₂⁻) concentration in solution (GREEN

et al., 1982).

Evaluation of antiproliferative potential *in vitro*

The antiproliferative assay of samples was performed by SRB method according Skehan et al. (SKEHAN et al., 1990). B16-F10 cells were treated with, saline, LPS, SP (Gco-SP, Gbi-SP and Sfi-SP), or supernatants of SP-treated macrophages (named Sn-Gco, Sn-Gbi and Sn-Sfi), or supernatant of LPS-treated macrophages supernatants (Sn-LPS) with DMEM and incubated for 48 h. The supernatants of RAW264.7 cells had dilution factor = 2 for treatments of B16-F10 cells.

Cytokine assays

The cytokines IL-10 and TNF- α concentrations in macrophages supernatants were measured by ELISA according to the manufacturers' instructions.

Evaluation of antiproliferative effects of supernatants of SP-stimulated macrophages on metastatic melanoma cells

B16-F10 cells line were treated with doxorubicin at 0,4 μ M (as positive control) or supernatants of SP-stimulated macrophages for 24h. Then, the cells were harvested to perform experiments to investigate the antiproliferative effects of macrophages supernatants stimulated by samples. For flow cytometry analysis, five thousand events were acquired for each replicate. A gate strategy was applied to exclude cellular debris and doublets from the analysis. Morphological (FSC and SSC) and PI fluorescence of B16-F10 cells were acquired using FACSVerse cytometer (BD Bioscience) and data were analyzed using FlowJo V.10 software (Ashland, Oregon, USA).

Evaluation of cell counting, membrane integrity, morphological changes and cell cycle analysis

In this study, fluorescence of cells stained with propidium iodide (PI) was measured to examine the cell viability. PI is a fluorescent probe that intercalates with double-stranded nucleic acids. But PI will not be able to pass through intact cell membranes of live cells. However, when the cell dies the integrity of the cell membrane fails and PI would be able to enter and stain the nucleic acids (NICOLETTI et al., 1991). PI can be used in this manner to discriminate between live nonfluorescent cells and dead fluorescent cells to evaluate membrane integrity, morphology and cell cycle. Briefly, cells were washed,

harvested, centrifuged, redispersed, and stained with 500 μ l of PI solution (5 μ g/mL) for 1 h. Cells were equally divided into tubes for cell integrity analysis and cell cycle assays. In addition, cells were lysed with 1% Triton X-100 for cell cycle assay in order for PI to intercalate with DNA.

Statistical analysis

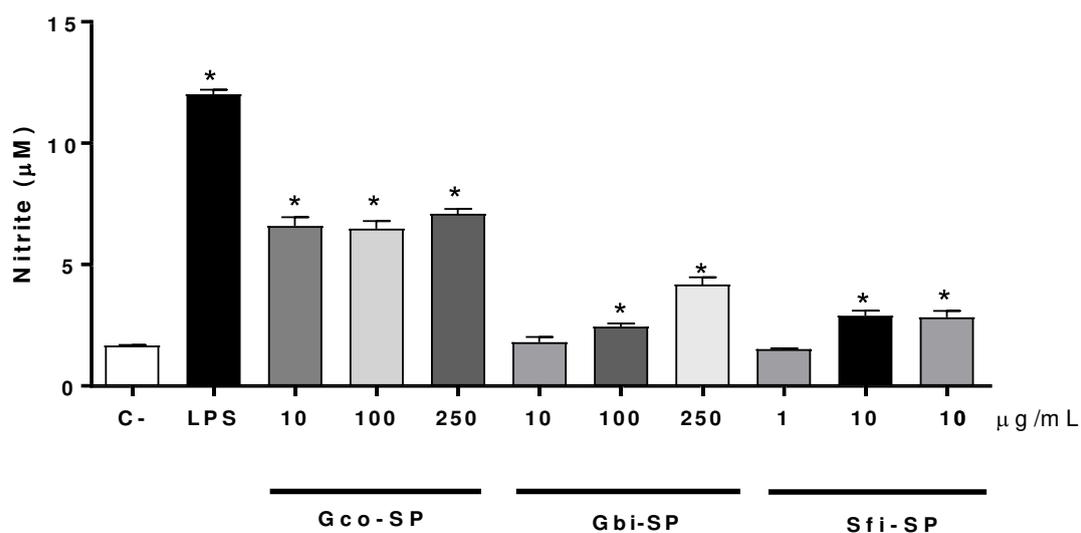
Each experiment was performed in triplicate and repeated at least three times. Data were recorded as the mean \pm SD, and the statistical significance between groups was analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Dunnett or Tukey's multiple comparison tests with $p < 0.05$ considered statistically significant. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 5.0 software.

Results and discussion

Evaluation of macrophages stimulating effect of SP and antiproliferative potential of SP and supernatants of SP-stimulated macrophages

NO production analysis

Figure 1. NO production by macrophages.



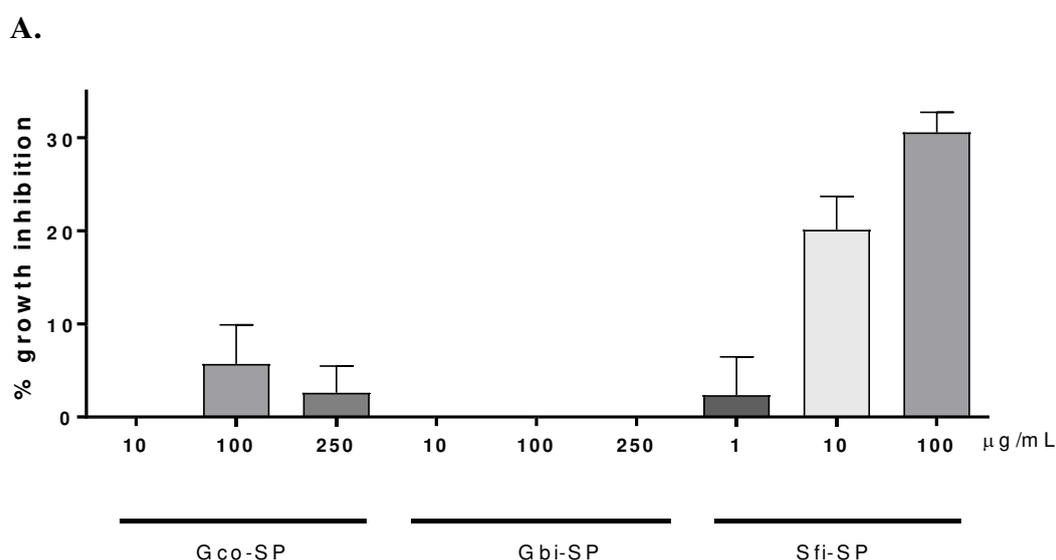
Cells were treated with saline (C-), lipopolysaccharide from *E. coli* (LPS) at 100 ng/mL, Gco-SP at 10, 100 and 250 µg/mL, Gbi-SP at 10, 100 and 250 µg/mL or Sfi-SP at 1, 10 and 100 µg/mL. The levels of nitrite were measured by Griess Assay after 48h of treatment. The obtained absorbance values were transformed into nitrite concentration by interpolation and analyzed by analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's post-test. (*p<0.05) when compared samples with negative control (C-).

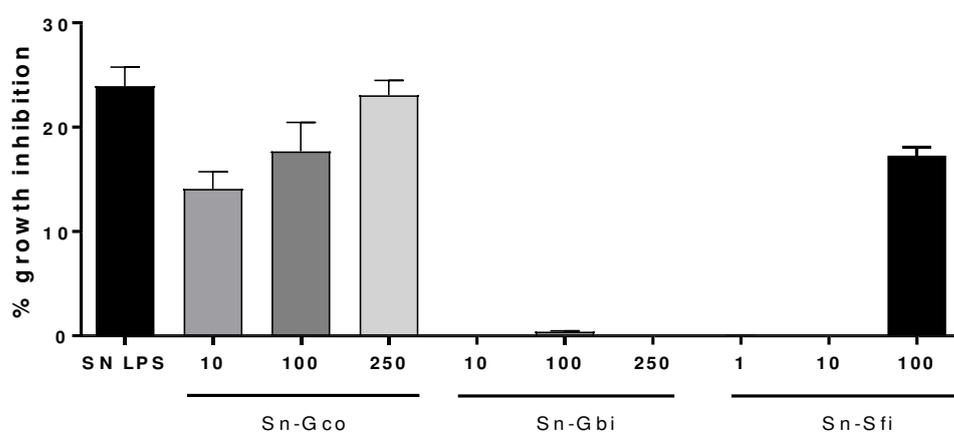
The results showed that Gco-SP (at all concentrations) and Gbi-SP and Sfi-SP (at highest concentrations) were able to increase significantly NO production by RAW264.7 macrophages (Fig.1). It is important to note that Gco-SP increased, on average, more than double the NO production by macrophages when compared to Sfi-SP and Gbi-SP.

Several *in vitro* studies with sulfated polysaccharides from seaweeds have been reported to stimulate macrophages by increasing NO production. Fractions of sulfated xylomannan, a SP type, found in the red seaweed *Nemalion helminthoides* were able to increase NO production in a murine macrophages line (RAW264.7). A commercial fucoidan was able to stimulate RAW264.7, increasing NO production (NAKAMURA et al., 2006). In addition, a sulfated xylogalactan from the green alga *Caulerpa lentillifera* was also able to promote increased NO production by RAW264.7 in a dose-dependent manner (MAEDA et al., 2012). Among the macrophage receptors involved in the recognition of polysaccharides the most studied include Toll like 4 (TLR-4) for mannan, complement receptor type 3 (CR3) and Dectin-1 for soluble β-glucans and scavengers receptors (SR) for fucoidans (FERREIRA et al., 2015).

Evaluation of antiproliferative effect against B16-F10 *in vitro*

Figure 2. Antiproliferative effect of SP and SP-treated macrophages supernatants against murine metastatic melanoma B16-F10 cell line.



B.

A) B16-F10 cells treated for 48h with Gco-SP at 10, 100 and 250 $\mu\text{g/mL}$, Gbi-SP at 10, 100 and 250 $\mu\text{g/mL}$ and Sfi-SP at 1, 10 and 100 $\mu\text{g/mL}$. **B)** B16-F10 cells treated with supernatant of macrophage stimulated by lipopolysaccharide from *E. coli* (LPS) at 100 ng/mL as a positive control, Gco-SP at 10, 100 and 250 $\mu\text{g/mL}$, Gbi-SP at 10, 100 and 250 $\mu\text{g/mL}$ or Sfi-SP at 1, 10 and 100 $\mu\text{g/mL}$. The absorbance values were performed at least three times in triplicate and transformed into growth inhibition percentage.

The assay for the evaluation of the antiproliferative effect demonstrated that Sfi-SP (10 and 100 $\mu\text{g/mL}$) presented the highest inhibition of B16-F10 proliferation between the three samples analyzed (Fig. 2A). On the other hand, only the supernatants of macrophages treated with Gco-SP (at all concentrations) and with Sfi-SP (100 $\mu\text{g/mL}$) promoted a inhibition of the cellular proliferation of murine metastatic melanoma B16-F10 (Fig. 2B).

In general, SPs of marine origin present low toxicity, which can be attested, including, widespread use of food, especially in eastern countries (CIAN et al., 2015; FEDOROV et al., 2013). However, there are studies demonstrating that some of these macromolecules present some degree of cytotoxicity for several tumor cell lines. Fucoidans, a type of SP, obtained from various marine organisms have the ability to inhibit the growth of several tumors by inducing apoptosis and cell cycle arrest, inhibiting metastasis and potentiating the antiproliferative effect of chemical drugs (ZONG et al., 2012). In fact, studies with SP of the species *Fucus vesiculosus* and brown seaweeds of the genus sargassum have reported cytotoxicity against a lineage of B16 melanoma through the induction of apoptosis and/or inhibition of cell proliferation. There are also

reports that SP isolated from *Capsosiphon fulvescens*, a green seaweed, inhibited cell proliferation and induced apoptosis (KWON & NAM, 2007).

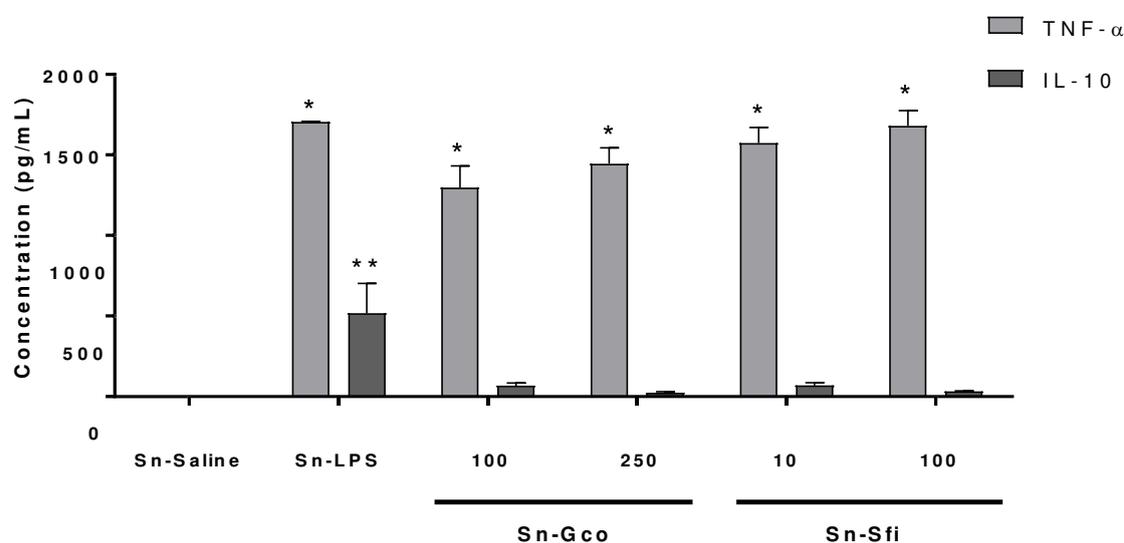
The demonstration that SP activates naïve macrophages *in vitro* for M1-like phenotypes is an important step in the search for compounds that may act on the TAMs of the tumor microenvironment. Indeed, the use of multiple strategies, not just focused on tumor cells, can make cancer treatment more efficient (PIENTA et al., 2008).

Currently some studies using compounds from natural sources that activate macrophages for an antitumor phenotype have been reported. Supernatants from RAW264.7 cells stimulated with aqueous extract derived from the *Crassocephalum crepidioides* plant suppressed cells growth of the murine Sarmoma 180 (S-180) cells line in dose-dependent manner. (TOMIMORI et al., 2012). Similarly, RAW264.7 cells when stimulated with fucoidan derived from seaweed *Cladosiphon okamuranus* Tokida showed cytotoxicity against S-180 *in vitro* (TAKEDA et al., 2012).

Because Sn-Gbi did not inhibited the B16-F10 cells growth, it was not used in the following experiments.

Cytokines releasing

Figure 3. Levels of TNF- α and IL-10 produced by macrophages treated with saline, LPS, Gco-SP and Sfi-SP.



Murine macrophages RAW264.7 were treated with saline (C-) as negative control, lipopolysaccharide from *E. coli* (LPS) at 100 ng/mL, as positive control, Gco-SP at 100 and 250 μ g/mL or Sfi-SP at 10 and 100 μ g/mL. Cytokines of the supernatants were detected by ELISA. The absorbance values from the cytokine standard curve of 2 experiments, in duplicate, were interpolated and analyzed by analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's post test. (* $p < 0,05$) indicating evaluating of TNF- α production when compared to the negative control (C-). (** $p < 0,05$) indicating evaluating of IL-10 production when compared to the negative control (C-).

TNF- α and IL-10 releasing were measured on the supernatants of the macrophages treated with Gco-SP and Sfi-SP. Both, Gco-SP and Sfi-SP stimulated high levels of TNF- α . On the other hand, IL-10 releasing did not increase significantly.

TNF- α is a highly proinflammatory cytokine associated with classically activated macrophages M1 and plays an important role in the immune system during inflammation, cell proliferation, differentiation and apoptosis being able to induce rapid hemorrhagic necrosis of tumor cells (BALKWILL, 2009; MARTINEZ; GORDON, 2014; ZELOVÁ; HOŠEK, 2013). The IL-10 cytokine, in turn, is one of the cytokines produced by M2-like TAMs in TME capable of promoting inhibition of the antitumor immune response (LIU et al., 2013).

A commercial k-carrageenan study reported increased phagocytic capacity of RAW264.7 cells, as well as increased NO and TNF- α production via the TLR4-NF- κ B pathway (SHU et al., 2017). In addition, fucoidans (purified from brown seaweed *Fucus vesiculosus*) and commercial arabinogalactans improved macrophage tumoricidal and phagocytic activities and these activated cells exhibited a significant increase in NO, H₂O₂ and TNF- α and IL-6 cytokines production (CHOI et al., 2005).

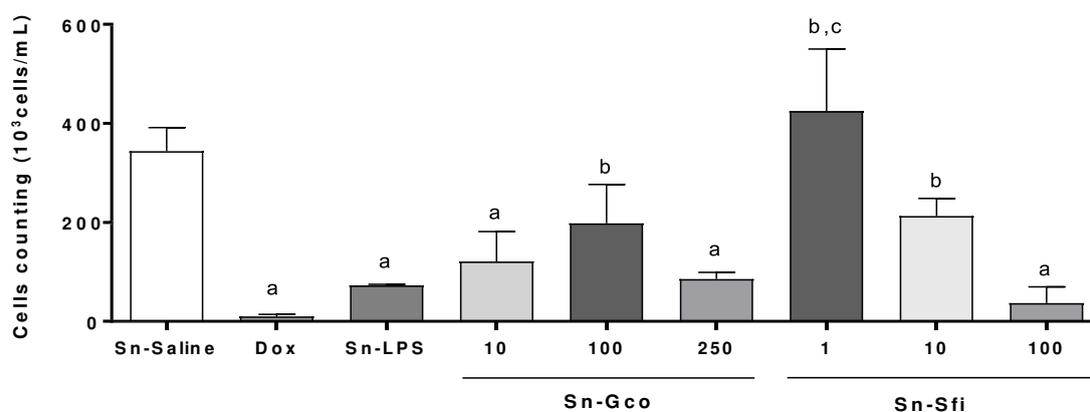
Classically activated macrophages are characterized by the production of NO, reactive oxygen species (ROS) and proinflammatory cytokines such as IL-12 and TNF- α (LEE et al., 2015; MARTINEZ & GORDON, 2014; MILLS, 2012; MILLS et al., 2000). Increased NO and TNF- α production by Gco-SP and Sfi-SP stimulated macrophages at higher concentrations, compared to negative controls, and low IL -10 levels suggest that RAW264.7 macrophages were activated for one M1-like antitumor activation state.

Although LPS, a potent activator of the immune response, is capable of activating macrophages to a proinflammatory phenotype, its high toxicity discourages clinical use, since high concentrations of LPS in the blood can induce septic shock (DA SILVA et al., 1993). Thus, SP have the advantage of activating macrophages for antitumor phenotypes although they showed low toxicity.

Antiproliferative effects of Sn-Gco and Sn-Sfi against murine melanoma B16-F10 cell line

Evaluation of cell counting

Figura 4. Cell counting of B16-F10 treated with supernatants of SP-stimulated macrophages.



Effects of Gco-SP and Sfi-SP-stimulated macrophages against murine melanoma B16-F10 proliferation after 48h incubation. Doxorubicin (DOX) 0.4 μ M and supernatant of macrophage treated with lipopolysaccharide from *E. coli* (LPS) at 100 ng/mL were used as positive controls. The values were obtained from experiment performed in triplicate. The data are presented as mean values \pm SD, were analyzed by analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-test with "a" ($p < 0.05$) when compared samples with "a" ($p < 0.05$) when compared samples with negative control (Sn-Saline); "b" ($p < 0.05$) when compared samples with DOX; "c" ($p < 0.05$) when compared samples with Sn-LPS.

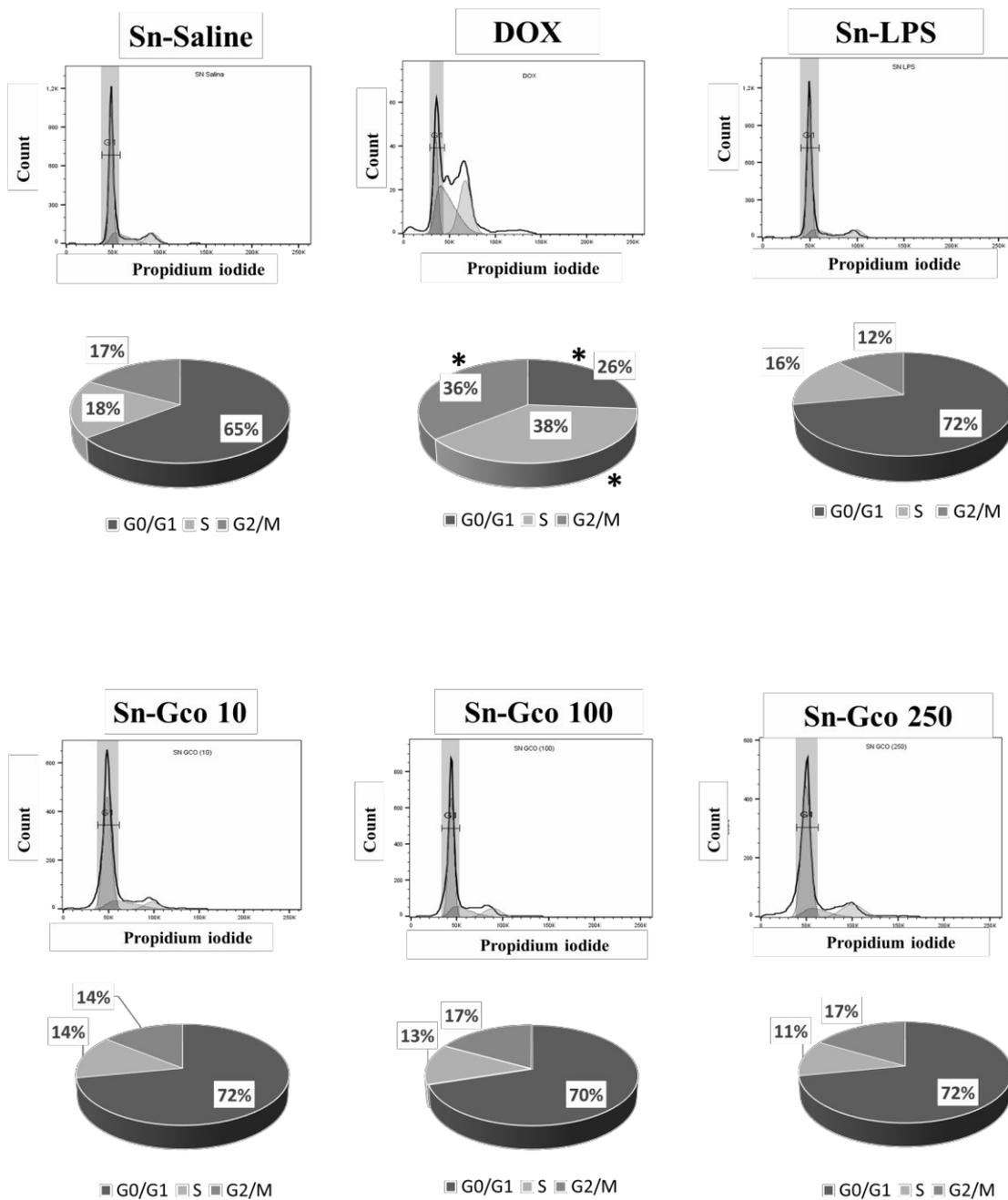
Evaluation of the cell count by the flow cytometry method revealed that Sn-Gco 10, 250 and Sn-Sfi 100 were able to reduce the B16-F10 cell count as compared to the negative control (Sn-Saline). In addition, these supernatants had a similar performance to the positive control DOX. The results obtained are in accordance with those found in the SRB assay.

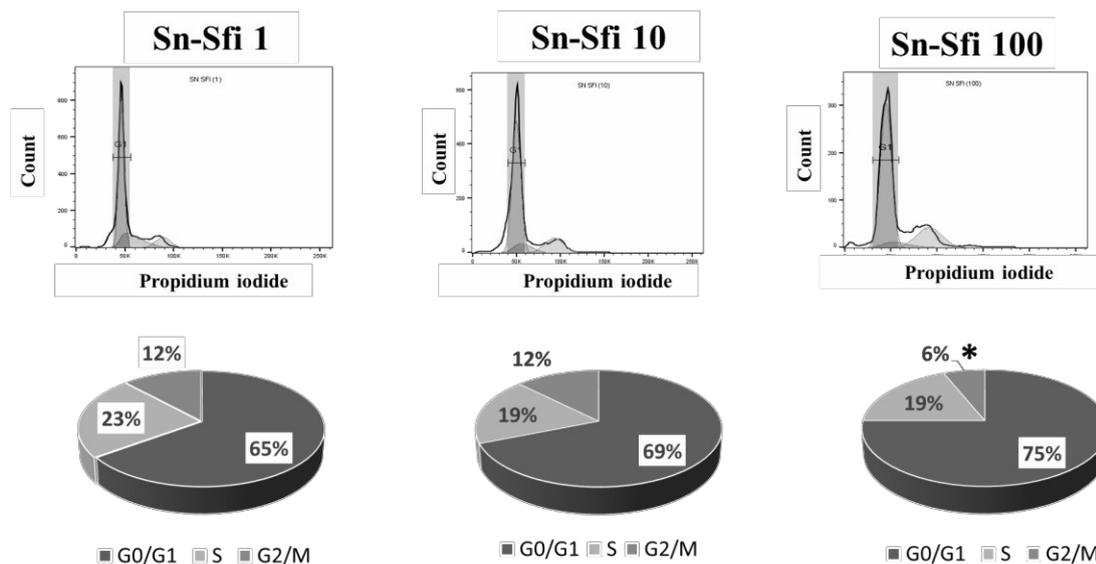
Polli and colleagues reported antitumor activities of supernatants of macrophages stimulated by jacaline, a lectin-like protein, obtained from the seeds of *Artocarpus integrifolia* plant. High rates of apoptosis of Human Colon Cancer cell line (HT-29) and Breast Cancer cell line (MCF-7) were observed after incubation with jacalin-stimulated macrophages supernatants, indicating that this macromolecule, when exerting pro-inflammatory activity, may change macrophages toward to an antitumor phenotype

(POLLI et al., 2016).

Evaluation of cell cycle

Figure 5. Cell cycle analysis of B16-F10 treated with supernatants of SP-stimulated macrophages.



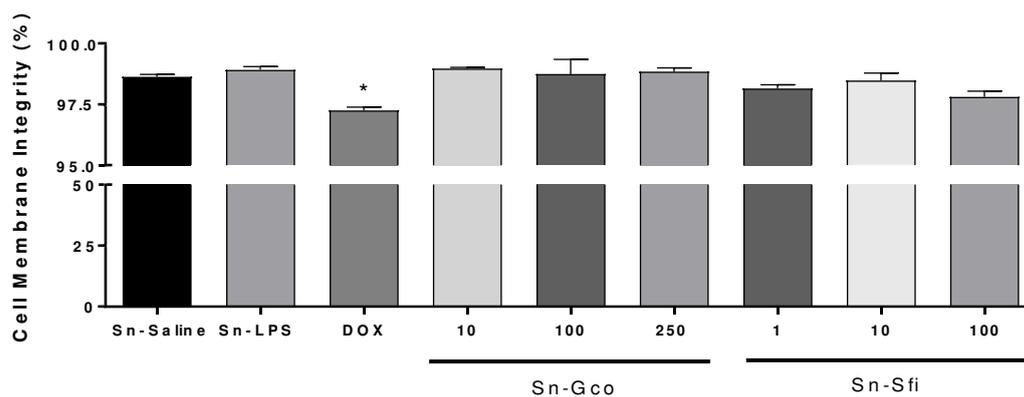


Effect of supernatant of macrophage stimulated with saline, lipopolysaccharide from *E. coli* (LPS) at 100 ng/mL, Gco-SP and Sfi-SP on the distribution of the cell cycle phases of murine melanoma cells treated for 48h. Doxorubicin (DOX) at 0.4 μ M was used as a positive control for this experiment. Distribution of the phases of the cycle calculated by the program. Division of the cell cycle phases in percentage. The values were obtained from experiment performed in triplicate. Data are presented as the mean \pm SEM values were analyzed by analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's post-test (* p <0.05), when compared with negative control (Sn-Saline).

In the evaluation of the cell cycle profile of B16-F10 cells treated with different supernatants of SP-stimulated macrophages, only Sn-Sfi 100 demonstrated to interfere in the cell cycle. The reduction of the percentage of B16-F10 cells at this stage of the cycle can be attributed to the pronounced antiproliferative effect of Sn-100. Indeed, Sn-Sfi 100 showed a percentage of inhibition around 17% in the SRB assay and the most reduction of the cell count in the flow cytometry assay. Since G2/M is a short duration phase of the cell cycle, the reduction of the cell count may be better perceived at this stage.

Evaluation of Membrane integrity

Figure 6. Membrane integrity of B16-F10 treated with supernatants of SP-stimulated macrophages.



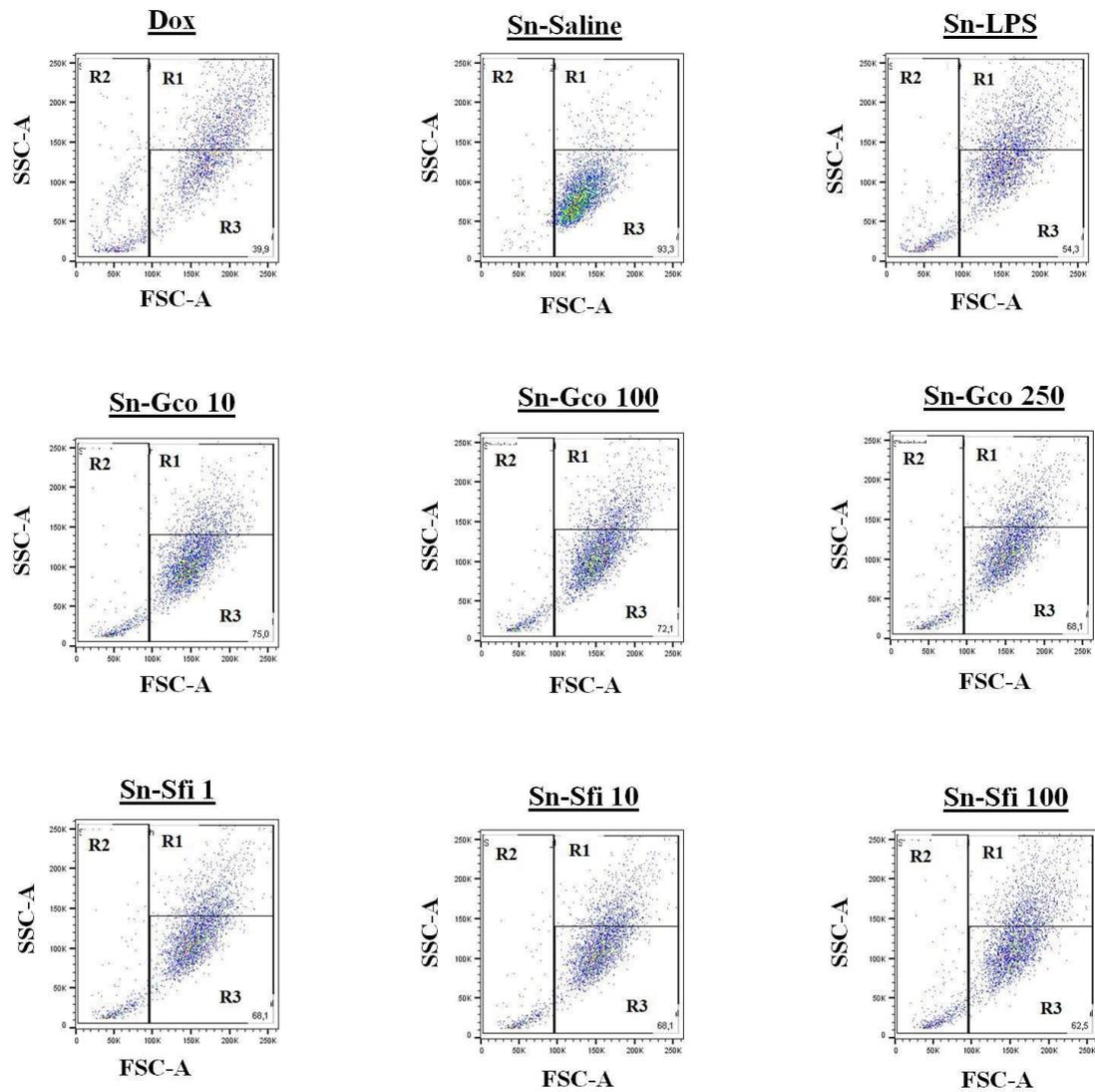
Effect of supernatants of macrophages treated with saline, lipopolysaccharide from *E. coli* (LPS) at 100 ng/mL, Gco-SP at 10, 100 and 250 $\mu\text{g/mL}$ or Sfi-SP at 1, 10 and 100 $\mu\text{g/mL}$ against B16-F10 cell line after 48h of treatment. Doxorubicin (DOX) at 0.4 μM was used as positive control of this experiment. The data were presented as mean values \pm SD, were analyzed by analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's post-test (* $p < 0.05$), when compared with negative control (Sn-Saline).

Evaluation of the membrane integrity percentage of B16-F10 revealed that none of the supernatants of macrophages treated with polysaccharides altered the percentage of membrane integrity of B16-F10 cells.

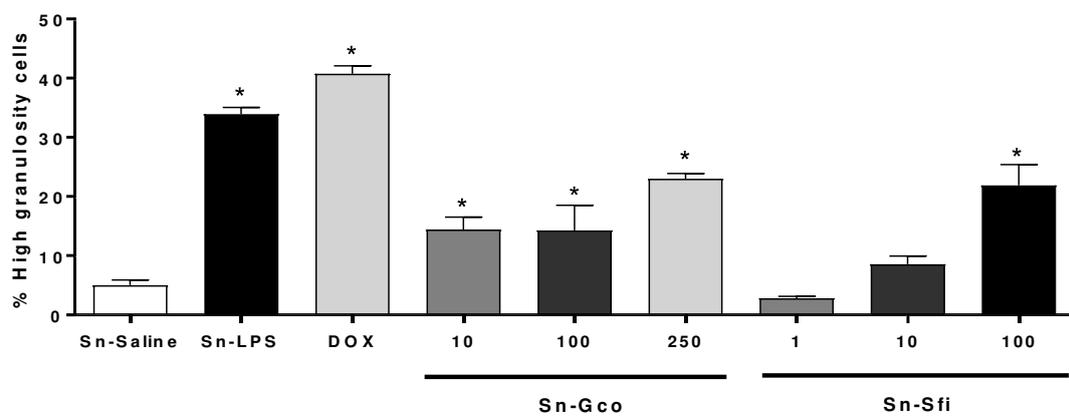
Evaluation of morphological changes

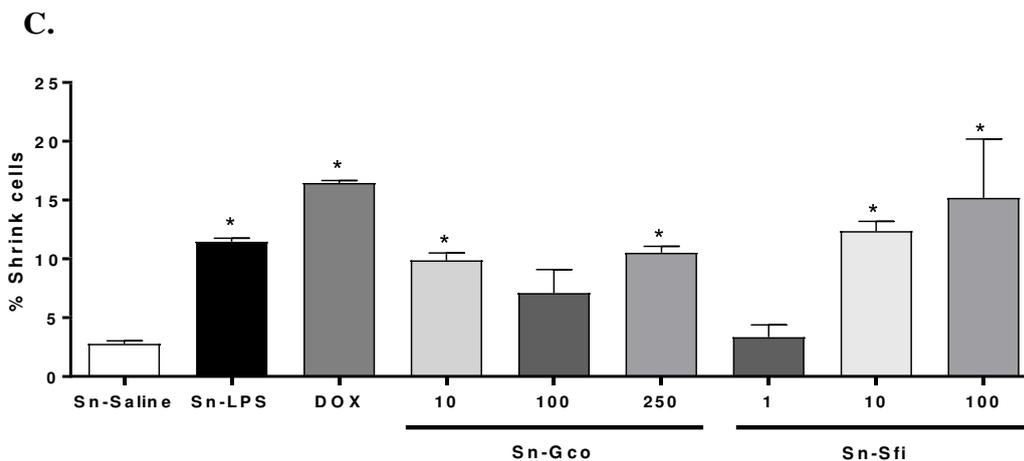
Figure 7. Morphological changes of murine metastatic melanoma B16-F10 treated for 48 h with supernatants of SP-stimulated macrophages by flow cytometry.

A



B.





A. Cells population displayed in Dotplots (R1, gate for shrink cells; R2, gate for high granularity cells and R3 gate for normal cells) **B.** Percentage of cells with high granularity. **C.** Percentage of shrink cells. The values of this experiment were performed in triplicate. The data were presented as mean values \pm SD and were analyzed by analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's post-test (* $p < 0.05$), when compared with negative control (Sn- Saline).

Investigation on the morphological changes revealed that B16 -F10 cells, when treated with Sn-Gco 10, 100 and 250 and Sn-Sfi 100, increased the percentage of granularity in relation to the negative control (Sn-Saline). In addition, Sn-Gco 10 and 250 and Sn-Sfi 10 and 100 also increased the percentage of shrank cells similarly to that exhibit by Sn-LPS and Dox.

Taken together, the increase in granularity associated with increased percentage of shrinkage and absence of damage in membrane of B16-F10 may suggest autophagy triggered by cell stress or early apoptosis (BOYA et al., 2013; KAMAL et al., 2014; KIRAZ et al., 2016). Further assays should be performed to determine the mechanism of antiproliferative activity of SP-stimulated macrophages supernatants.

Conclusion

In summary, we demonstrated for the first time that macrophages stimulated with SP derived *G. cornea* and *S. filiformis* depicted M1 phenotype *in vitro*. These macrophages produced substances, yet to be discovered, capable of inhibiting metastatic melanoma B16-F10 growth *in vitro*. In relation to SP derived from *G. birdiae*, these were not able to activate macrophages *in vitro*. Further assays would elucidate the mechanism of antiproliferative activity of macrophage supernatants activated by sulfated

polysaccharide from *G. cornea* and *S. filiformis*.

Acknowledgements

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTIC), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Laboratório de Carboidratos e Lectinas (CaboLec) and Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia Marinha (LaBBMar).

Conflict of interest statement

The authors declare no conflict of interest.

REFERÊNCIAS

- ACS. **American Cancer Society**, 2016. Disponível em: <<http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002550-pdf.pdf>>. Acesso em: 13 Jul. 2017.
- 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**, v. 167, n. 2, p. 195–205, 2012a.
- 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* Blackwell Publishing Ltd, , fev. 2012b. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2249.2011.04515.x>>. Acesso em: 21 jun. 2017.
- 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.
- ARMISEN, R. World-wide use and importance of *Gracilaria*. **Journal of Applied Phycology**, v. 7, n. 3, p. 231–243, 1995.
- ASSREUY, A. M. et al. Vascular effects of a sulfated polysaccharide from the red marine alga *Solieria filiformis*. **Nat Prod Commun**, v. 5, n. 8, p. 1267–1272, ago. 2010.
- BALKWILL, F. Tumour necrosis factor and cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 5, p. 361–371, 2009.
- BEDINI, E. et al. Title: A review of chemical methods for the selective sulfation and desulfation of polysaccharides a review of chemical methods for the selective sulfation and desulfation of polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, 2017.
- BEZERRA, A. F.; MARINHO-SORIANO, E. Cultivation of the red seaweed *Gracilaria birdiae* (*Gracilariales*, *Rhodophyta*) in tropical waters of northeast Brazil. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, n. 12, p. 1813–1817, 2010.
- BIXLER, H. J.; PORSE, H. A decade of change in the seaweed hydrocolloids industry. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 3, p. 321–335, 2011.
- BRITO, T. V. et al. Sulfated-polysaccharide fraction extracted from red algae *Gracilaria birdiae* ameliorates trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis in rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 66, n. 8, p. 1161–1170, mar. 2014.
- BROWN, E. M. et al. Seaweed and human health. **Nutrition Reviews**, v. 72, n. 3, p. 205–216, 2014.
- CAMPO, V. L. et al. Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis – A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, p. 167–180, 2009.

CHANMEE, T. et al. **Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment** *Cancers* Multidisciplinary Digital Publishing Institute, , 13 ago. 2014. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2072-6694/6/3/1670/>>. Acesso em: 1 jun. 2017.

CHAOYUAN R.WEN Z,DONG,L,ZHANG,J.HUANG,X WEI,S, W. L.; & LAN, G. Some aspects of the growth of *Gracilaria tennistipitata* in pond culture. **Hydrobiologia**, v. 260/261, p. 339–343, 1993.

CHOI, E.-M. et al. Immunomodulating Activity of Arabinogalactan and Fucoidan *In Vitro*. **Journal of Medicinal Food**, v. 8, n. 4, p. 446–453, 2005.

CIAN, R. E. et al. Proteins and carbohydrates from red seaweeds: Evidence for beneficial effects on gut function and microbiota. **Marine Drugs**, v. 13, n. 8, p. 5358–5383, 2015a.

CIAN, R. E. et al. **Proteins and carbohydrates from red seaweeds: Evidence for beneficial effects on gut function and microbiota** *Marine Drugs* Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 20 ago. 2015b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26308006>>. Acesso em: 6 jun. 2017.

COLEGIO, O. R. et al. Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. **Nature**, v. 513, n. 7519, p. 559–563, 13 jul. 2014.

CORDOVER, R. Seaweed Agronomy: Cropping in Inland Saline Groundwater Evaporation Basins: a Report for the Rural Industries Research and Development. 2007.

COSTA, L. S. et al. Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 64, n. 1, p. 21–28, 2010.

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**, v. 110, n. 4, p. 335–341, abr. 2012a.

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**, v. 110, n. 4, p. 335–341, abr. 2012b.

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. e0119319, 25 mar. 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, abr. 2017.

DA SILVA, A. M. T. et al. Shock and Multiple-Organ Dysfunction after Self-Administration of Salmonella Endotoxin. **New England Journal of Medicine**, v. 328, n. 20, p. 1457–1460, 20 maio 1993.

DANELLA POLLI, C. et al. Jacalin-Activated Macrophages Exhibit an Antitumor

Phenotype. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1–12, 2016.

DE ARAÚJO, I. W. F. et al. Effects of a sulfated polysaccharide isolated from the red seaweed *Solieria filiformis* on models of nociception and inflammation. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 3, p. 1207–1215, 2011.

DE JESUS RAPOSO, M. F.; DE MORAIS, A. M. B.; DE MORAIS, R. M. S. C. Marine polysaccharides from algae with potential biomedical applications. **Marine Drugs**, v. 13, n. 5, p. 2967–3028, 2015.

DE OLIVEIRA FERNANDES, F. et al. Effect of fertilization pulses on the production of *Gracilaria birdiae* seedlings under laboratory and field conditions. **Journal of Applied Phycology**, v. 29, n. 2, p. 695–705, 2016.

DE SOUSA OLIVEIRA VANDERLEI, E. et al. The involvement of the HO-1 pathway in the anti-inflammatory action of a sulfated polysaccharide isolated from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. **Inflammation Research**, v. 60, n. 12, p. 1121–1130, 2011.

DELATTRE, C.; FENORADOSOA, T. A.; MICHAUD, P. Galactans: an overview of their most important sourcing and applications as natural polysaccharides. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 6, p. 1075–1092, dez. 2011.

EL ENSHASY, H. A.; HATTI-KAUL, R. **Mushroom immunomodulators: Unique molecules with unlimited applications** **Trends in Biotechnology**, 2013. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0167779913002023/1-s2.0-S0167779913002023main.pdf?_tid=e3a1f59c-47c1-11e7-9ff30000aab0f01&acdnat=1496428553_232465e4746acdbb8065ab9c63f49674>. Acesso em: 2 jun. 2017.

FANG, W. et al. Tumor-associated macrophages promote the metastatic potential of thyroid papillary cancer by releasing CXCL8. **Carcinogenesis**, v. 35, n. 8, p. 1780–1787, ago. 2014.

FEDOROV, S. N. et al. Anticancer and cancer preventive properties of marine polysaccharides: Some results and prospects. **Marine Drugs**, v. 11, n. 12, p. 4876–4901, 2013.

FERREIRA, S. S. et al. Structure-function relationships of immunostimulatory polysaccharides: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 132, p. 378–396, 2015.

GANESAN, M.; SAHU, N.; ESWARAN, K. Raft culture of *Gracilaria edulis* in open sea along the south-eastern coast of India. **Aquaculture**, v. 321, n. 1–2, p. 145–151, 2011.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131–138, 1982.

GURPILHARES, D. DE B. et al. “Algae’s sulfated polysaccharides modifications: Potential use of microbial enzymes”. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 8, p. 989–998, 2016.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer Review evolve

progressively from normalcy via a series of pre. **Cell**, v. 100, p. 57–70, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. 1-s2.0-S0092867411001279-main. **Cell**, v. 144, p. 646–674, 2011.

HANSEN, J. M.; COLEMAN, R. L.; SOOD, A. K. **Targeting the tumour microenvironment in ovarian cancer** **European Journal of Cancer**, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2015.12.016>>. Acesso em: 1 jun. 2017.

HU, Y. et al. Fucoidin enhances dendritic cell-mediated T-cell cytotoxicity against NY-ESO-1 expressing human cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 392, n. 3, p. 329–334, 2010.

JAZZARA, M. et al. Anti-Proliferative Activity of λ -Carrageenan Through the Induction of Apoptosis in Human Breast Cancer Cells. **Iran J Cancer Prev**, v. 9, n. 4, 2016.

KALASARIYA, H. S. et al. A Review on Nutritional Facts of Seaweeds. **The International Journal of Chemical Sciences ad Technology**, v. 1, n. 3, p. 27–32, 2016.

KIM, J.; BAE, J. S. Tumor-associated macrophages and neutrophils in tumor microenvironment. **Mediators of Inflammation**, v. 2016, p. 11, 2016.

KWON, M. J.; NAM, T. J. A polysaccharide of the marine alga *Capsosiphon fulvescens* induces apoptosis in AGS gastric cancer cells via an IGF-IR-mediated PI3K/Akt pathway. **Cell Biology International**, v. 31, n. 8, p. 768–775, 2007.

LEE, J. S. et al. Mechanism of macrophage activation induced by polysaccharide from *Cordyceps militaris* culture broth. **Carbohydrate Polymers**, v. 120, p. 29–37, 2015.

LEE, W. K. et al. Factors affecting yield and gelling properties of agar. **Journal of Applied Phycology**, p. 1–14, 2016.

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, 20 mar. 2013.

LI, Y. Y. et al. Anti-inflammatory activities of cardamonin from *Alpinia katsumadai* through heme oxygenase-1 induction and inhibition of NF- κ B and MAPK signaling pathway in the carrageenan-induced paw edema. **International Immunopharmacology**, v. 25, n. 2, p. 332–339, 2015.

LIANG, W. et al. Effects of sulfate group in red seaweed polysaccharides on anticoagulant activity and cytotoxicity. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, n. 1, p. 776–785, 2014.

LIN, H.; QIN, S. **Tipping points in seaweed genetic engineering: Scaling up opportunities in the next decade** **Marine Drugs** Multidisciplinary Digital Publishing Institute, , 22 maio 2014. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1660-3397/12/5/3025/>>. Acesso em: 20 jun. 2017.

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**, v. 29, n. 1, p. 20–26, 2009.
- LIU, C.-Y. et al. M2-polarized tumor-associated macrophages promoted epithelial–mesenchymal transition in pancreatic cancer cells, partially through TLR4/IL-10 signaling pathway. **Laboratory Investigation**, v. 93, n. 7, p. 844–854, 2013.
- LUO, M. et al. Antitumor and Adjuvant Activity of λ -carrageenan by Stimulating Immune Response in Cancer Immunotherapy. **Scientific Reports**, v. 5, p. 11062, 2015.
- MACIEL, J. S. et al. Structural characterization of cold extracted fraction of soluble sulfated polysaccharide from red seaweed *Gracilaria birdiae*. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, n. 4, p. 559–565, 2008.
- MAEDA, R. et al. Immunostimulatory Activity of Polysaccharides Isolated from *Caulerpa lentillifera* on Macrophage Cells. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 76, n. 3, p. 501–505, 2012.
- MANTOVANI, A. et al. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. **Nature Reviews Clinical Oncology**, 2017.
- MANTOVANI, A.; VECCHI, A.; ALLAVENA, P. Pharmacological modulation of monocytes and macrophages. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 17, n. 1, p. 38–44, 2014.
- MARKS, D. L.; OLSON, R. LO; FERNANDEZ-ZAPICO, M. E. Epigenetic control of the tumor microenvironment. **Epigenomics**, v. 8, n. 12, p. 1671–1687, dez. 2016.
- MARTINEZ, F. O.; GORDON, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. **F1000Prime Reports**, v. 6, n. March, p. 1–13, 2014.
- MATOS, J. et al. Experimental integrated aquaculture of fish and red seaweeds in Northern Portugal. **Aquaculture**, v. 252, n. 1, p. 31–42, 2006.
- MELO, M. Isolation and characterization of soluble sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria cornea*. **Carbohydrate Polymers**, v. 49, n. 4, p. 491–498, 1 set. 2002.
- MELO, M. R. S. et al. Isolation and characterization of soluble sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria cornea*. **Carbohydrate Polymers**, v. 49, n. 4, p. 491–498, 2002.
- MICHALAK, I.; CHOJNACKA, K. Algae as production systems of bioactive compounds. **Engineering in Life Sciences**, v. 15, n. 2, p. 160–176, 2015.
- MILLS, C. M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease. **Critical Reviews in Immunology**, v. 32, n. 6, p. 463–488, 2012.
- 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**, v. 10, n. 6, p. 460–460, 2010.
- MOURÃO, P. Perspective on the Use of Sulfated Polysaccharides from Marine Organisms as a Source of New Antithrombotic Drugs. **Marine Drugs**, v. 13, n. 5, p. 2770–2784, 2015.
- 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.
- NAKAMURA, T. et al. Fucoidan induces nitric oxide production via p38 mitogen-activated protein kinase and NF- κ B-dependent signaling pathways through macrophage scavenger receptors. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 343, n. 1, p. 286–294, 2006.
- NICOLETTI, I. et al. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Journal of Immunological Methods**, v. 139, p. 271–279, 1991.
- NORTHCOTT, J. M. et al. **Fighting the force: Potential of homeobox genes for tumor microenvironment regulation** *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 2015. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0304419X15000190/1-s2.0-S0304419X15000190-main.pdf?_tid=3bf88bae-57a6-11e7-ba2900000aacb35e&acdnat=1498175894_417c5e685d22ba52bc1096f615e8c7d6>. Acesso em: 22 jun. 2017.
- OLDHAM, R. K. Cancer Biotherapy: More Than Immunotherapy. **Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals**, v. 32, n. 4, p. 111–114, 2017.
- PÉREZ-RECALDE, M. et al. In vitro and in vivo immunomodulatory activity of sulfated polysaccharides from red seaweed *Nemalion helminthoides*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 63, p. 38–42, 2014.
- PLASTINO, E. M.; OLIVEIRA, E. C. *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta), a new species from the tropical South American Atlantic with a terete frond and deep spermatangial conceptacles. **Phycologia**, v. 41, n. 4, p. 389–396, 2002.
- PORSE, H.; RUDOLPH, B. The seaweed hydrocolloid industry: 2016 updates, requirements, and outlook. **Journal of Applied Phycology**, 2017.
- PRASEDYA, E. S. et al. Carrageenan delays cell cycle progression in human cancer cells in vitro demonstrated by FUCCI imaging. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, p. 270, 2016a.

PRASEDYA, E. S. et al. Carrageenan delays cell cycle progression in human cancer cells in vitro demonstrated by FUCCI imaging. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, p. 270, 2016b.

PYONTECK, S. M. et al. CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression. **Nature Medicine**, v. 19, n. 10, p. 1264–1272, 2013.

RHEIN-KNUDSEN, N.; ALE, M. T.; MEYER, A. S. **Seaweed hydrocolloid production: An update on enzyme assisted extraction and modification technologies** *Marine Drugs* Multidisciplinary Digital Publishing Institute, , 27 maio 2015. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1660-3397/13/6/3340/>>. Acesso em: 22 jun. 2017.

ROBLEDO, D.; FREILE-PELEGRÍN, Y. Prospects for the cultivation of economically important carrageenophytes in Southeast Mexico. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 3, p. 415–419, 2011.

RODRIGUES, J. A. G. et al. Isolamento, fracionamento e atividade anticoagulante de iota-carragenanas da *Solieria filiformis*. **Ciência Rural**, v. 40, n. 11, p. 2310–2316, nov. 2010.

RUOCCO, N. et al. **Polysaccharides from the Marine Environment with Pharmacological, Cosmeceutical and Nutraceutical Potential** *Molecules (Basel, Switzerland)* Multidisciplinary Digital Publishing Institute, , 27 abr. 2016. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1420-3049/21/5/551>>. Acesso em: 8 jul. 2017.

SANTELICES, B.; WESTERMEIER, R.; BOBADILLA, M. Effects of stock loading and planting distance on the growth and production of *Gracilaria chilensis* in rope culture. **Journal of Applied Phycology**, v. 5, n. 5, p. 517–524, 1993.

SEEDEVI, P. et al. Bioactive potential and structural characterization of sulfated polysaccharide from seaweed (*Gracilaria corticata*). **Carbohydrate Polymers**, v. 155, p. 516–524, 2017.

SHANNON, E.; ABU-GHANNAM, N. Antibacterial derivatives of marine algae: An overview of pharmacological mechanisms and applications. **Marine Drugs**, v. 14, n. 4, 2016.

SICA, A. et al. Macrophage polarization in pathology. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 2015.

SILVA, R. O. et al. A sulfated-polysaccharide fraction from seaweed *Gracilaria birdiae* prevents naproxen-induced gastrointestinal damage in rats. **Marine Drugs**, v. 10, n. 12, p. 2618–2633, 22 nov. 2012.

SKEHAN, P., STORENG, R., SCUDIERO, D., MONKS, A., MCMAHON, J., VISTICA, D., WARREN, J.T., BOKESCH, H., KENNEY, S., BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anti- cancer-drug screening. **Journal of National Cancer Institute**, v. 82, p. 1107, 1990.

- SOUSA, W. M. et al. Sulfated polysaccharide fraction from marine algae *Solieria filiformis*: Structural characterization, gastroprotective and antioxidant effects. **Carbohydrate Polymers**, v. 152, p. 140–148, 2016.
- SOUZA, B. W. S. et al. Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. **Food Hydrocolloids**, v. 27, n. 2, p. 287–292, 2012a.
- SOUZA, B. W. S. et al. Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. **Food Hydrocolloids**, v. 27, n. 2, p. 287–292, jun. 2012b.
- SOUZA, R. B. et al. Analysis of two precipitation methods on the yield, structural features and activity of sulfated polysaccharides from <i>Gracilaria cornea</i> (Rhodophyta). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 37, n. 1, p. 31, 10 mar. 2015.
- SOUZA, R. B. et al. Neuroprotective Effects of Sulphated Agar from Marine Alga *Gracilaria cornea* in Rat 6-Hydroxydopamine Parkinson's Disease Model: Behavioural, Neurochemical and Transcriptional Alterations. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 120, n. 2, p. 159–170, fev. 2016.
- STEPHANIE, B. et al. Carrageenan from *Solieria chordalis* (Gigartinales): Structural analysis and immunological activities of the low molecular weight fractions. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, n. 2, p. 448–460, jun. 2010.
- SUN, T. et al. Inhibition of Tumor Angiogenesis by Interferon- γ by Suppression of Tumor-Associated Macrophage Differentiation. **Oncology research**, v. 21, p. 227–35, 2014.
- TAKEDA, K. et al. Anti-tumor activity of fucoidan is mediated by nitric oxide released from macrophages. **International Journal of Oncology**, v. 40, n. 1, p. 251–260, 2012.
- TANIGUCHI, K. et al. Essential Role of Lysophosphatidylcholine Acyltransferase 3 in the Induction of Macrophage Polarization in PMA-Treated U937 Cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 116, n. 12, p. 2840–2848, dez. 2015.
- TRA, T. D. et al. **The culture of *Gracilaria verrucosa* in Tam Giang Lagoon, Thua Thien Hue Province, S.R. Vietnam** Madras (India), , 1989. Disponível em:
- <<http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=XF2016018229>>. Acesso em: 22 jun. 2017.
- TRONO, G. C. J. (PHILIPPINES U. . Q. C. (PHILIPPINES). M. S. I. . **Present status of *Gracilaria* culture**, 1989. Disponível em: <<http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=XF9216397>>. Acesso em: 22 jun. 2017.
- USOV, A. I. Polysaccharides of the red algae. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 65, p. 115–217, 2011.

VANDERLEI, E. S. O., O. et al. Structural features, molecular weight and anti-HSV activity of sulfated polysaccharides from three red seaweeds. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 7, p. 164–170, 2016.

VASCOSCELOS, A. G.; ARAÚJO, K. V. D.; SANTANA, L. DE A. B. Polissacarídeos Extraídos De Algas Marinhas E Suas Aplicações Biotecnológicas: Uma Revisão. **Revista Brasileira De Inovação Tecnológica em Saúde**, p. 27–51, 2015.

VINOGRADOV, S.; WARREN, G.; WEI, X. Macrophages associated with tumors as potential targets and therapeutic intermediates. **Nanomedicine**, v. 9, n. 5, p. 695–707, 2014.

WANG, L. et al. **Overview on biological activities and molecular characteristics of sulfated polysaccharides from marine green algae in recent years** *Marine Drugs* Multidisciplinary Digital Publishing Institute, , 25 set. 2014. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1660-3397/12/9/4984/>>. Acesso em: 11 maio. 2017.

WASSER, S. Medicinal mushroom science: Current perspectives, advances, evidences, and challenges. **Biomedical Journal**, v. 37, n. 6, p. 345, 2014.

WIVIANNE, I. et al. Iota-carrageenans from *Solieria filiformis* (Rhodophyta) and their effects in the inflammation and coagulation. **Maringá**, v. 34, n. v, p. 127–135, 2012.

YANG, L.; ZHANG, Y. Tumor-associated macrophages: from basic research to clinical application. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 10, n. 1, p. 58, 2017.

YENDE, S. R.; HARLE, U. N.; CHAUGULE, B. B. Therapeutic potential and health benefits of *Sargassum* species. **Pharmacognosy reviews**, v. 8, n. 15, p. 1–7, jan. 2014.

ZELOVÁ, H.; HOŠEK, J. TNF- α signalling and inflammation: Interactions between old acquaintances. **Inflammation Research**, v. 62, n. 7, p. 641–651, 2013.

ZONG, A.; CAO, H.; WANG, F. **Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research** *Carbohydrate Polymers* Elsevier Ltd., , 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.07.026>>