



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

RENNATA SÃO PAIO DE AZEREDO ESTEVES

**AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS POR ALFA-QUITOSANAS
SULFATADAS MICROESTRUTURADAS**

FORTALEZA

2018

RENNATA SÃO PAIO DE AZEREDO ESTEVES

**AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS POR ALFA-QUITOSANAS
SULFATADAS MICROESTRUTURADAS**

Monografia apresentada à coordenação do curso de Ciências Biológicas do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção de título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Diego Veras Wilke.

FORTALEZA

2018

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

- E84a Esteves, Rennata São Paio de Azeredo.
Avaliação da ativação de macrófagos por alfa-quitosanas sulfatadas microestruturadas / Rennata São Paio de Azeredo Esteves. – 2018.
52 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2018.
Orientação: Prof. Dr. Diego Veras Wilke.
Coorientação: Prof. Me. Felipe Barros Teles.
1. Atividade Imunoestimulante. 2. Micropartículas. 3. Quitosanas Sulfatadas. 4. Macrófagos. I. Título.
CDD 570
-

RENNATA SÃO PAIO DE AZEREDO ESTEVES

**AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS POR ALFA-QUITOSANAS
SULFATADAS MICROESTRUTURADAS.**

Monografia apresentada à coordenação do curso de Ciências Biológicas do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção de título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Diego Veras Wilke.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

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

MSc. Felipe Barros Teles (Coorientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Roberto Nicolete
Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)

Prof. Dr. Lucas de Lima Nogueira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

*Aos meus tios Sandra Lúcia Soares Esteves (in memoriam)
e Paulo Roberto São Paio de Azeredo (in memoriam)*

*“We keep moving forward, opening new doors,
and doing new things, because we’re curious
and curiosity keeps leading us down new paths.”*

Walt Disney

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pela força para concluir esse trabalho, mesmo com todas as limitações.

A **Rita São Paio** e **Sergio Esteves**, meus pais, por me darem a vida e sempre me ensinarem que a melhor herança que eu posso ter é o conhecimento, por me apoiarem em todas as circunstâncias, pelo amor incondicional. Por terem me proporcionado uma excelente base escolar e por me darem condições de aproveitar as oportunidades na Universidade da melhor maneira possível. Por serem meus maiores exemplos de dedicação, força e honestidade.

À **Monnique São Paio**, minha irmã e bibliotecária, não só pela participação direta no trabalho na revisão textual e auxílio nas dúvidas de formatação, mas também pelo apoio, paciência e companheirismo em todos os momentos. Por estar sempre disponível e disposta a ajudar. Por torcer pelas minhas conquistas.

Ao Professor Dr. **Diego Veras Wilke**, por toda a orientação, pelo enorme conhecimento repassado e pela vontade em formar cientistas de excelência. Por acreditar no meu potencial para concluir esse trabalho e por todas as sugestões e contribuições.

Ao Mestre **Felipe Barros**, meu coorientador, por novos ensinamentos todos os dias, por toda a paciência em acompanhar meus primeiros passos em uma, até então, totalmente nova experiência para mim. Pela instrução em inúmeros experimentos, pela preocupação, por sempre pesquisar e responder minhas perguntas curiosas. Por ser um exemplo de disciplina.

À Mestre **Alexia Assef**, pela paciência em me instruir em tantos experimentos, análises estatísticas, procedimentos do dia a dia. Por ser minha referência de mulher pesquisadora, por me inspirar a sempre querer conhecer mais, pela dedicação. Também, pelos momentos de descontração com fotos da Dori.

À Professora Dra. **Nágila Ricardo** e à Mestre **Denise Ramos**, pelo cuidado e produção das amostras sulfatadas e encapsuladas, e por tirarem nossas dúvidas em relação ao assunto.

A todos os integrantes do LaBBMar (Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia Marinha): **Maísa, Clara, Keilla, Laura, Evelline, Rhaynan, Thaís, Katharine, Erlânia, Elthon, Matheus** e **Kayanny**, pelos momentos de descontração, pela convivência diária e por serem pacientes ao responderem todas as minhas dúvidas.

A todos os meus amigos do Farias Brito, em especial **Arthur, Bianca, Caio** e **Pedro** por serem companhias de estudo desde a época do colégio e, agora que seguimos carreiras diferentes, por serem uma válvula de escape para a vida estressante na faculdade. Por sempre escutarem minhas reclamações e por serem inspirações de pessoas com foco e determinação enormes.

Às minhas cast amigas: **Barbara, Carolina, Danielle, Elisa, Gabriela, Leticia, Luara, Maria**

Luiza, Pietra, Valentina e Victoria, por serem grandes motivadoras, por ouvirem todos os meus problemas, por serem conforto, por darem ao meu cérebro cansado muitas memórias boas para lembrar em momentos de crise e por trazerem mágica para a minha vida.

À **Malu Reis**, minha companheira de sala de aula e de tantos grupos de trabalho, por todos os ensinamentos sobre a vida, por me inspirar a ser mais dedicada e organizada, porém leve e feliz acima de tudo.

À **Raquel Sá**, minha psicóloga, por me tornar capaz de lidar com as frustrações e superar as dificuldades. Por me ajudar a achar o que faz sentido pra mim, por me ensinar que minha saúde mental é mais importante que qualquer realização profissional e por me lembrar a ser mais gentil comigo mesma e comemorar todas as minhas conquistas.

Ao **Nicholas Harris**, meu namorado, por ser presente mesmo estando em outro continente, pelas flores inesperadas, por acreditar em mim, por todas as palavras de motivação. Por ser também meu psicólogo e me ouvir nos momentos felizes e nos difíceis, pela ajuda no abstract. Por contar milhares de piadas quando eu fico triste e só parar quando eu rir. Por me fazer feliz. A todos os amigos da Urbana, por fazerem um bem enorme para a minha saúde mental, além de sempre me motivarem a oxigenar o cérebro da melhor forma possível, com muita dança, suor e risadas.

Aos demais familiares e amigos, em especial meu tio **Adilson Soares**, pelo apoio e por sempre estarem torcendo pelo meu sucesso.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para esse trabalho, obrigada!

RESUMO

Diversas estratégias terapêuticas desencadeiam efeitos colaterais indesejados que aumentam que aumentam o grau de evasão de pacientes aos tratamentos. Nesse contexto, a procura de substâncias com baixa ou nenhuma toxicidade e que sejam capazes de estimular o sistema imunológico de indivíduos, conhecidas como Modificadores da Resposta Biológica (MRB), é de grande relevância para o sucesso terapêutico. Os macrófagos (Mφs) possuem uma alta plasticidade fenotípica, exibindo um amplo espectro de perfis funcionais, a depender dos sinais do ambiente no qual estão localizados. Nos extremos desse espectro, estão o fenótipo antitumoral (semelhantes a M1) e o pró-tumoral (semelhantes a M2). Polissacarídeos, como as quitosanas, vêm sendo estudados ultimamente como potenciais substâncias imunoestimulantes. Além disso, a quitosana também apresenta melhora na entrega de fármacos devido às suas propriedades favoráveis como a biocompatibilidade, biodegradabilidade e atoxicidade. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial imunoestimulante de partículas de alfa-quitosana na ativação de macrófagos RAW264.7 para um perfil semelhante ao M1. As amostras de Quitosana Sulfatada Estruturadas (QSE) foram testadas em relação ao seu efeito citotóxico e à avaliação do potencial imunoestimulante de macrófagos pela produção de Óxido Nítrico e citocinas liberadas após a ativação. Os testes também foram comparativos com as amostras de Quitosana Neutra (QN), Quitosana Neutra Estruturada (QNE) e Quitosana Sulfatada (QS) não estruturada. Nenhuma das amostras apresentou citotoxicidade, porém, estudos *in vitro* sugerem que QS e QSE possuem potencial imunoestimulante, induzindo macrófagos a produzir Óxido Nítrico e Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α). Uma proliferação estimulada por contato com QS e QSE em até aproximadamente 45% foi relatada. As médias dos resultados da produção de nitrito induzidas por 300 $\mu\text{g/mL}$ de QS e QSE foram entre 11 e 14 μM de Nitrito respectivamente, pouco menos que o LPS (aproximadamente 16 μM). As amostras de QS e QSE induziram produção de TNF- α em quantidade entre 17 e 24 ng/mL , já o LPS, em 44 ng/mL . Em conjunto, os resultados obtidos representam os primeiros passos para a funcionalização de partículas de quitosanas sulfatadas em diversas aplicações farmacológicas, principalmente como sistemas de entrega de fármacos e adjuvante terapêuticos.

Palavras-chave: Atividade Imunoestimulante. Micropartículas. Quitosanas Sulfatadas, macrófagos.

ABSTRACT

Several therapeutic strategies lead to unwanted side effects that increase patients' avoidance of treatment degree. In this context, the search for substances with low or nil toxicity that are capable of stimulating the individuals' immune system, known as Biological Response Modifiers (BRM), is very important for therapeutic success. Macrophages (M ϕ s) have a high phenotypical plasticity, displaying a broad spectrum of functional profiles, dependant on environmental signals from which they are localized. Located within the extreme sides of the spectrum is the Antitumor Phenotype (M1-like) and the Protumor Phenotype (M2-like). Polysaccharides, like chitosans, have been recently deliberated as potent immunostimulant substances. Moreover, chitosan also escalations drug delivery because of its beneficial properties encapsulated within biocompatibility, biodegradability and atoxicity. The objective of this study was to evaluate the immunostimulatory potential of alpha-chitosan particles on the RAW264.7 macrophages activation to a M1-like profile. The Structured Sulfate Chitosan (QSE) samples were tested regarding to its cytotoxic effect and its immunostimulatory potential on macrophages by their Nitric Oxide production and cytokines released after activation. The assays were also comparative with the Neutral Chitosan (QN), Structured Neutral Chitosan (QNE) and non-structured Sulfate Chitosan (QS) samples. None of the samples presented cytotoxicity, however, *in vitro* assays suggest that QS and QSE have an immunostimulating potential, inducing macrophages to produce Nitric Oxide and Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α). A cell proliferation stimulated by contact with QS and QSE in up to approximately 45% has been reported. The average of the nitrite production results induced by 300 μ g/mL of QS and QSE were between 11 and 14 μ M of Nitrite respectively, slightly less than LPS (approximately 16 μ M). The QS and QSE samples induced TNF- α production in an amount between 17 and 24 ng/mL, and the LPS in 44 ng/mL. Together, the results obtained represent the first steps to the functionalization of sulfate chitosan particles in several pharmacological applications, particularly as delivery systems and therapeutic adjuvant.

Keywords: Immunostimulatory activity. Microparticles. Sulfated Chitosans. macrophages.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Número de publicações sobre polissacarídeos sulfatados com atividade antitumoral entre os anos 1974 e 2017.....	11
Figura 2	Planejamento experimental do presente trabalho.....	22
Figura 3	Fotomicrografias de macrófagos RAW264.7 tratados com amostras de Quitosana Sulfatada Estruturada (QSE) e Quitosana Sulfatada (QS) nas concentrações de 30, 100 e 300 µg/mL, salina e LPS para controles negativo e positivo, respectivamente.....	30
Figura 4	Efeito proliferativo em macrófagos murinos (RAW264.7) estimulados <i>in vitro</i> com 1, 3, 10, 30, 100 e 300 µg/mL de QS (A) ou QSE (B).....	31
Figura 5	Deteção da produção de nitrito no MC de macrófagos murinos (RAW264.7) estimulados <i>in vitro</i> com salina (C-), 100ng/mL de LPS, 1, 3, 10, 30, 100 e 300 µg/mL de QS, QSE, QN e QNE ou 250 µg/mL de sulfato.....	32
Figura 6	Produção de TNF-α por macrófagos murinos (RAW264.7) estimuados <i>in vitro</i> com salina (C-), 100 ng/mL de LPS ou 100 µg/mL das amostras de QS e QSE após 24h de tratamento.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CSF	Fator Estimulador de Colônias de Células
IL-1 β	Interleucina 1beta
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
MC	Meio Condicionado
MRB	Modificadores de Resposta Biológica
NK	Células Assassinas Naturais
NO	Óxido Nítrico
QN	Quitossana Neutra
QNE	Quitossana Neutra Estruturada
QS	Quitossana Sulfatada
QSE	Quitossana Sulfatada Estruturada
RAW264.7	Linhagem de Macrófagos Murinos
TAMs	Macrófagos Associados ao Tumor
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	MODIFICADORES DA RESPOSTA BIOLÓGICA	10
1.2	A QUITOSANA E SUAS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS	11
1.3	SULFATAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS	13
1.4	MACRÓFAGOS COMO MODELO PARA EXPERIMENTOS IN VITRO	14
1.5	MÉTODOS DE DELIVERY	16
1.6	RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	18
2	OBJETIVOS	21
2.1	OBJETIVO GERAL	21
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3	MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	22
3.2	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	23
3.3	LINHAGEM CELULAR	23
3.3.1	Cultivo celular	23
3.4	ASPECTOS MORFOLÓGICOS DA RAW264.7 NOS ENSAIOS IN VITRO	24
3.5	ATIVIDADE CITOTÓXICA	24
3.5.1	Ensaio da Sulforodamina B	24
3.6	ESTUDO DA ATIVIDADE IMUNOESTIMULATÓRIA	26
3.6.1	Ensaio de Griess	26
3.6.2	Dosagem de citocinas por ELISA	27
4	RESULTADOS	29
4.1	ANÁLISE DA MORFOLOGIA DAS CÉLULAS RAW264.7	29
4.2	ESTUDO DA CITOTOXICIDADE DAS QUITOSANAS SULFATADAS EM MACRÓFAGOS RAW264.7	30
4.3	ESTUDO DO POTENCIAL IMUNOESTIMULATÓRIO	31
4.3.1	Produção de Óxido Nítrico	32
4.3.2	Liberação de citocinas	32
5	DISCUSSÃO	34
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
7	REFERÊNCIAS	41

1 INTRODUÇÃO

1.1 MODIFICADORES DA RESPOSTA BIOLÓGICA

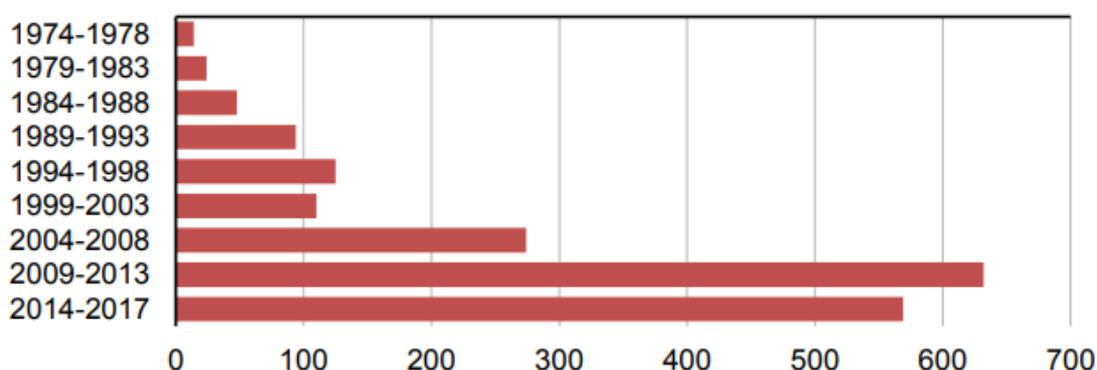
Agentes capazes de interagir com o sistema imunológico, aumentando ou reduzindo a resposta imune do indivíduo são denominados imunomoduladores (SHARMA et al., 2017). Quando atuam estimulando ou substituindo a função de um ou mais componentes do sistema imune, os imunomoduladores são denominados imunoestimulantes. Os compostos imunoestimulantes, por sua vez, podem ser classificados em duas categorias: i) imunoestimulantes específicos, quando promovem resposta imune antígeno-específica. Exemplo: imunógenos e vacinas e ii) imunoestimulantes não-específicos, quando aumentam a resposta imune do hospedeiro sem haver especificidade antigênica. Exemplo: citocinas e adjuvantes (Kuroki et al., 2012).

Alguns fármacos imunoestimulantes induzem respostas imunes humorais, celulares ou ambas contra infecções bacterianas ou virais, doenças que produzem imunodeficiência, e também contra o câncer (SHAHBAZI; BOLHASSANI, 2016). Apesar disso, esses agentes exibem diversos efeitos colaterais que limitam seu uso. O fármaco levamisol, por exemplo, foi sintetizado originalmente como anti-helmíntico, mas parece restaurar a função imune deprimida de linfócitos B, linfócitos T, monócitos e macrófagos. Do mesmo modo, o antiviral isoprinosina, utilizado para o tratamento de infecções causadas pelo vírus do herpes simples, aumenta a produção de citocinas, como: IL-1, IL-2 e IFN- γ . Não obstante, existem relatos de que esses fármacos causam manifestações alérgicas, náuseas, dores musculares, depressão menor, aumento de ácido úrico no sangue e na urina e outros efeitos adversos (PATIL; JAYDEOKAR; BANDAWANE, 2012).

Nos últimos anos, polissacarídeos com atividade imunomestimulante tem sido obtidos de diferentes organismos. Dois polissacarídeos do tipo β -glucano: o esquizofilano de *Schizophyllum commune* e o polissacarídeo conjugado a proteínas Krestin (PSK) de *Coriolus versicolor* foram introduzidos com sucesso no mercado nutracêutico e farmacêutico de vários países asiáticos como modificadores da resposta biológica (MRB) com base na capacidade de restaurar ou melhorar as respostas imunes em modelos *in vitro* e *in vivo* (EL ENSHASY; HATTI-KAUL, 2013). De modo semelhante, polissacarídeos oriundos 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; HARLE; CHAUGULE, 2014). Polissacarídeos tem atraído atenção na área biomédica devido ao seu amplo espectro de

propriedades terapêuticas e toxicidade relativamente baixa (DENG et al., 2018; MORÁN-SANTIBAÑEZ et al., 2016; PAULSEN, 2001; TZIANABOS, 2000). A Figura 1 mostra a quantidade de publicações sobre polissacarídeos sulfatados com atividade antitumoral ao decorrer dos anos.

Figura 1: Número de publicações sobre polissacarídeos sulfatados com atividade antitumoral entre os anos 1974 e 2017.



Fonte: Figura 4. Número de publicações sobre polissacarídeos sulfatados com atividade antitumoral desde a década de 1970 até 2017 (ASSEF, 2017 p. 30)

1.2 A QUITOSANA E SUAS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS

A quitosana é um polissacarídeo produzido a partir de uma reação de desacetilação da quitina, componente estrutural dos exoesqueletos de crustáceos (principalmente camarão e caranguejo), insetos, das partes rígidas de moluscos e de paredes celulares de fungos. Ademais, a quitosana possui propriedades interessantes, como biodegradabilidade, biocompatibilidade, baixa alergenicidade e atoxicidade (KUMAR et al., 2004). Devido à complexidade da estrutura da quitina ser um limitante, a quitosana se torna um modelo ideal para diversas aplicações, principalmente por suas características favoráveis (CHEUNG et al., 2015).

A estrutura polimórfica da quitina permite uma categorização em três tipos: α -, β - e γ -quitina. A primeira é a mais estável e abundante, possui arranjo antiparalelo e possui como fonte exoesqueletos de crustáceos. A β -quitina é primariamente obtida de gládios de lula, possui pontes intermoleculares mais fracas e estrutura paralela. Já a última é uma combinação das duas primeiras. Assim, a desacetilação de cada tipo de quitina, leva, respectivamente, aos três tipos de quitosana existentes: α -, β - e γ -quitosana (JAWORSKA et al., 2003).

Além das características favoráveis citadas anteriormente, a quitosana e seus derivados

são considerados muito versáteis pelas suas diferentes bioatividades. Esse polissacarídeo já foi descrito ao apresentar ação antimicrobiana (RABEA et al., 2003), antifúngica (TAYEL et al., 2016) e antioxidante (PARK; JE; KIM, 2003). Porém, sua atividade antitumoral mostrou-se de grande impacto. A quitosana exibiu potencial antitumoral em modelos tanto *in vitro* quanto *in vivo*, por mecanismos diferentes. Oligossacarídeos de quitosana inibem o crescimento das células cancerígenas PC3 (célula de câncer de próstata), A549 (célula de câncer de pulmão) e HepG2 (célula de hepatoma). A taxa de 50% de morte celular foi atingida nas concentrações de 25 µg/mL, 25 µg/mL e 50 µg/mL, respectivamente (PARK et al., 2011). Além disso, quitosanas foram testadas em modelo de sarcoma murino Meth-A transplantado em camundongos BALB/c. Os resultados incluem aumento de produção de Interleucina(IL)-1 e IL-2 sequencialmente, dando origem à manifestação do efeito antitumoral por meio da proliferação de linfócitos T citotóxicos, sendo a dose ótima de inibição 10 mg/kg (TOKORO et al., 1988). A quitosana também ativa células dendríticas e aumenta a ação das células NK. Em experimentos *in vitro*, a quitosana induz uma maior produção de IFN- γ pelas células NK e ativa células dendríticas para a secreção de citocinas pró-inflamatórias. Já nos experimentos *in vivo* em um modelo de melanoma murino, os resultados demonstraram que a quitosana ativou as células NK contra as células tumorais B16-F10 (LI et al., 2018).

Por causa de suas propriedades físicas como elevada área de superfície, porosidade, força tênsil e condutividade, a quitosana pode ser facilmente moldada em diferentes formas, por exemplo: partículas, filmes, géis e soluções (SHUKLA et al., 2013). Tal característica comprova a versatilidade do composto e facilita sua utilização em diversas aplicações. Por exemplo, esses biomateriais podem ser utilizados para a cicatrização de feridas (RHOADES; ROLLER, 2000) e tratamento de doenças cardiovasculares por diversos mecanismos, sendo um deles a redução de níveis de triglicerídeos e colesterol (YU et al., 2015). Também, sua utilização no combate à obesidade (YLITALO et al., 2011) foi o motivo de sua grande abordagem pela mídia atualmente.

Ainda, a utilização de quitosana como um sistema de entrega de fármacos se mostra como uma das funções desse polissacarídeo de mais destaque. Seu uso na indústria farmacêutica inclui diversas formas, como microesferas, nanopartículas, vacinas, micelas e tablets (CHEUNG et al., 2015). Também, nanomateriais produzidos com quitosana possuem propriedades físicas, químicas e mecânicas superiores quando comparadas com a quitosana pura (SHUKLA et al., 2013). Além disso, a utilização de quitosana e derivados como sistema de entrega de fármacos para agentes tumorais promovem efeitos colaterais reduzidos em relação à droga original, por causa de uma ação mais especializada e predominantemente distribuída

para células cancerígenas (KATO; ONISHI; MACHIDA, 2005).

Além de sistema de entrega de fármacos, a quitosana também teve suas propriedades adjuvantes estudada. Ela induz respostas imunes de IgA e IgG à ovalbumina, sendo o peso molecular um dos fatores que alteram sua atividade (BOONYO et al., 2007).

Devido a isso, os efeitos imunomoduladores das quitosanas começaram a ser amplamente estudados. Outros trabalhos também descrevem quitosanas, porém de baixo peso molecular, exercendo atividade imunoestimuladora, regulando a expressão de citocinas pró-inflamatórias, além de ativarem M ϕ (macrófagos) da linhagem RAW264.7 (WU et al., 2015).

1.3 SULFATAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS

As quitosanas podem passar por modificações químicas, principalmente em seus grupos amino e hidroxila, para a produção de produtos com aplicações farmacêuticas. Quando sulfatadas, por exemplo, promovem diversas atividades biológicas. Além disso, as quitosanas sulfatadas são a estrutura análoga mais próxima da heparina - o anti-coagulante sanguíneo - explicando sua função anticoagulante (DESAI, 2004; DROZD et al., 2001).

Apesar de biomoléculas contendo grupos sulfato serem conhecidas desde 1876 (BAUMANN, 1876), o processo de sulfatação somente foi realizado mais de 80 anos depois, quando um composto doador de sulfato foi isolado (ROBBINS; LIPMANN, 1956). A sulfatação de uma substância, portanto, consiste em uma reação catalisada por enzimas - as sulfotransferases - de transferência de um grupo sulfúrico de uma molécula doadora para algum dos diversos substratos possíveis (CHAPMAN et al., 2004).

A sulfatação de polissacarídeos promove mudanças em diversos aspectos da molécula, atribuindo novos efeitos à molécula, ou modulando efeitos já existentes em quesitos de potência e eficácia. No final da década de 1980, Mizumoto e colaboradores relataram uma inibição de um tipo de retrovírus por meio de monossacarídeos sulfatados (MIZUMOTO et al., 1988). Tal evento iniciou uma linha de pesquisa para a investigação também de mudanças na atividade de polissacarídeos sulfatados, quando em comparação com os mesmos neutralizados. Assim, um estudo de 2010 comprovou que a sulfatação de polissacarídeos provenientes da planta *Lycium barbarum* promoveu a proliferação de linfócitos, além de potencializar o efeito de reforçar a resposta imune após vacinação (WANG et al., 2010). Outras pesquisas sobre polissacarídeos sulfatados encontraram o mesmo resultado, como o trabalho com polissacarídeos de *Condonopsis pilosula*, por exemplo (ZHAO et al., 2013).

Outros estudos também relataram a atribuição de novas atividades relacionadas à

sulfatação dessas moléculas. Polissacarídeos da planta asiática *Achyranthes bidentata* não possuem atividade antiviral, porém a adquirem quando são sulfatados (TIAN et al., 1995). Ainda, M ϕ da linhagem RAW264.7, obtém uma significativa melhoria na atividade imunológica em células de camundongos normais e imunossuprimidos, a partir de polissacarídeos sulfatados de pólen de pinheiro *Pinus massoniana*. A ativação dos M ϕ nesse caso demonstrou-se acompanhada de aumento da concentração de íons de cálcio intracelular (GENG et al., 2016). Fucoïdanas, polissacarídeos sulfatados provenientes de algas pardas, também demonstraram aumentar seu efeito imunoestimulador em M ϕ dependendo do seu grau de sulfatação. Por exemplo, fucoïdanas de *Fucus evanescens* induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e TNF- α por células dendríticas e macrófagos derivados de medula óssea murinos. Porém, as amostras de fucoïdana hipossulfatadas acarretam uma diminuição significativa da secreção de citocinas por ambos os modelos celulares (KHIL'CHENKO et al., 2011).

Yang e colaboradores foram pioneiros em especular que a sulfatação iria aumentar a atividade imunológica da quitosana. De fato, quitosanas sulfatadas α e β de diferentes pesos moleculares apresentam potencial imunoestimulante em M ϕ RAW264.7. Mais especificamente, as β -quitosanas sulfatadas demonstram-se mais ativas nos níveis produção de Óxido Nítrico (NO), Prostaglandina E2, Fator de Necrose Tumoral (TNF- α), IL-6 e IL-1 β . Devido aos resultados inéditos, foi sugerido que quitosanas sulfatadas deveriam ser utilizadas como imunoestimuladores, especialmente como adjuvante em vacinas (YANG et al., 2018).

1.4 MACRÓFAGOS COMO MODELO PARA EXPERIMENTOS *IN VITRO*

Dentre as células hematopoiéticas que compõem a imunidade inata, podemos destacar os macrófagos (M ϕ). Os M ϕ são imprescindíveis para uma resposta imunológica adequada. Eles são provenientes dos monócitos da medula óssea e do sangue quando migram para os tecidos. Ademais, realizam fagocitose, o processo pelo qual células englobam partículas grandes (tipicamente $\geq 0.5\mu\text{m}$), micróbios, detritos celulares, ou porções do ambiente extracelular, segundo Mantovani, 2014. Assim, esse procedimento é utilizado para inspecionar seu microambiente e destruir potenciais patógenos. Dessa forma, a informação coletada por receptores de membrana e sensores intracelulares ativados consequentemente podem determinar a intensidade da resposta imunológica, o recrutamento de células para o local e processos de inflamação (TURVEY; BROIDE, 2010; BISWAS; MANTOVANI, 2014).

Por possuírem uma grande plasticidade, os M ϕ podem ser polarizados para uma gama de

fenótipos distintos ou “estados funcionais”, dependendo da presença de alguns mediadores. Nos extremos opostos desse espectro, estão os fenótipos M1 (“classicamente ativado”) e o M2 (“alternativamente ativado”), em um paradigma como o dos linfócitos T auxiliares, Th1 e Th2 (BISWAS; MANTOVANI, 2010; MANTOVANI et al., 2002; SICA; MANTOVANI, 2012).

Dependendo do sinal estimulatório, os M ϕ podem adquirir diferentes fenótipos, que os estimula a produzir substâncias diversas. Interferon- γ (IFN- γ), LPS (Lipopolissacarídeos) da membrana de bactérias Gram-negativas adicionado de IFN- γ e as citocinas Fator de Necrose Tumoral (TNF) e Fator Estimulante do Crescimento de Granulócito-Macrófago (GM-CSF) conduzem o M ϕ – antes naive – ao fenótipo M1. Como resultado, ocorre o aumento da produção das citocinas IL-6, IL-12, IL-23 e TNF em grandes quantidades, a secreção de NO e a expressão de marcadores de superfície como a Óxido Nítrico Sintase Induzida (iNOS) e CD86. Assim, o estado M1 pode ser descrito funcionalmente como pró-inflamatório e antitumoral. Já o estado M2 é induzido a partir de fatores como as citocinas IL-4 e IL-13 a produzirem as citocinas TGF- β , IL-1ra e IL-10 e expressarem os marcadores de superfície Receptor de Varredura (SR), receptor de manose (CD206) e Arginase-1 (Arg-1) em murinos. O fenótipo M2, portanto, apresenta atividade anti-inflamatória e angiogênica, auxilia na eliminação de resíduos e na cicatrização de feridas, e incentiva a progressão de tumores (MANTOVANI; VECCHI; ALLAVENA, 2014; MARTINEZ; GORDON, 2014).

As diversas funções do sistema imune inato auxiliam no combate de algumas doenças. Por exemplo, a inflamação auxilia no combate a infecções (TURVEY; BROIDE, 2010). Assim, a estimulação do sistema imune pode ser a saída para o tratamento de doenças, dentre elas o câncer, considerado um grave problema de saúde pública com extenso impacto na população (STEWART; WILD, 2014).

Os tumores são tecidos heterogêneos, apresentando diversos tipos celulares. Em condições normais, o Microambiente Tumoral (MAT) envolve, além de células tumorais, nervos, vasos sanguíneos e linfoides, fibroblastos, células endoteliais e células imunes, exercendo funções para o crescimento do tumor (HANSEN; COLEMAN; SOOD, 2016; MANTOVANI et al., 2017). Normalmente, os M ϕ recrutados para o MAT são os Macrófagos Associados ao Tumor (TAM). Uma grande quantidade de TAMs na maioria dos cânceres humanos está relacionada a um prognóstico desfavorável (VINOGRADOV; WARREN; WEI, 2014; YANG; ZHANG, 2017). Com o avançar da doença, os TAMs polarizam para um fenótipo semelhante ao M2 por causa da abundância em IL-4, IL-10, TGF- β , CSF-1 e ácido láctico no MAT, acarretando a promoção do crescimento e disseminação do tumor (COLEGIO et al., 2014; SICA et al., 2015).

Tendo em vista a importância dos TAMs para a progressão tumoral, estudos clínicos atuais abordam estratégias envolvendo TAMs como alvos terapêuticos (ALLAVENA; MANTOVANI, 2012). Uma delas inclui a reprogramação de TAMs semelhantes a M2 para um fenótipo mais parecido com M1, aumentando sua eficácia antitumoral. Um estudo demonstrou tal ação a partir da droga Paclitaxel, reprogramando, via ativação dos receptores TLR4, macrófagos de camundongos WT previamente polarizados em M2, para um fenótipo semelhante a M1 (WANDERLEY, 2018).

1.5 MÉTODOS DE ENTREGA DE FÁRMACOS

A ideia de encapsular uma substância para facilitar sua distribuição não é tão recente. Nos anos 60, Chang propôs o conceito de biocápsulas para aprisionar compostos bioativos como enzimas e proteínas em uma membrana semi-permeável para permitir sua liberação (CHANG, 1964). Posteriormente, essa proposta abrangeu o encapsulamento de agentes terapêuticos e carreadores produzidos a partir de polímeros se mostraram como uma estratégia eficaz.

Os benefícios de compostos encapsulados sobre métodos tradicionais incluem a proteção contra a degradação do fármaco, o controle da liberação dos compostos, o aumento da meia-vida. Isso aumenta o grau de aceitação dos pacientes ao tratamento por reduzir a frequência de administração. Ademais, a versatilidade das partículas poliméricas torna possível a entrega a partir de diversas vias (CHAMPION; KATARE; MITRAGOTRI, 2007; LANGER, 1990). A especificidade das partículas se torna outra vantagem destas. Partículas de Polietilenoglicol, por exemplo, foram utilizadas no tratamento do câncer. Ligantes para células-alvo foram inseridas na superfície dessas partículas, tornando o tratamento mais específico para as células tumorais (VAN VLERKEN; VYAS; AMIJI, 2007).

Diversos métodos são utilizados para a produção e controle das características de partículas poliméricas, sendo o *spray drying* um dos principais (WANG; WANG, 2002). Eles são importantes para o controle de parâmetros como polidispersão, eficiência de encapsulamento e diâmetro das partículas. Além disso, outros critérios importantes a serem avaliados são a química da superfície, forma e tamanho das partículas, pois estes podem influenciar nas interações com as células do organismo (CHAMPION; KATARE; MITRAGOTRI, 2007).

Processos de fagocitose que são mediados por actina normalmente são restritos a partículas de tamanho entre 0.2 e 5µm. Porém, o tamanho ótimo para a internalização seria de 2 a 3µm, de acordo com uma pesquisa com *beads* de poliestireno (CHAMPION; WALKER;

MITRAGOTRI, 2008). Isso acontece porque, provavelmente, partículas desse tamanho são capazes de interagir com um número mínimo de receptores necessário para induzir a formação de perturbações na membrana. Essas perturbações na superfície supostamente possuem um papel importante no reconhecimento e na ligação do macrófago às partículas (DOSHI; MITRAGOTRI, 2010).

Vários estudos argumentaram em relação ao melhor tamanho das partículas de *delivery* para uma ativação mais acentuada da resposta imune (ELDRIDGE et al., 1991; TABATA; IKADA, 1988; THIELE et al., 2001). Pesquisas com partículas poliméricas contendo antígenos demonstraram que elas ativam tanto a resposta humoral (se estiverem em escala micro) quanto a resposta celular (em escala nano) (CHONG et al., 2005; GUTIERRO et al., 2002). As interações de nanopartículas de PLGA com células fagocitárias e não fagocitárias já haviam sido estudadas anteriormente (LUTSIK et al., 2002), mas estudos com partículas de tamanho maior não foram conclusivos. Com isso, Nicolette *et. al* analisaram a interação de partículas sem nenhum composto bioativo inserido com M ϕ . As partículas de PLGA testadas em M ϕ J774 foram de diferentes tamanhos, já que apenas esse critério já induz respostas inflamatórias diferentes. A hipótese consistiu em partículas maiores – de escala micro – passando mais tempo na membrana celular ao serem envolvidas. Isso acarretaria em distúrbios físicos ocasionando, conseqüentemente, uma resposta inflamatória por mecanismos diferentes. Os resultados confirmaram a hipótese, demonstrando que as micropartículas iniciam a ativação de eventos imunológicos de maneira mais eficaz em comparação com as nanopartículas. Tais eventos consistem em aumento da translocação de NF- κ B para o núcleo celular e a consecutiva produção de citocinas pró-inflamatórias – como TNF- α e IL-1 β –, caracterizando o macrófago em um perfil mais próximo de M1 (NICOLETE; SANTOS; FACCIOLI, 2011).

Partículas poliméricas com a função de *delivery* já foram produzidas a partir de diversos polímeros biodegradáveis (UHRICH et al., 1999). O polímero usado pode interferir em vários aspectos, como o que vai ser encapsulado – tipos de drogas ou proteínas; a biocompatibilidade e as propriedades físicas da partícula; e a maneira da degradação e liberação dos compostos (PILLAI; PANCHAGNULA, 2001).

Nesse contexto, as propriedades físico-químicas e biológicas da quitosana já mencionadas anteriormente tornam esse polímero um material promissor para o *delivery* de compostos. Além disso, a quitosana age como um “intensificador de penetração”, separando as junções epiteliais, particularidade ainda mais vantajosa para a entrega de compostos (PRABAHARAN; MANO, 2004).

Uma das aplicações da quitosana como facilitadora de *delivery* é a produção de vacinas a

partir de antígenos encapsulados. A facilidade da quitosana em produzir micro e nano partículas permite a preservação da antigenicidade dos polipeptídeos carregados. Dados sugerem que o encapsulamento de antígenos em partículas de quitosana mostram vantagens na ingestão, ativação e apresentação por células apresentadoras de antígenos (APCs, do inglês *antigen-presenting cells*), quando comparados com antígenos livres dissolvidos em meio aquoso (KOPPOLU; ZAHAROFF, 2013).

Outro estudo relatou o uso de microesferas de quitosana para a entrega de peptídeos antigênicos, compondo uma vacina contra Toxoplasmose aguda e crônica. Os resultados nos ensaios *in vitro* comprovaram a ativação de células dendríticas e linfócitos T com a vacina, aumentando a secreção de moléculas co-estimuladoras como CD40 e CD86. Já no *in vivo*, respostas imunológicas com o perfil Th1 foram induzidas em camundongos vacinados com as microesferas de quitosana, sendo acompanhadas pela produção aumentada de IgG e citocinas como IFN- γ e IL-2. Assim, as microesferas de quitosana foram avaliadas como um sistema efetivo para a entrega de antígenos por promoverem proteção em camundongos vacinados com ambos modelos de toxoplasmose (GUO et al., 2018).

Porém, a atividade da quitosana vai além de apenas *delivery* de antígenos. Estudos *in vitro* demonstram também seu desempenho como adjuvante, porém ressaltando o cuidado necessário com as propriedades físico-químicas como o grau de desacetilação, tamanho da partícula e técnica de preparo, fatores que podem alterar o efeito imunoadjuvante (SCHERLIESS et al., 2013).

Micelas de N-octil-sulfato quitosana carregadas com uma droga anticâncer muito conhecida - o Taxol® - demonstram eficácia antitumoral similar a apenas o fármaco aplicado livremente. Porém, as micelas possuíram redução significativa da toxicidade e aumento da biodisponibilidade. Ambos possuíram eficácia antitumoral na mesma dose – 10 mg/kg – em experimentos *in vivo* com camundongos inoculados com diferentes tipos de células tumorais. O Taxol®, a fórmula da mistura do Paclitaxel que é aplicada nos pacientes, é conhecido por apresentar diversos efeitos colaterais, como hipersensibilidade, nefrotoxicidade e neurotoxicidade (SZE BENI; ALVING; MUGGIA, 1998). Tais efeitos estimulam pacientes a desistirem do tratamento, e, os benefícios das micelas de quitosana podem influenciar no sucesso da terapia (ZHANG et al., 2008).

1.6 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

A quitosana possui diferentes atividades a depender da sua composição bioquímica.

Quando sulfatada, seu potencial para a ativação de macrófagos *in vitro* é evidente. Esse polissacarídeo, então, se mostra interessante do ponto de vista biomédico. Como mencionado anteriormente, fármacos sem sistema de entrega e altamente citotóxicos são duas limitações para o tratamento de doenças. Algumas adversidades da utilização de fármacos “livres”, que podem ser amenizadas com o uso de carreadores são: falta de seletividade para tecidos alvo, baixa meia-vida e distribuição inadequada no organismo (ALLEN; CULLIS, 2004). Já as drogas citotóxicas normalmente geram diversos efeitos colaterais nos pacientes, como cardiotoxicidade (SCHIMMEL et al., 2004), náuseas e fadiga (BREEN et al., 2015). Assim, a quitosana sulfatada seria uma solução para os dois: sendo utilizada como um sistema de *delivery* não tóxico e como adjuvante, possuindo atividade imunoestimuladora por si só que poderia potencializar a atividade de fármacos eficientes.

É notório que o estudo das aplicações das quitosanas nos mais diversos ramos farmacológicos está se expandindo bastante. Porém, pesquisas com partículas de quitosana sulfatada em suas variadas funções são mais incomuns. Após um conhecimento mais aprofundado no assunto, estudos iniciais sobre seu uso em diferentes atividades são de grande importância. Principalmente, como sistema de *delivery* e, sobretudo, como meio de aumentar a eficácia do fármaco inserido, agindo também como um modificador da resposta biológica e diminuir os efeitos indesejados a partir das propriedades das quitosanas descritas anteriormente.

Portanto, sabendo que a quitosana sulfatada ativa M ϕ murinos da linhagem RAW264.7 para um perfil similar ao fenótipo M1 (YANG et al., 2018), questionamos se haveria alguma diferença na eficácia da ativação se a quitosana sulfatada fosse estruturada em formato de micropartícula no mesmo modelo de células. Essa estruturação facilitaria a inserção de fármacos no composto, permitindo, assim, a possibilidade de sua utilização não só como método de *delivery*, mas também como adjuvante.

A partir do conhecimento que a quitosana sulfatada estruturada seria maior que a quitosana sulfatada neutra livre, sugerimos que as primeiras provocariam mais perturbações na membrana, ativando as vias intracelulares decorrentes da fagocitose, aumentando, assim, a ativação de M ϕ . Dessa forma, esperamos que a quitosana sulfatada estruturada estimularia uma ativação mais eficaz dos M ϕ murinos da linhagem RAW264.7 para o perfil M1, liberando citocinas pró-inflamatórias/antitumorais com mais intensidade que as demais.

Após os resultados do presente estudo, diversas novas pesquisas poderão ser feitas para o avanço da utilização de partículas de quitosana sulfatada no tratamento de diversas doenças. Apesar das partículas utilizadas neste estudo não possuírem algum quimioterápico inserido – o que demonstra o potencial imunoestimulador das estruturas *per se* –, experimentos posteriores

podem ser feitos para a ampliação da atividade a partir da inserção de fármacos em sua estrutura. Ainda, estudos com moléculas biocompatíveis e atóxicas que possuem como alvo os macrófagos e como função principal a polarização deles são de grande impacto no tratamento de doenças relacionadas ao sistema imunológico, sendo uma delas o câncer.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a atividade de quitosanas sulfatadas livres e estruturadas na ativação de macrófagos murinos da linhagem RAW264.7.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

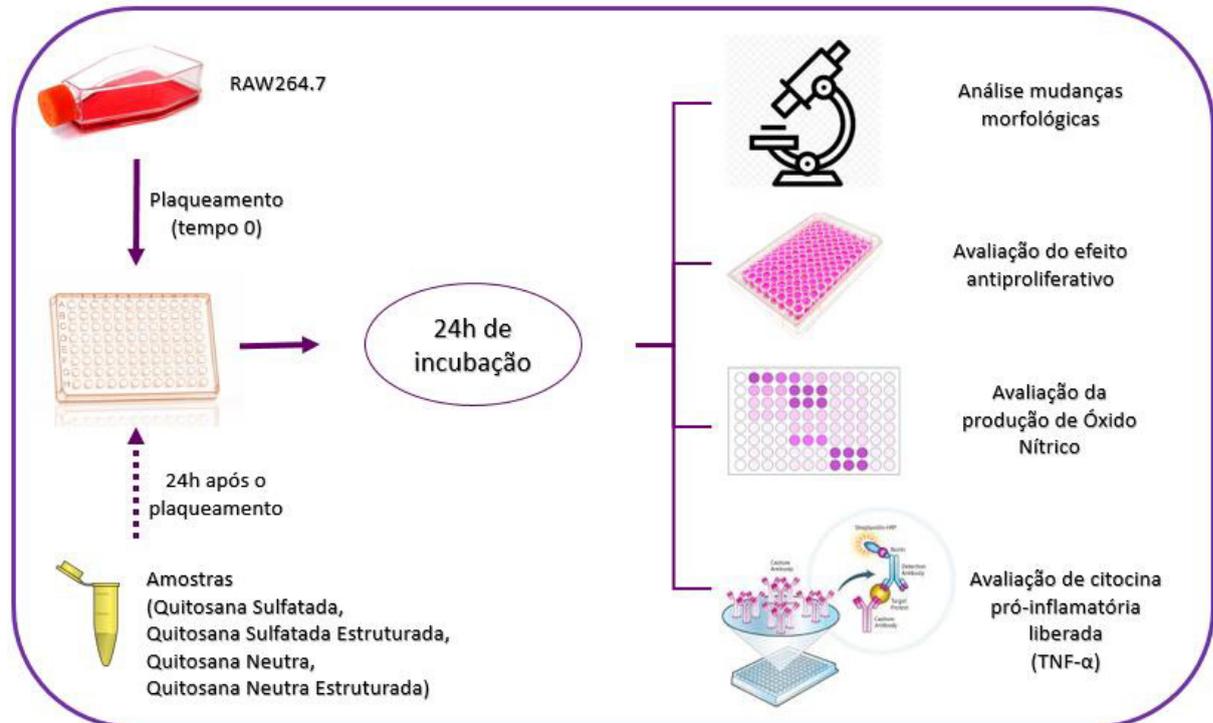
- Avaliar a ativação de macrófagos pela quitosana sulfatada
- Avaliar o efeito das quitosanas sulfatadas na proliferação celular em macrófagos
- Comparar o perfil de ativação entre quitosana sulfatada e quitosana neutra e entre amostras estruturadas e não estruturadas
- Caracterizar a ativação a partir de substâncias produzidas

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

As amostras de quitosana sulfatada (QS) foram produzidas a partir da quitosana neutra (QN) comercial pelo Laboratório de Polímeros e Inovação de Materiais (LABPIM) da Universidade Federal do Ceará, assim como as partículas de quitosana sulfatada estruturada (QSE) e de quitosana neutra estruturada (QNE). Inicialmente, ensaios *in vitro* de avaliação da atividade biológica foram realizados em macrófagos murinos para analisar a atividade citotóxica e o potencial imunomodulador. Para complementar, a avaliação dos aspectos morfológicos foi realizada com o auxílio de um microscópio de contraste de fase. Por fim, testes de caracterização dos M ϕ ativados pelas amostras de quitosana foram realizados através da detecção de citocinas liberadas. A figura 2 resume esquematicamente o planejamento experimental do presente trabalho.

Figura 2: Planejamento experimental do presente trabalho.



Fonte: elaborado pela autora.

3.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras de QS, QSE, QN e QNE foram produzidas pelo LABPIM da UFC pela MSc. Denise Ramos, sob orientação da Profa. Dra. Nágila Ricardo. A quitosana neutra utilizada foi a de massa molecular de 1,900 - 310 kDa e grau de desacetilação 75-85% e da marca Sigma Aldrich. Para a produção das amostras sulfatadas foi realizada de acordo com o protocolo desenvolvido no trabalho de Yang et al. 2003, utilizando o Sulfur trioxide pyridine complex 97% da marca Sigma Aldrich (YANG et al., 2003). Já a produção das partículas para as amostras estruturadas se deu pelo método de *spray drying* (DE SOUZA et al., 2013). O surfactante utilizado como emulsificante foi o Tween 80, também da Sigma Aldrich, na concentração de 0.1% da massa do polissacarídeo. A microemulsão foi realizada em um equipamento de sacagem por pulverização Buchi, Suíça, modelo B-290. Ademais, as temperaturas do ar de entrada e saída foram mantidas em 160°C e 80°C, respectivamente, com um fluxo de alimentação de 6 mL/min.

3.3 LINHAGEM CELULAR

Para os experimentos *in vitro*, a linhagem utilizada foi a de macrófagos murinos RAW264.7, obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro. A linhagem foi modificada a partir da indução de ascite por tumor formado após a inserção do vírus da leucemia murina de Abelson em camundongo macho. Ela possui nível de biossegurança 2, por ser um Organismo Geneticamente Modificado (OGM). As células possuem crescimento aderente e são utilizadas como modelo *in vitro* para a prospecção de substâncias com atividade inflamatória e anti-inflamatória (FENGYANG et al., 2012; HARTLEY et al., 2008).

3.3.1 Cultivo celular

As células foram cultivadas em frascos plásticos não aderentes para cultura (marca KASVI, modelo K13-0100, de diâmetro 10 cm), com o meio de cultura DMEM (Lonza) complementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (100 U/mL penicillina e 100 µg/mL estreptomicina).

As culturas foram manipuladas em câmara de fluxo laminar vertical (ESCO, modelo Airstream classe II-B2) e mantidas em estufa incubadora 2 (SAYNO, modelo MCO19AIC) a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. A verificação da confluência foi acompanhada diariamente

através de microscópio óptico invertido de contraste de fase (LABOMED, modelo TCM 400). Quando a confluência se mostrava próxima a 70%, tornava-se necessário repique para meio de cultura novo. Tal procedimento consiste em descarte do meio DMEM completo das placas com pipetas sorológicas, lavagem das placas com salina e utilização de tripsina para a soltura das células aderentes. Logo após, 10 mL de meio foram adicionados, homogeneizados com as células e toda a solução é retirada e adicionada em tubos de 15 mL. Posteriormente, uma alíquota é transferida para a contagem em câmara de Neubauer, após a mistura com solução de azul de Trypan. Com isso, as células viáveis, que possuem metabolismo ativo, conseguem expulsar o corante, tornando possível a contagem adequada do número total de células viáveis. As células em suspensão no tubo poderiam, além de serem devolvidas para a placa afim de manter a cultura, ser utilizadas em experimentos.

Quando a cultura celular atingia um número de passagens alto, era realizado um descongelamento de alíquotas de RAW264.7 criopreservadas para a iniciação de novas culturas. Por fim, todo o resíduo produzido, independentemente de serem líquidos ou sólidos, era inativado com hipoclorito de sódio (solução comercial de 2% de cloro ativo) por período overnight. Após o tempo de inativação, os resíduos eram esterilizados a 121°C por 30 min e descartados como lixo hospitalar.

3.4 ASPECTOS MORFOLÓGICOS DA RAW264.7 NOS ENSAIOS *IN VITRO*

A análise dos aspectos morfológicos das células tratadas com as amostras teste permite a identificação de características alteradas, sugerindo uma comparação com os controles e a possibilidade dos mecanismos de ação a acontecer. Obtivemos o auxílio do microscópio invertido de contraste de fase (LABOMED, modelo TCM 400) para observar os poços das placas dos ensaios *in vitro* após o tratamento realizado.

3.5 ATIVIDADE CITOTÓXICA

3.5.1 Ensaio da Sulforodamina B - SRB

Para avaliar o crescimento das células após o contato com as amostras de quitosanas sulfatadas livres e estruturadas foi utilizado o ensaio da Sulforodamina B (SRB), uma aminoxantina. O teste determina a densidade celular a partir do teor de proteínas celulares totais. O SRB apresenta coloração rosa brilhante e sua estrutura possui dois grupos sulfônicos capazes

de se ligar às porções terminais de aminoácidos das células fixadas com o ácido tricloroacético. Assim, à 570nm em espectrofotômetro, há um valor superior da absorbância quando há uma maior captação do corante, ou seja, quando há mais células viáveis (SKEHAN et al., 1990). O ensaio da SRB é atualmente um dos testes de citotoxicidade mais utilizados em triagem de fármacos anticâncer pelo Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos (NCI) por ser reprodutível, sensível e rápido (RUBINSTEIN et al., 1990). Além disso, esse teste é independente da atividade metabólica celular, diferentemente do ensaio de MTT, outro procedimento utilizado com finalidade semelhante (HOUGHTON et al., 2007). Assim, pode-se dizer que o método é mais seguro em encontrar substâncias que interferem ou não na proliferação celular.

3.5.1.1 Procedimento experimental

Para a realização do ensaio, as células RAW264.7 foram plaqueadas na concentração de 4×10^4 em duas placas de 96 poços 24 horas antes da adição das amostras.

As amostras de QS e QSE nas concentrações de 1, 3, 10, 30, 100 e 300 μ g/mL, Na₂SO₄ a 250 μ g/mL e Salina para controle negativo foram inseridas na placa e encubadas durante 24h em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Logo após a inserção das amostras, a segunda placa – do Tempo Zero, não tratada – foi fixada com ácido tricloroacético (TCA) a 10% e guardada em freezer a 4°C. Após o tratamento de 24h, o sobrenadante dos poços da placa com as amostras foi retirado, e as células foram fixadas com TCA 10% em freezer a 4°C por no mínimo 1 hora. Após o tempo esperado, as placas foram lavadas com 200 μ L de água destilada 5 vezes e esperou-se a placa secar até não apresentar umidade aparente. Posteriormente, 100 μ L da solução de SRB a 0,4% foram adicionados a cada poço e as placas foram incubadas por 30 minutos em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Logo após, as placas foram lavadas com ácido acético a 1% por 5 vezes para remover o excesso livre de solução e então as paredes dos poços foram limpas cuidadosamente. Por fim, foi adicionado 200 μ L de tampão tris base 10mM a 4°C a fim de solubilizar o SRB ligado aos aminoácidos fixados para efetuar a leitura. Por fim, as placas foram homogeneizadas em shaker por pelo menos 10 minutos e levadas ao espectrofotômetro de placa (Fisher Scientific, modelo Multiskan FC) para as absorbâncias serem lidas no comprimento de onda 570nm.

3.5.1.2 Análise estatística

Os valores de absorvância obtidos na leitura da placa após ensaio de SRB de cada uma das concentrações testadas tiveram suas médias comparadas com a média do controle negativo.

3.6 ESTUDO DA ATIVIDADE IMUNOESTIMULATÓRIA

3.6.1 Ensaio de Griess

O ensaio de Griess foi utilizado para a avaliação do efeito imunoestimulador através da ativação de M ϕ . Esse teste consiste na quantificação indireta de NO a partir da detecção de nitrito em solução através de um método colorimétrico (GREEN; TANNENBAUM; GOLDMAN, 1981). A reação acontece quando o íon nitrito reage com a sulfanilamida em meio ácido, formando um sal de diazônio que reage por acoplamento com o cloridrato de N-(1-naftil) etilenodiamina (NEED). Esse processo gera um diazo composto, que apresenta coloração rosa intensa e possui absorção máxima em torno de 540nm (RAMOS; CAVALHEIRO; CAVALHEIRO, 2006).

3.6.1.1 Procedimento experimental

O procedimento experimental iniciou-se com o plaqueamento de macrófagos murinos RAW264.7 na concentração de $1,5 \times 10^5$ células/mL em placas de 96 poços 24 horas antes da adição das amostras teste.

As amostras de QN, QNE, QS e QSE foram testadas em triplicata nas concentrações de 0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30; 100 e 300 μ g/mL diluídas em salina, o LPS (100ng/mL) foi utilizado como controle positivo e a salina *per se*, como controle negativo. As placas foram então incubadas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C para o tratamento de 24h. Após esse período, 50 μ L do sobrenadante foi coletado para o teste de Griess.

Foram adicionados 50 μ L do reagente de Griess [sulfanilamida 1% em ácido acético 30% / N-(1-naftil) etilenodiamina 0,1 % em ácido 40 acético 60%] à alíquota de 50 μ L dos sobrenadantes em ambiente sem iluminação, por 10 minutos. A absorvância foi, então, medida em espectrofotômetro a 570nm. Para a determinação da concentração de nitrito (μ M) foi

utilizada uma curva-padrão com uma solução de NaNO_2 a uma concentração inicial de $200\mu\text{M}$ seguida de diluições seriadas com fator de diluição 2, deixando a menor concentração $1,56\mu\text{M}$.

3.6.1.2 Análise de dados

A partir da curva-padrão feita na placa de 96 poços a partir da diluição seriada de nitrito, uma regressão linear foi utilizada para determinar as concentrações desse composto em cada amostra. Em seguida, os valores das concentrações de nitrito foram interpolados para a normalização dos dados. Posteriormente, a Análise de Variância (ANOVA) de duas vias foi realizada para avaliar não só o efeito de cada variável independente, mas também se há alguma interação entre elas. Por fim, o pós-teste de Dunnet foi aplicado para comparar cada tratamento com o controle. O programa utilizado para a análise foi o GraphPad Prism, com $*p < 0,05$ indicando diferença significativa.

3.6.2 Dosagem de citocinas por ELISA

O ensaio imunoenzimático ELISA (do inglês *Enzyme linked Immunoabsorbant Assay*) foi realizado para detectar e quantificar a citocina $\text{TNF-}\alpha$ no meio condicionado de $\text{M}\phi$ estimulados por QS e QSE – nas concentrações as quais foram possíveis a detecção de produção de Nitrito, sugerindo que houve ativação de $\text{M}\phi$ –, LPS (100 ng/mL) e salina. Nesse teste, um anticorpo específico reconhece seu antígeno ligante e a enzima ligada covalentemente ao anticorpo catalisa uma reação colorimétrica, cujo corante pode ser detectado em espectrofotômetro.

3.6.2.1 Procedimento experimental

Para a detecção da citocina $\text{TNF-}\alpha$, foi utilizado o Kit DuoSet (R&D Systems, EUA) e os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. Em suma, as placas para ELISA de 96 poços foram sensibilizadas com $100\mu\text{L}$ do anticorpo de captura da citocina de interesse em cada poço por 16h em temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas com $200\mu\text{L}$ do tampão de lavagem por três vezes e, então, $200\mu\text{L}$ de BSA 1% foram adicionados para bloqueio por 1h, reduzindo ligações inespecíficas. Após lavagem, alíquotas

dos sobrenadantes obtidos dos M ϕ sensibilizados com as amostras previamente e os padrões das citocinas para a obtenção de uma curva padrão foram descongelados e adicionados nos poços na concentração de 100 μ L por poço e incubados por 2 horas em temperatura ambiente. As placas foram, então, lavadas três vezes com 200 μ L de tampão de lavagem e incubadas com anticorpo de detecção para a citocina TNF- α por 2 horas em temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas três vezes e incubadas com 100 μ L de estreptavidina por 20 minutos em temperatura ambiente. Após nova série de lavagens, a revelação foi realizada a partir da adição de 100 μ L da solução substrato em cada poço, e incubação em ambiente protegido de luz por 20 minutos à temperatura ambiente.

Por fim, a reação enzimática foi cessada com a adição de 50 μ L da solução de parada (H₂SO₄) e a absorbância foi medida à 450nm.

3.6.2.2 Análise de dados

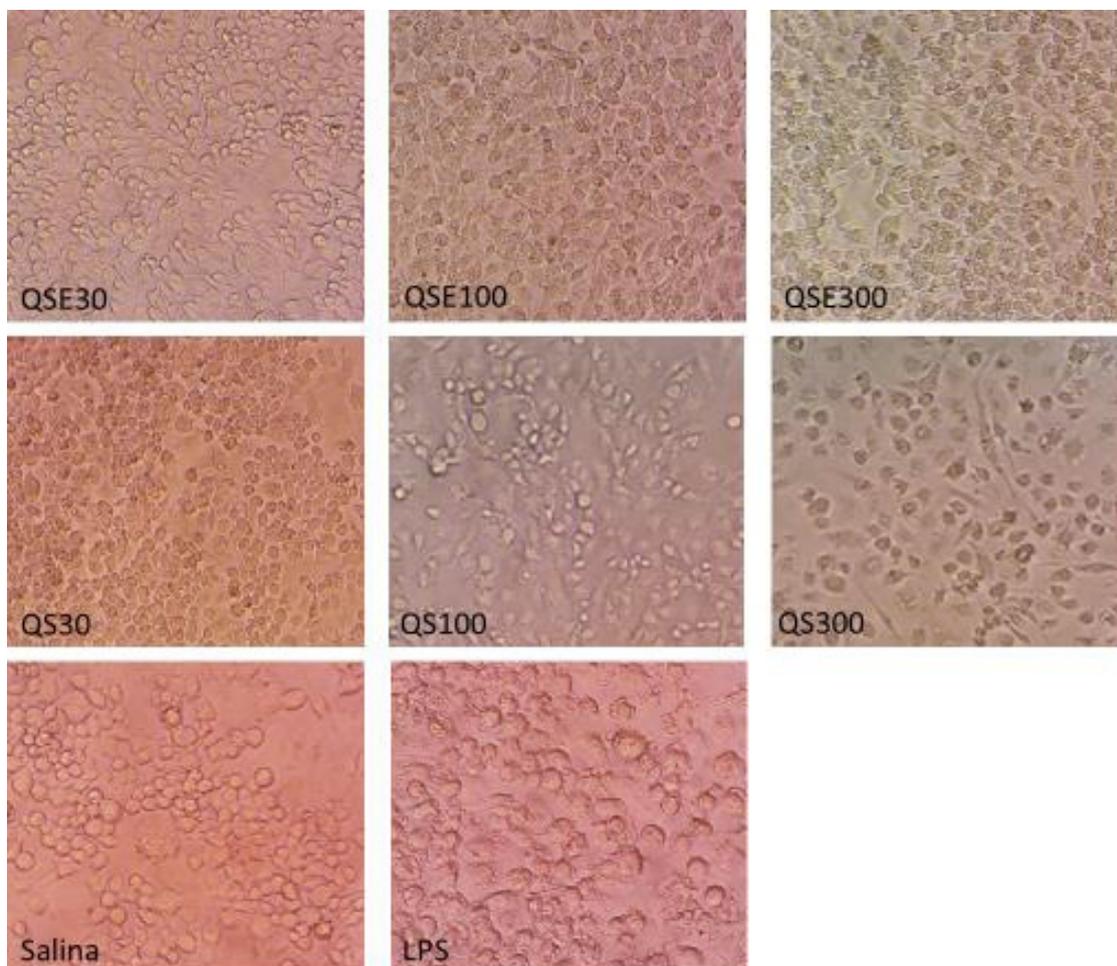
Os resultados das absorbâncias obtidas foram expressos em pg/mL através de regressão linear com base na curva-padrão, obtendo-se uma reta para a determinação da concentração de cada citocina inserida em função de sua absorbância. Os valores foram, então, interpolados e comparados com o controle negativo por ANOVA seguida de pós teste de Dunnett. O programa utilizado foi o GraphPad Prism, com * $p < 0,05$ indicando diferença significativa.

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DA MORFOLOGIA DAS CÉLULAS RAW264.7

A análise de aspectos morfológicos nos M ϕ da linhagem RAW264.7 após contato com as amostras revelou alterações aparentemente relacionada com a concentração em comparação com os controles (Figura 3). As amostras de QSE e QS na concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$ possuem aparência mais próxima ao controle negativo (salina). As células possuem aspecto mais arredondado, com superfície mais lisa. Já na concentração de 300 $\mu\text{g/mL}$ de ambas as amostras, a aparência das células é mais achatada, com superfície mais rugosa e algumas estruturas semelhante a vacúolos aparentes. Tais características são similares ao controle positivo, o LPS. As amostras na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ possuem morfologia mediana em comparação às mencionadas anteriormente. A Figura 3 retrata fotomicrografias de um mesmo experimento de Griess, após o tratamento de 24h.

Figura 3: Fotomicrografias de macrófagos RAW264.7 após tratamento de 24h com amostras de Quitosana Sulfatada Estruturada (QSE) e Quitosana Sulfatada (QS) nas concentrações de 30, 100 e 300 $\mu\text{g/mL}$, salina e LPS para controles negativo e positivo, respectivamente. Aumento 200X.



Fonte: elaborado pela autora.

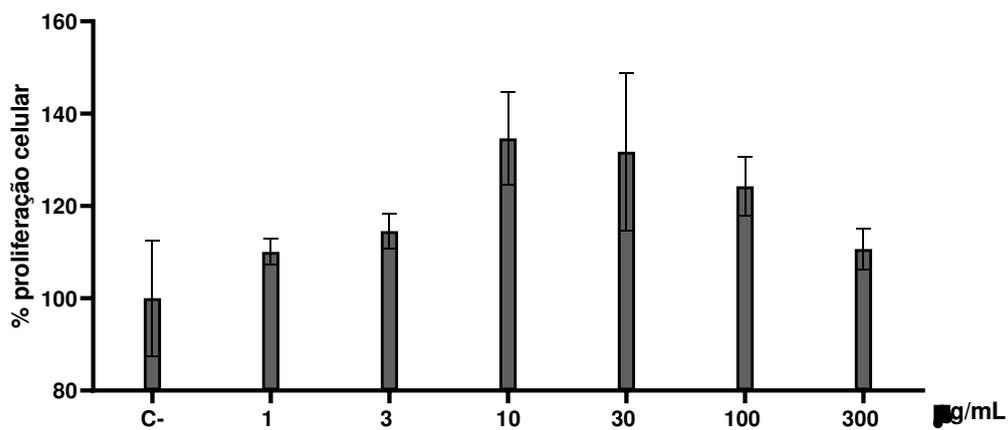
4.2 ESTUDO DA CITOTOXICIDADE DAS QUITOSANAS SULFATADAS EM MACRÓFAGOS RAW264.7

A avaliação do efeito antiproliferativo demonstrou que as amostras de Quitosana (QS, QSE, QN e QNE) em todas as concentrações testadas, assim como o Sulfato de Sódio, não apresentaram citotoxicidade alguma contra a linhagem de macrófagos murinos RAW264.7. Além de não apresentarem efeito citotóxico, foi observado um aumento da proliferação celular ao final do ensaio. Os gráficos da figura 4 retrata o efeito proliferativo nos macrófagos estimulados com QS (A) e QSE (B), respectivamente, nas concentrações de 1, 3, 10, 30, 100 e

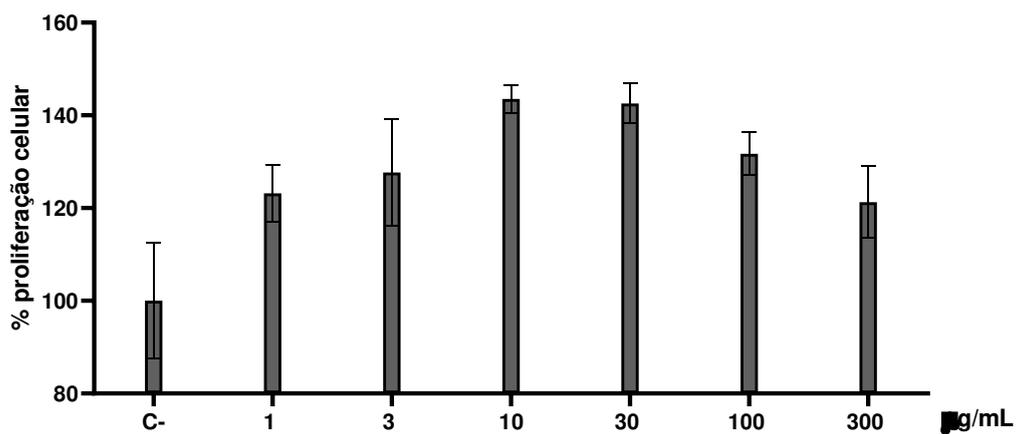
300 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 4: Efeito proliferativo em macrófagos murinos (RAW264.7) estimulados *in vitro* com 1, 3, 10, 30, 100 e 300 $\mu\text{g/mL}$ de QS (A) ou QSE (B). Os valores de absorbância obtidos de um ensaio, em triplicata, foram transformados em percentual de inibição de crescimento e, em seguida, normalizados.

A



B



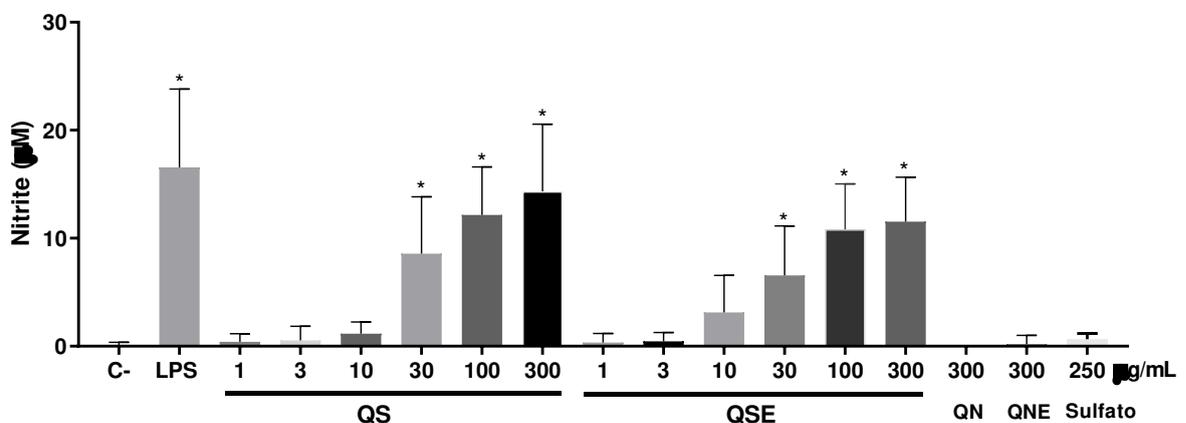
Fonte: elaborado pela autora.

4.3 ESTUDO DO POTENCIAL IMUNOESTIMULANTE EM MODELO DE MACRÓFAGOS *IN VITRO*

4.3.1 Produção de Óxido Nítrico

Nenhuma concentração de QN demonstrou aumento de nível de nitrito, porém concentrações de Quitosana Sulfatada indicaram uma maior produção de NO pelos macrófagos murinos RAW264.7 de forma indireta (Figura 5). Os valores diferiram do controle negativo ($p < 0.05$) nas maiores concentrações de QS e QSE. A figura 5 é referente a três ensaios de Griess, realizados em triplicata. Nela, há a quantidade de nitrito detectada em macrófagos estimulados com salina (C-), 100 ng/mL de LPS, concentrações de 1 a 300 $\mu\text{g/mL}$ de QS, QSE, QN e QNE ou sulfato na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 5: Detecção da produção de nitrito no MC de macrófagos murinos (RAW264.7) estimulados *in vitro* com salina (C-), 100ng/mL de LPS, 1, 3, 10, 30, 100 e 300 $\mu\text{g/mL}$ de QS, QSE, QN e QNE ou 250 $\mu\text{g/mL}$ de sulfato. Os valores de absorbância obtidos de três ensaios realizados em triplicata foram transformados em concentração de nitrito por interpolação e analisados por análise de variância (ANOVA) seguido de pós-teste de Dunnett comparando as amostras com o C-. * $p > 0,05$



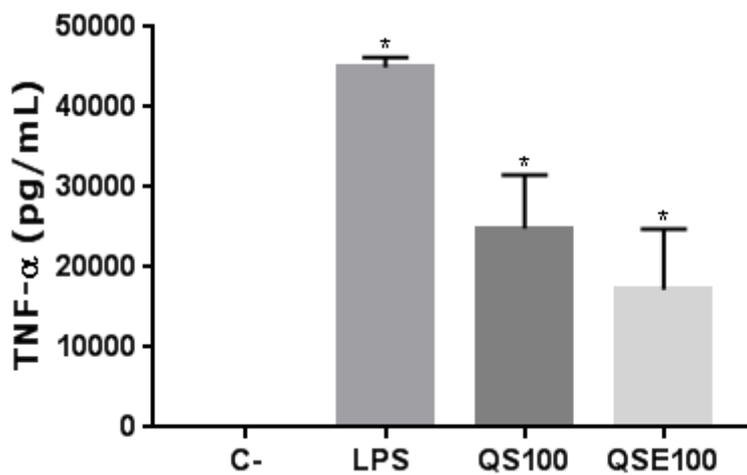
Fonte: elaborado pela autora.

4.3.2 Liberação de citocinas

A concentração da citocina TNF- α no sobrenadante dos M ϕ estimulados foi detectada pelo teste de ELISA. O LPS aumentou (* $p < 0,05$) a concentração de TNF- α , assim como QS e QSE na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. A figura 6 é representativa de um ensaio de ELISA

realizado com três experimentos, em duplicata. A produção de TNF- α foi detectada a partir de macrófagos murinos estimulados com salina (C-), 100 ng/mL de LPS ou 100 μ g/mL de QS ou QSE. Para a realização do gráfico, os valores da absorbância a partir da curva padrão da citocina analisada foram interpolados e analisados por análise de variância (ANOVA) seguido de Dunnett, com * $p < 0,05$ indicando a diferença quando comparado ao controle negativo.

Figura 6: Produção de TNF- α por macrófagos murinos (RAW264.7) estimulados *in vitro* com salina (C-), 100 ng/mL de LPS ou 100 μ g/mL das amostras de QS e QSE após 24h de tratamento. Os valores de um ensaio de ELISA realizado com três experimentos em duplicata estão interpolados e analisados por ANOVA seguido de Dunnett, com * $p < 0,05$.



Fonte: elaborado pela autora.

5 DISCUSSÃO

Os polissacarídeos são uma das principais fontes de novos modificadores de resposta biológica, principalmente por apresentarem baixa toxicidade e atividade imunoestimuladora (RINAUDO, 2008). Dentro desse contexto, a área do estudo de polissacarídeos marinhos está se desenvolvendo bastante, principalmente sobre suas aplicações farmacológicas (LAURIENZO, 2010). Esses polímeros, quando sulfatados, são conhecidos por apresentarem indução de diversos efeitos biológicos desejáveis, inclusive antitumoral e imunoestimulante (LIU et al., 2007; WANG et al., 2010).

A quitosana é um dos compostos com extensa versatilidade por suas características favoráveis mencionadas anteriormente, como biocompatibilidade e atoxicidade (KUMAR et al., 2004). Além disso, ela se destaca por suas atividades que dependem de alterações em sua composição, como peso molecular e sulfatação. Duas quitosanas neutras com baixo peso molecular (3 kDa e 50 kDa) apresentam potencial imunoestimulante por meio da regulação de mRNA para a expressão de citocinas pró-inflamatórias. Entre as duas, o efeito mais exacerbado foi a da quitosana de menor peso molecular (WU et al., 2015). No entanto, quitosana de peso molecular 10 kDa demonstra exercer atividade anti-inflamatória, diminuindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , em inflamação estimulada por LPS (YOON et al., 2007). Também, quitosanas sulfatadas de diferentes pesos moleculares induzem uma produção muito maior de TNF- α e NO em macrófagos RAW264.7 (YANG et al., 2018), linhagem usada também nos outros experimentos.

Embora haja diversos estudos sobre o uso de quitosana como método de *delivery* (CHEUNG et al., 2015), o conhecimento sobre a atividade imunoestimulatória de quitosanas sulfatadas é relativamente pequeno, sendo ainda menor em relação à atividade de partículas de quitosanas sulfatadas na polarização de M ϕ . Tal fato poderia indicar que a quitosana sulfatada seria um ótimo meio de *delivery* de fármacos contra diversas doenças. Além de possuírem características vantajosas para tal, ela agiria também como um adjuvante – estimulando o sistema imunológico do indivíduo. Ademais, a quitosana também diminuiria os efeitos colaterais do fármaco nela inserido, tornando-a um modelo ideal de partícula (KATO; ONISHI; MACHIDA, 2005).

O estudo das estruturas de quitosana contemplou a análise morfológica, a avaliação dos efeitos citotóxicos em M ϕ e do potencial imunoestimulante. A quitosana utilizada foi a do tipo α -quitosana e as amostras utilizadas foram QS, QSE, QN e QNE.

O estudo da morfologia, embora limitado, permite identificar alteração de fenótipo naive.

De acordo com os resultados apresentados, pode-se observar que a aparência das células mudou de acordo com o tratamento, se diferenciando ainda mais com o aumento da concentração. Nas concentrações menores, as células ficaram mais arredondadas e de superfície mais lisa, mais próximas da aparência do controle negativo. No entanto, nas concentrações maiores, os macrófagos aparentaram menos esféricos e com superfície mais rugosa, mais próximas da aparência daquelas tratadas com LPS. Já se é conhecido que macrófagos aderidos, quando estão em tratamento controle, possuem uma aparência esférica, enquanto macrófagos expostos a substâncias ativadoras aparentam mais achatados. Além disso, os macrófagos ativados mostram um aumento em número e tamanho de estruturas semelhantes a vacúolos e superfície menos lisa. Ressalta-se que as alterações de morfologia podem significar polarização, porém para ambos os fenótipos, M1 ou M2 (RAKKESTAD et al., 2010). Assim, pode-se sugerir que, a partir de uma análise morfológica, os macrófagos possuem uma ativação concentração-dependente a partir de contato com as amostras de quitosana., apesar de não ser possível caracterizar o fenótipo da ativação apenas com esse ensaio.

A toxicidade das quitosanas foi testada em macrófagos RAW264.7 em tratamento de 24 horas. As células foram plaqueadas em concentração de 4×10^4 e após contato com as amostras em diferentes concentrações (1 a 300 $\mu\text{g/mL}$) o ensaio do SRB foi realizado para o teste. Os resultados do presente estudo demonstraram que não há citotoxicidade em macrófagos nas concentrações testadas. Yang et al também atestaram tal ocorrência, porém, eles relataram uma diminuição modesta da viabilidade celular (25%) quando a concentração de uma das amostras de quitosana sulfatada era de 200 $\mu\text{g/mL}$, também em tratamento de 24h, o que não foi percebido no presente trabalho (YANG et al., 2018). Além disso, neste trabalho, foi encontrado efeito proliferativo, mesmo na maior concentração de quitosana sulfatada (estruturada e livre) testada (300 $\mu\text{g/mL}$). Assim, tais divergências podem estar relacionadas com algumas diferenças na metodologia. O teste utilizado por Yang e colaboradores foi o ensaio do MTT e o peso molecular da quitosana que inibiu a viabilidade celular foi de 5030 Da. Já no presente estudo, o peso molecular da quitosana neutra comercial utilizada de partida foi entre 1.900 e 310 kDa.

O teste escolhido neste trabalho foi o SRB, pois ele possui algumas vantagens em relação ao MTT. O ensaio do MTT requer atividade metabólica celular para realizar a reação de conversão de um composto sem cor em outro de coloração roxa, detectando assim apenas células viáveis. Como o SRB mede a quantidade total de proteínas, o ensaio independe da atividade metabólica celular. Além disso, alguns compostos que interferem diretamente na redução do MTT não possuem efeitos na viabilidade celular – podendo ser apresentado um resultado não condizente com a realidade –, o que raramente acontece com o SRB. Ainda,

diversos estudos de comparação entre as duas técnicas comprovaram resultados similares entre ambas (VICHAI; KIRTIKARA, 2006).

O sulfato também foi testado para a citotoxicidade. O sulfato não apresentou citotoxicidade nem mesmo na maior concentração testada, 250 µg/mL. Com isso, podemos inferir que o composto utilizado para a produção das amostras sulfatadas não compromete a viabilidade celular. Como as amostras de quitosana neutra – QN e QNE – também obtiveram resultado negativo, torna-se congruente o resultado também negativo das amostras QS e QSE.

A falta de toxicidade direta em células é um resultado comum para macromoléculas dessa natureza. Os polissacarídeos são conhecidos por não possuírem efeitos citotóxicos, mas agem modulando as células imunológicas do indivíduo (SCHEPETKIN; QUINN, 2006; TZIANABOS, 2000). A quitosana é um exemplo de polissacarídeo que é amplamente conhecido por ser não tóxica e biocompatível (THANOUE; VERHOEF; JUNGINGER, 2001), apresentando efeito imunoestimulante, não citotóxico (YANG et al., 2018).

O NO é um mediador infamatório importante para a modulação de respostas imunológicas, além de ser um radical livre altamente reativo (KORHONEN et al., 2005). As atividades imunoestimulatórias das diferentes amostras de quitosana – sulfatadas e não sulfatadas – foram comparadas por meio do ensaio de Griess. Como pode ser observado na Figura 5, as amostras de quitosana sulfatada foram mais efetivas em promoverem a produção de NO. Tal resultado indica que a sulfatação da quitosana aumenta seu efeito imunoestimulador, confirmando os dados de uma recente pesquisa, também com a linhagem de macrófagos murinos RAW264.7 (YANG et al., 2018). No entanto, os pesquisadores registraram que o efeito da β-quitosana sulfatada é o mais efetivo, enquanto a quitosana usada para a produção das amostras estruturadas e não estruturadas no presente estudo foi a α-quitosana.

Também é importante ressaltar que, o sulfato não induziu produção de NO (Figura 5), assim como a QN. Portanto, o sulfato não induziu ativação alguma, assim como a quitosana em estado neutro, mas a sulfatação da quitosana promoveu alteração de seu potencial ativador de macrófagos. De fato, a alteração química da quitosana com sulfato mantém as propriedades físico-químicas e bioquímicas da macromolécula, mas permite o início de propriedades ou aumento da eficiência delas (JAYAKUMAR et al., 2007).

A secreção de TNF-α, importante citocina pró-inflamatórias também foi avaliada. No presente estudo, as QS e QSE na concentração de 100 µg/mL induziu o aumento de TNF-α por macrófagos murinos significativamente (*p<0,05), assim como o LPS 100 ng/mL. O TNF-α é uma citocina inflamatória liberada em grandes quantidades por macrófagos semelhantes a M1 e é conhecido por induzir a apoptose em células tumorais (VACULOVÁ et al., 2002). A

liberação de TNF- α é um estímulo importante para a produção de outros mediadores inflamatórios (MEYER, 2003). Assim, a detecção dessa citocina no presente estudo sugere que os macrófagos ativados foram polarizados para um fenótipo semelhante a M1.

Contrariamente à hipótese inicial, não houve diferença na intensidade de ativação de macrófagos entre QS e QSE. Uma explicação possível para esse resultado é a proximidade do limite máximo de ativação dos macrófagos. Também podemos supor que, diferentemente do PLGA (NICOLETE; SANTOS; FACCIOLI, 2011), uma mudança na estrutura da quitosana sulfatada não altera os níveis de ativação. Para uma melhor compreensão desse aspecto, mais experimentos podem ser feitos, como um ensaio específico para a detecção de fagocitose, ou a repetição dos experimentos com nanopartículas.

A principal vantagem da quitosana sulfatada manter seu potencial imunoestimulante quando estruturada em micropartículas é a sua funcionalização. Como descrito anteriormente, partículas de quitosana já foram utilizadas para a produção de vacinas com antígenos encapsulados (GUO et al., 2018; KOPPOLU; ZAHAROFF, 2013) e para meio de entrega de fármacos anticâncer (ZHANG et al., 2008), aumentando a eficácia da droga e diminuindo seus efeitos colaterais. O resultado do presente estudo pode iniciar um novo campo de estudo em relação à funcionalização de partículas de quitosana com compostos bioativos inseridos. O fator mais interessante, portanto, é que a partícula não seria apenas um meio de transporte, mas ela também possui potencial imunoestimulante.

Uma das vantagens da QSE como tratamento antitumoral seria a sua utilização em terapias que possuem os TAMs como alvo. A estratégia de “reeducação” dos TAMs, convertendo-os de um fenótipo pró-tumoral (semelhante a M2) para um antitumoral (semelhante a M1) é um dos métodos para a utilização de TAMs como alvo de imunoterapias (ALLAVENA; MANTOVANI, 2012). O aumento da proporção de M ϕ semelhantes a M1 no MAT podem potencializar a terapia para o câncer, razão do grande número de pesquisas sobre essa estratégia atualmente (CAI et al., 2012; LIU; CAO, 2015; YANG; ZHANG, 2017). Assim, as QSE podem amplificar o efeito de fármacos, otimizando o tratamento.

O desenvolvimento de um sistema de *delivery* que seja capaz de ter como alvo específico o ambiente tumoral é um dos desafios atuais nessa área. A estruturação de quitosana sulfatada também tem o potencial de facilitar o transporte para um alvo específico, o que diminui taxas de toxicidade no corpo – geralmente relacionada a efeitos não desejados. Assim, o uso de partículas pode se beneficiar de adição de ligantes específicos para receptores que são superexpressos por células tumorais ou células endoteliais angiogênicas, facilitando essa especificidade. Algumas pesquisas abordam o ácido fólico como uma das opções de adição para

direcionamento, já que receptores para essa vitamina são expressos em grandes quantidades em muitos tumores sólidos, como em cânceres de ovário e de mama (DANHIER; FERON; PRÉAT, 2010; SONVICO et al., 2005).

Porém, os benefícios da estruturação de quitosana sulfatada vão além do tratamento do câncer. Como já foi descrito anteriormente, a quitosana é utilizada para a produção de vacinas a partir de antígenos encapsulados. As vantagens do encapsulamento de antígenos em partículas de quitosana neutra na atividade de APCs são conhecidas (KOPPOLU; ZAHAROFF, 2013), mas será que a microestrutura de quitosana sulfatada apresentaria alguma vantagem no processo – sabendo que a sulfatação aumenta os efeitos imunoestimulatórios? Esta seria, portanto, uma outra oportunidade de estudo inovadora em relação a essas partículas.

Um obstáculo para o uso das QSE seria a estimulação da inflamação de modo sistêmico, já que o fenótipo semelhante ao M1 além de ser antitumoral, também é pró-inflamatório (MANTOVANI; VECCHI; ALLAVENA, 2014; MARTINEZ; GORDON, 2014). Porém, pode ser sugerido que a concentração do quimioterápico inserido em cada partícula for alta o suficiente. Assim, o número de partículas não precisa ser tão grande, não promovendo tanta reação de inflamação.

Estudos sobre novas estratégias para o tratamento de doenças relacionadas a células do sistema imunológico – principalmente o câncer – são de grande importância. Além de constituírem métodos inovadores, a terapia a partir de ativação de M ϕ para fenótipos semelhantes a M1 pela presença de partículas de quitosana sulfatada apresenta citotoxicidade insignificante e possui a capacidade de amplificar a resposta de fármacos, sendo adjuvantes em tratamentos convencionais.

Alguns experimentos adicionais podem ser feitos futuramente para aprofundar o conhecimento sobre os processos de ativação dos M ϕ . Um deles seria um ensaio para a confirmação de fagocitose das partículas pelos M ϕ (RUDT; MÜLLER, 1992). Para um melhor entendimento do processo, experimentos para o estudo das vias de ativação podem ser feitos, como por exemplo a análise em microscópio confocal para o ensaio de translocação de NF- κ B fosforilado (NICOLETE; SANTOS; FACCIOLI, 2011).

Para o futuro, também temos a perspectiva de aprofundar mais a pesquisa nessa área nova de utilização de partículas de quitosana – a ativação de M ϕ . Primeiramente, desejamos realizar os experimentos complementares para avaliação da ativação de macrófagos, p.ex. detecção de iNOS e expressão de moléculas co-estimulatórias. Além disso, achamos que a inserção de algum fármaco nas partículas de quitosana seria interessante, como por exemplo, o Paclitaxel –

fármaco anticâncer amplamente utilizado – para fins de avaliar o potencial dessa partícula como um adjuvante.

6 CONCLUSÕES

- A análise de alterações morfológicas sugere que as quitosanas sulfatadas (QS) e quitosanas sulfatadas estruturadas (QSE) induzem a ativação de macrófagos murinos RAW264.7 *in vitro*;
- As amostras de quitosana sulfatadas (QS e QSE) estimularam a proliferação de macrófagos *in vitro*;
- QS e QSE induziram aumento da produção de NO por macrófagos;
- Macrófagos murinos estimulados por QS e QSE liberaram a citocina pró-inflamatória TNF- α ;

A união desses resultados evidencia que, no modelo de macrófagos *in vitro*, as amostras de quitosana sulfatadas – encapsuladas ou não –, possuem potencial imunoestimulante. As amostras QS e QSE demonstraram ativar macrófagos para um fenótipo antitumoral de modo estatisticamente similar. Porém, as micropartículas de quitosana sulfatada possibilitam uma funcionalização maior dessa molécula, permitindo a inserção de fármacos. Além disso, ainda não há trabalhos relatando o efeito imunoestimulante de micropartículas de quitosana sulfatada.

7 REFERÊNCIAS

ALLAVENA, P.; MANTOVANI, A. Immunology in the clinic review series; focus on cancer: tumour-associated macrophages: undisputed stars of the inflammatory tumour microenvironment. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 167, n. 2, p. 195–205, 1 fev. 2012.

BAUMANN, E. Ueber Sulfosäuren im Harn. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 9, n. 1, p. 54–58, 1 jan. 1876.

BISWAS, S. K.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. **Nature Immunology**, v. 11, n. 10, p. 889–896, 20 out. 2010.

BOONYO, W. et al. Chitosan and trimethyl chitosan chloride (TMC) as adjuvants for inducing immune responses to ovalbumin in mice following nasal administration. **Journal of Controlled Release**, v. 121, n. 3, p. 168–175, 28 ago. 2007.

CAI, X. et al. Re-polarization of tumor-associated macrophages to pro-inflammatory M1 macrophages by microRNA-155. **Journal of Molecular Cell Biology**, v. 4, n. 5, p. 341–343, 1 out. 2012.

CHAMPION, J. A.; KATARE, Y. K.; MITRAGOTRI, S. Particle shape: A new design parameter for micro- and nanoscale drug delivery carriers. **Journal of Controlled Release**, v. 121, n. 1–2, p. 3–9, 16 ago. 2007.

CHAMPION, J. A.; WALKER, A.; MITRAGOTRI, S. Role of Particle Size in Phagocytosis of Polymeric Microspheres. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 8, p. 1815–1821, 29 ago. 2008.

CHANG, T. M. SEMIPERMEABLE MICROCAPSULES. **Science (New York, N.Y.)**, v. 146, n. 3643, p. 524–5, 23 out. 1964.

CHAPMAN, E. et al. Sulfotransferases: Structure, Mechanism, Biological Activity, Inhibition, and Synthetic Utility. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 43, n. 27, p. 3526–3548, 5 jul. 2004.

CHEUNG, R. et al. Chitosan: An Update on Potential Biomedical and Pharmaceutical

Applications. **Marine Drugs**, v. 13, n. 8, p. 5156–5186, 14 ago. 2015.

CHONG, C. S. W. et al. Enhancement of T helper type 1 immune responses against hepatitis B virus core antigen by PLGA nanoparticle vaccine delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 102, n. 1, p. 85–99, 20 jan. 2005.

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 set. 2014.

CONNELLY, L. et al. NF-kappaB activation within macrophages leads to an anti-tumor phenotype in a mammary tumor lung metastasis model. **Breast cancer research : BCR**, v. 13, n. 4, p. R83, 31 ago. 2011.

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

DANHIER, F.; FERON, O.; PRÉAT, V. To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 148, n. 2, p. 135–146, 1 dez. 2010.

DE SOUZA, J. R. R. et al. Spray-drying encapsulation of mangiferin using natural polymers. **Food Hydrocolloids**, v. 33, n. 1, p. 10–18, 1 ago. 2013.

DENG, X. et al. Polysaccharides from Chinese Herbal Lycium barbarum Induced Systemic and Local Immune Responses in H22 Tumor-Bearing Mice. **Journal of Immunology Research**, v. 2018, p. 1–12, 3 jun. 2018.

DESAI, U. R. New antithrombin-based anticoagulants. **Medicinal Research Reviews**, v. 24, n. 2, p. 151–181, 1 mar. 2004.

DOSHI, N.; MITRAGOTRI, S. Macrophages Recognize Size and Shape of Their Targets. **PLoS ONE**, v. 5, n. 4, p. e10051, 6 abr. 2010.

DROZD, N. . et al. Comparison of Antithrombin Activity of the Polysulphate Chitosan Derivatives in In Vivo and In Vitro System. **Thrombosis Research**, v. 102, n. 5, p. 445–455, 1 jun. 2001.

EL ENSHASY, H. A.; HATTI-KAUL, R. Mushroom immunomodulators: unique molecules

with unlimited applications. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 12, p. 668–677, 1 dez. 2013.

ELDRIDGE, J. H. et al. Biodegradable microspheres as a vaccine delivery system. **Molecular Immunology**, v. 28, n. 3, p. 287–294, 1 mar. 1991.

FENGYANG, L. et al. Stevioside Suppressed Inflammatory Cytokine Secretion by Downregulation of NF- κ B and MAPK Signaling Pathways in LPS-Stimulated RAW264.7 Cells. **Inflammation**, v. 35, n. 5, p. 1669–1675, 30 out. 2012.

GENG, Y. et al. Immunomodulatory effects of sulfated polysaccharides of pine pollen on mouse macrophages. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 846–855, 1 out. 2016.

GREEN, L. C.; TANNENBAUM, S. R.; GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science (New York, N.Y.)**, v. 212, n. 4490, p. 56–8, 3 abr. 1981.

GUO, J. et al. Chitosan Microsphere Used as an Effective System to Deliver a Linked Antigenic Peptides Vaccine Protect Mice Against Acute and Chronic Toxoplasmosis. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 8, p. 163, 2018.

GUTIERRO, I. et al. Size dependent immune response after subcutaneous, oral and intranasal administration of BSA loaded nanospheres. **Vaccine**, v. 21, n. 1–2, p. 67–77, 22 nov. 2002.

HANSEN, J. M.; COLEMAN, R. L.; SOOD, A. K. Targeting the tumour microenvironment in ovarian cancer. **European Journal of Cancer**, v. 56, p. 131–143, 1 mar. 2016.

HARTLEY, J. W. et al. Expression of infectious murine leukemia viruses by RAW264.7 cells, a potential complication for studies with a widely used mouse macrophage cell line. **Retrovirology**, v. 5, p. 1, 4 jan. 2008.

HOUGHTON, P. et al. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. **Methods**, v. 42, n. 4, p. 377–387, ago. 2007.

JAWORSKA, M. et al. Influence of chitosan characteristics on polymer properties. I: Crystallographic properties. **Polymer International**, v. 52, n. 2, p. 198–205, 1 fev. 2003.

JAYAKUMAR, R. et al. Sulfated chitin and chitosan as novel biomaterials. **International**

Journal of Biological Macromolecules, v. 40, n. 3, p. 175–181, 28 fev. 2007.

KATO, Y.; ONISHI, H.; MACHIDA, Y. Contribution of chitosan and its derivatives to cancer chemotherapy. **In vivo (Athens, Greece)**, v. 19, n. 1, p. 301–10, 1 jan. 2005.

KHIL'CHENKO, S. R. et al. Immunostimulatory Activity of Fucoidan from the Brown Alga *Fucus evanescens*: Role of Sulfates and Acetates. **Journal of Carbohydrate Chemistry**, v. 30, n. 4–6, p. 291–305, maio 2011.

KOPPOLU, B.; ZAHAROFF, D. A. The effect of antigen encapsulation in chitosan particles on uptake, activation and presentation by antigen presenting cells. **Biomaterials**, v. 34, n. 9, p. 2359–2369, 1 mar. 2013.

KORHONEN, R. et al. Nitric oxide production and signaling in inflammation. **Current drug targets. Inflammation and allergy**, v. 4, n. 4, p. 471–9, ago. 2005.

KUMAR, M. N. V. R. et al. Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives. 2004.

LANGER, R. New methods of drug delivery. **Science**, v. 249, n. 4976, p. 1527–1533, 28 set. 1990.

LAURIENZO, P. Marine Polysaccharides in Pharmaceutical Applications: An Overview. **Marine Drugs**, v. 8, n. 9, p. 2435–2465, 2 set. 2010.

LI, X. et al. The natural product chitosan enhances the anti-tumor activity of natural killer cells by activating dendritic cells. **OncoImmunology**, v. 7, n. 6, p. e1431085, 3 jun. 2018.

LIU, C. et al. Characterization and antitumor activity of a polysaccharide from *Strongylocentrotus nudus* eggs. **Carbohydrate Polymers**, v. 67, n. 3, p. 313–318, 1 fev. 2007.

LIU, Y.; CAO, X. The origin and function of tumor-associated macrophages. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 12, n. 1, p. 1–4, 15 jan. 2015.

LUTSIAK, M. E. C. et al. Analysis of Poly(D,L-Lactic-Co-Glycolic Acid) Nanosphere Uptake by Human Dendritic Cells and Macrophages In Vitro. **Pharmaceutical Research**, v. 19, n. 10, p. 1480–1487, 2002.

MANTOVANI, A. et al. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a

paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Trends in Immunology**, v. 23, n. 11, p. 549–555, 1 nov. 2002.

MANTOVANI, A. et al. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 14, n. 7, p. 399–416, 24 jan. 2017.

MANTOVANI, A.; VECCHI, A.; ALLAVENA, P. Pharmacological modulation of monocytes and macrophages. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 17, p. 38–44, 1 ago. 2014.

MARTINEZ, F. O.; GORDON, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. **F1000prime reports**, v. 6, p. 13, 2014.

MEYER, O. Role of TNF-alpha and cytokines in the physiopathology of rheumatoid arthritis. Therapeutic perspectives. **Bulletin de l'Academie nationale de medecine**, v. 187, n. 5, p. 935- 54; discussion 954–5, 2003.

MIZUMOTO, K. et al. Sulfated homopolysaccharides with immunomodulating activities are more potent anti-HTLV-III agents than sulfated heteropolysaccharides. **The Japanese journal of experimental medicine**, v. 58, n. 3, p. 145–51, jun. 1988.

MORÁN-SANTIBAÑEZ, K. et al. Synergistic Effects of Sulfated Polysaccharides from Mexican Seaweeds against Measles Virus. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1–11, 22 jun. 2016.

NICOLETE, R.; SANTOS, D. F. DOS; FACCIOLI, L. H. The uptake of PLGA micro or nanoparticles by macrophages provokes distinct in vitro inflammatory response. **International Immunopharmacology**, v. 11, n. 10, p. 1557–1563, 1 out. 2011.

PARK, J. K. et al. Effects of the Molecular Weight and the Degree of Deacetylation of Chitosan Oligosaccharides on Antitumor Activity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 1, p. 266–277, 6 jan. 2011.

PARK, P.-J.; JE, J.-Y.; KIM, S.-K. Free Radical Scavenging Activity of Chitooligosaccharides by Electron Spin Resonance Spectrometry. 2003.

PATIL, U. S.; JAYDEOKAR, A. V; BANDAWANE, D. D. Immunomodulators: a pharmacological review. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical**

Sciences, v. 4, 2012.

PAULSEN, B. Plant Polysaccharides with Immunostimulatory Activities. **Current Organic Chemistry**, v. 5, n. 9, p. 939–950, 1 set. 2001.

PILLAI, O.; PANCHAGNULA, R. Polymers in drug delivery. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 5, n. 4, p. 447–451, 1 ago. 2001.

PRABAHARAN, M.; MANO, J. F. Chitosan-Based Particles as Controlled Drug Delivery Systems. **Drug Delivery**, v. 12, n. 1, p. 41–57, 10 jan. 2004.

RABEA, E. I. et al. Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action. 2003.

RAKKESTAD, K. E. et al. Mono(2-ethylhexyl) phthalate induces both pro- and anti-inflammatory responses in rat alveolar macrophages through crosstalk between p38, the lipooxygenase pathway and PPAR α . **Inhalation Toxicology**, v. 22, n. 2, p. 140–150, 25 fev. 2010.

RAMOS, L. A.; CAVALHEIRO, C. C. S.; CAVALHEIRO, É. T. G. Determinação de nitrito em águas utilizando extrato de flores. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 1114–1120, out. 2006.

RHOADES, J.; ROLLER, S. Antimicrobial actions of degraded and native chitosan against spoilage organisms in laboratory media and foods. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, n. 1, p. 80–6, 1 jan. 2000.

RINAUDO, M. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. **Polymer International**, v. 57, n. 3, p. 397–430, 1 mar. 2008.

ROBBINS, P. W.; LIPMANN, F. Identification of enzymatically active sulfate as adenosine-3'-phosphate-5'-phospho-sulfate. **Journal of the American Chemical Society**, v. 78, n. 11, p. 2652–2653, jun. 1956.

RUBINSTEIN, L. V et al. Comparison of in vitro anticancer-drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1113–8, 4 jul. 1990.

RUDD, S.; MÜLLER, R. H. In vitro phagocytosis assay of nano- and microparticles by

chemiluminescence. I. Effect of analytical parameters, particle size and particle concentration. **Journal of Controlled Release**, v. 22, n. 3, p. 263–271, 1 nov. 1992.

SCHEPETKIN, I. A.; QUINN, M. T. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. **International Immunopharmacology**, v. 6, n. 3, p. 317–333, 1 mar. 2006.

SCHERLIESS, R. et al. In vivo evaluation of chitosan as an adjuvant in subcutaneous vaccine formulations. **Vaccine**, v. 31, n. 42, p. 4812–4819, 1 out. 2013.

SHAHBAZI, S.; BOLHASSANI, A. Immunostimulants: Types and Functions. **Journal of Medical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 4, n. 3, p. 45–51, 2016.

SHARMA, P. et al. Immunomodulators: Role of medicinal plants in immune system. **National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology**, v. 552, n. 6, 2017.

SHUKLA, S. K. et al. Chitosan-based nanomaterials: A state-of-the-art review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 59, p. 46–58, 1 ago. 2013.

SICA, A. et al. Macrophage polarization in pathology. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 21, p. 4111–4126, 26 nov. 2015.

SICA, A.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 3, p. 787–795, 1 mar. 2012.

SKEHAN, P. et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1107–12, 4 jul. 1990.

SONVICO, F. et al. Folate-Conjugated Iron Oxide Nanoparticles for Solid Tumor Targeting as Potential Specific Magnetic Hyperthermia Mediators: Synthesis, Physicochemical Characterization, and in Vitro Experiments. **Bioconjugate Chemistry**, 2005.

SZEBENI, J.; ALVING, C. R.; MUGGIA, F. M. Complement Activation by Cremophor EL as a Possible Contributor to Hypersensitivity to Paclitaxel: an In Vitro Study. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, n. 4, p. 300–306, 18 fev. 1998.

TABATA, Y.; IKADA, Y. Macrophage phagocytosis of biodegradable microspheres composed of L-lactic acid/glycolic acid homo- and copolymers. **Journal of Biomedical**

Materials Research, v. 22, n. 10, p. 837–858, 1 out. 1988.

TAYEL, A. A. et al. Control of citrus molds using bioactive coatings incorporated with fungal chitosan/plant extracts composite. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 4, p. 1306–1312, 1 mar. 2016.

THANOOU, M.; VERHOEF, J. .; JUNGINGER, H. . Oral drug absorption enhancement by chitosan and its derivatives. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 52, n. 2, p. 117–126, 5 nov. 2001.

THIELE, L. et al. Evaluation of particle uptake in human blood monocyte-derived cells in vitro. Does phagocytosis activity of dendritic cells measure up with macrophages? **Journal of Controlled Release**, v. 76, n. 1–2, p. 59–71, 11 set. 2001.

TIAN, G. Y. et al. Synthesis of *Achyranthes bidentata* polysaccharide sulfate and its antiviral activity. **Yao xue xue bao = Acta pharmaceutica Sinica**, v. 30, n. 2, p. 107–11, 1995.

TOKORO, A. et al. Growth-inhibitory effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose against Meth-A solid tumor. **CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN**, v. 36, n. 2, p. 784–790, 25 fev. 1988.

TURVEY, S. E.; BROIDE, D. H. Innate immunity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2, p. S24–S32, 1 fev. 2010.

TZIANABOS, A. O. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function. **Clinical microbiology reviews**, v. 13, n. 4, p. 523–33, 1 out. 2000.

UHRICH, K. E. et al. *Polymeric Systems for Controlled Drug Release*. 1999.

VACULOVÁ, A. et al. Tumor necrosis factor- α induces apoptosis associated with poly(ADP-ribose) polymerase cleavage in HT-29 colon cancer cells. **Anticancer research**, v. 22, n. 3, p. 1635–9, 2002.

VAN VLERKEN, L. E.; VYAS, T. K.; AMIJI, M. M. Poly(ethylene glycol)-modified Nanocarriers for Tumor-targeted and Intracellular Delivery. **Pharmaceutical Research**, v. 24, n. 8, p. 1405–1414, 29 ago. 2007.

VICHAI, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1112–1116, 17 ago. 2006.

VINOGRADOV, S.; WARREN, G.; WEI, X. Macrophages associated with tumors as potential targets and therapeutic intermediates. **Nanomedicine**, v. 9, n. 5, p. 695–707, 15 abr. 2014.

WANDERLEY, C. W. DE S. **Paclitaxel reduz o crescimento tumoral através da reprogramação de macrófagos associados ao tumor para o perfil M1 via TLR4.** [s.l.] Universidade Federal do Ceará, 2018.

WANG, F.-J.; WANG, C.-H. Sustained release of etanidazole from spray dried microspheres prepared by non-halogenated solvents. **Journal of Controlled Release**, v. 81, n. 3, p. 263–280, 17 jun. 2002.

WANG, J. et al. Sulfated modification can enhance the immune-enhancing activity of lycium barbarum polysaccharides. **Cellular Immunology**, v. 263, n. 2, p. 219–223, 1 jan. 2010.

WU, N. et al. Immunostimulative Activity of Low Molecular Weight Chitosans in RAW264.7 Macrophages. **Marine Drugs**, v. 13, n. 10, p. 6210–6225, 30 set. 2015.

YANG, J. et al. Sulfation of Chinese lacquer polysaccharides in different solvents. **Carbohydrate Polymers**, v. 52, n. 4, p. 397–403, 1 jun. 2003.

YANG, L.; ZHANG, Y. Tumor-associated macrophages: from basic research to clinical application. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 10, n. 1, p. 58, 28 dez. 2017.

YANG, Y. et al. Immunostimulatory effects of sulfated chitosans on RAW 264.7 mouse macrophages via the activation of PI3 K/Akt signaling pathway. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 1310–1321, 1 mar. 2018.

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.

YLITALO, R. et al. Cholesterol-lowering Properties and Safety of Chitosan. **Arzneimittelforschung**, v. 52, n. 01, p. 1–7, 26 dez. 2011.

YOON, H. J. et al. Chitosan oligosaccharide (COS) inhibits LPS-induced inflammatory

effects in RAW 264.7 macrophage cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 358, n. 3, p. 954–959, 6 jul. 2007.

YU, Y. et al. Chitosan Oligosaccharides Attenuate Atherosclerosis and Decrease Non-HDL in ApoE^{-/-} Mice. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 22, n. 9, p. 926–941, 16 set. 2015.

ZHANG, C. et al. Pharmacokinetics, biodistribution, efficacy and safety of N-octyl-O-sulfate chitosan micelles loaded with paclitaxel. **Biomaterials**, v. 29, n. 9, p. 1233–1241, 1 mar. 2008.

ZHAO, X. et al. The comparison of immune-enhancing activity of sulfated polysaccharides from Tremella and Condonopsis pilosula. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 1, p. 438–443, 15 out. 2013.