



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

ALEXIA NATHÁLIA BRÍGIDO ASSEF

**POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE ALGAS PARDAS INIBEM O
CRESCIMENTO TUMORAL ATRAVÉS DA MODULAÇÃO DE MACRÓFAGOS**

FORTALEZA

2023

ALEXIA NATHÁLIA BRÍGIDO ASSEF

POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE ALGAS PARDAS INIBEM O CRESCIMENTO
TUMORAL ATRAVÉS DA MODULAÇÃO DE MACRÓFAGOS

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

Orientador: Prof. Dr. Diego Veras Wilke.

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

FORTALEZA

2023

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)

- A863p Assef, Alexia Nathália Brígido.
Polissacarídeos sulfatados de algas pardas inibem o crescimento tumoral através da modulação de macrófagos / Alexia Nathália Brígido Assef. – 2023.
117 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2023.
Orientação: Prof. Dr. Diego Veras Wilke.
Coorientação: Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior.
1. Polissacarídeos. 2. Imunoestimulante. 3. Macrófagos Associados a Tumor. 4. Dacarbazina. I. Título.
CDD 615.1
-

ALEXIA NATHÁLIA BRÍGIDO ASSEF

POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE ALGAS PARDAS INIBEM O CRESCIMENTO
TUMORAL ATRAVÉS DA MODULAÇÃO DE MACRÓFAGOS

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

Aprovada em: 15/09/2023.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior (co-orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dra. Deysi Tenazoa Wong
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. José Delano Barreto Marinho Filho
Universidade Federal do Delta do Parnaíba (UFDPAr)

Prof^a. Maria Izabel Florindo Guedes
Universidade Federal do Ceará (UECE)

Prof. Dr. Maurício Fraga van Tilburg
Fundação Oswaldo Cruz no Ceará (FIOCRUZ)

A Deus.

Aos meus avós, por todo cuidado e amor.

AGRADECIMENTOS

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

Ao meu orientador, Dr. Diego Veras Wilke, por todo ensinamento, orientação e paciência durante esses mais de 10 anos. Obrigada pelo entusiasmo constante, com a certeza de que tudo daria certo da melhor forma possível, me incentivando sempre a não desistir e por toda ajuda para que esse trabalho fosse realizado.

Ao meu coorientador, professor Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior, por todo o conhecimento passado, por toda disponibilidade em ajudar e ensinar! Sua participação também foi essencial para realização deste trabalho.

Aos membros do Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia Marinha (LaBBMar) por todos os momentos compartilhados, por toda ajuda e por trilharem esse caminho tão desafiador ao meu lado. Meu agradecimento a cada um que auxiliou de alguma forma na finalização deste trabalho. Em especial a minha eterna pupila Keilla que chegou como aluna de iniciação científica e se tornou uma grande amiga.

Aos membros da banca por aceitarem participar deste momento tão enriquecedor e contribuírem para a melhoria do meu trabalho.

Ao meu marido e companheiro de vida científica, Felipe Barros, que vem trilhando esse caminho há mais de 10 anos ao meu lado; A nossa parceria me ajudou a chegar até aqui, nossas conversas e discussões produtivas tarde da noite, experimentos e companheirismo em todos os âmbitos da minha vida. Você foi e é essencial para que eu tenha alcançado mais essa conquista. Muito obrigada por ser inspiração sempre, amo você!

À minha avó Neide e meu avô José Maria (*in memoriam*), por terem me ensinado tudo que sei e por terem permitido que eu tivesse a vida que eu tenho hoje. Sem vocês eu nem estaria aqui e nem teria chegado tão longe! A vocês, todas as minhas conquistas presentes e futuras!

À minha irmã Juliana, que tem sido a minha válvula de escape dos momentos difíceis nos últimos tempos. Obrigada pela parceria, pelas conversas e pelo apoio incondicional. Você tem segurado a minha mão sem esperar nada em troca a vida toda e eu amo você eternamente. Da sua irmã preferida da vida.

Aos meus pais, por me permitirem estar neste mundo e por apoiarem minhas decisões e vibrarem sempre com as minhas conquistas.

À toda a minha família pela força, apoio e suporte durante toda a minha vida, seja pessoal ou científica.

Aos demais amigos por toda torcida e carinho.

À Instituição CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Ao apoio técnico da Unidade Multiusuário do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da UFC pelo suporte para realização de diversos experimentos deste trabalho.

“A perseverança é a mãe da boa sorte.”
(Miguel de Cervantes)

RESUMO

POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE ALGAS PARDAS INIBEM O CRESCIMENTO TUMORAL ATRAVÉS DA MODULAÇÃO DE MACRÓFAGOS

O câncer é bastante complexo e constituído por diversas células não tumorais que contribuem, junto com as células tumorais, para a formação do microambiente tumoral (MAT) que favorece a progressão e o aumento da agressividade do tumor. Dentre as células não-tumorais que estão inseridas no MAT, os macrófagos associados ao tumor (TAMs) possuem um papel fundamental. Os macrófagos possuem uma alta plasticidade fenotípica, podendo exibir tanto um perfil antitumoral, quando são ativados pela via clássica (fenótipo semelhante a M1), como um perfil pró-tumoral, característicos dos TAMs, quando sofrem ativação alternativa (fenótipo com predomínio de marcadores M2). De fato, os TAMs estão frequentemente relacionados a um pior prognóstico para o paciente. Os polissacarídeos sulfatados (PS), especialmente as fucoidanas de algas pardas, têm se destacado nos últimos anos como potentes modificadores da resposta biológica aumentando a resposta antitumoral através da imunomodulação. Trabalhos anteriores do grupo demonstraram que polissacarídeos sulfatados da alga *Dictyota caribaea* foram capazes de inibir o crescimento tumoral da linhagem S-180 *in vivo* apesar de não apresentar citotoxicidade direta contra essa linhagem *in vitro*. Além disso, o meio condicionado (MC) desses macrófagos ativados apresentou um efeito antiproliferativo contra células de melanoma murino B16-F10 *in vitro*. O presente estudo está dividido em dois capítulos e teve como objetivo avaliar o efeito antitumoral das fucoidanas de *Dictyota caribaea* (Dc-SP) e de *Macrocystis pyrifera* (Mp-SP), quanto a sua capacidade de inibição do crescimento tumoral e modulação de macrófagos para um fenótipo M1. No capítulo I, uma linhagem de macrófagos RAW 264.7 foi estimulada com Dc-SP (10, 100, 250 µg/mL) ou LPS (100 ng/mL) e foram avaliados os marcadores fenotípicos de polarização de macrófagos M1. No capítulo II, além da avaliação da polarização do macrófago RAW 264.7 ativados com Mp-SP *in vitro*, os macrófagos associados ao tumor no MAT dos animais transplantados com B16-F10 foram caracterizados. Os tumores e órgãos foram coletados e os TAMs isolados para caracterização fenotípica através de marcadores específicos de M1 e M2 por de citometria. Além disso, investigou-se o efeito antitumoral da associação de Mp-SP (50 mg/Kg) com o quimioterápico Dacarbazina (50 mg/Kg) *in vivo*. Em condições *in vitro*, os estímulos com Dc-SP e Mp-SP foram capazes de polarizar macrófagos RAW 264.7 para o perfil M1, com aumento da produção de óxido nítrico (NO), aumento da expressão de marcadores de superfície CD86 e MHC II e marcador intracelular iNOS. Para Mp-SP, foi observado que parte do efeito antitumoral apresentado neste trabalho estava associado a modulação do perfil fenotípico dos TAMs. A imunofenotipagem dos TAMs isolados de tumores dos camundongos tratados com Mp-SP, mostrou uma redução na expressão de marcador M2 (CD206) e um aumento na expressão de um dos principais marcadores para M1 (iNOS) que foi relacionada com a inibição do crescimento tumoral dos animais. Além disso, a associação de Mp-SP com Dacarbazina apresentou uma redução do crescimento tumoral quando comparado aos grupos tratados com salina ou grupos de PS e dacarbazina isolados. Esses dados indicam que ambas fucoidanas promovem uma polarização de TAMs para um perfil semelhante a M1 e que Mp-SP conseguiu reduzir a quantidade de TAMs com fenótipo semelhante a M2, e esse efeito contribui para sua eficácia antitumoral. Além disso, a imunoestimulação de Mp-SP no MAT pode ter contribuído para a sensibilização terapêutica da dacarbazina no efeito antitumoral quando associada à fucoidana.

Palavras-chave: Polissacarídeos; Imunoestimulante; Macrófagos Associados a Tumor;
Dacarbazina

ABSTRACT

SULFATED POLYSACCHARIDES FROM BROWN ALGAE INHIBIT TUMOR GROWTH THROUGH MACROPHAGE MODULATION

Cancer is highly complex and composed of various non-tumor cells that contribute, along with tumor cells, to the formation of the tumor microenvironment (TME) that promotes tumor progression and increased aggressiveness. Among the non-tumor cells embedded in the TME, tumor-associated macrophages (TAMs) play a crucial role. Macrophages exhibit high phenotypic plasticity, capable of displaying both an anti-tumor profile when activated through the classical pathway (M1-like phenotype) and a pro-tumor profile characteristic of TAMs when subjected to alternative activation (predominantly M2 marker phenotype). Indeed, TAMs are often associated with a poorer prognosis for the patient. Sulfated polysaccharides (SPs), especially fucoidans from brown algae, have emerged in recent years as potent modifiers of biological response, enhancing anti-tumor responses through immunomodulation. Previous studies by the group demonstrated that sulfated polysaccharides from the alga *Dictyota caribaea* were able to inhibit the tumor growth of the S-180 cell line *in vivo*, despite not showing direct cytotoxicity against this cell line *in vitro*. Furthermore, the conditioned medium (CM) of these activated macrophages exhibited an antiproliferative effect against murine B16-F10 melanoma cells *in vitro*. This study is divided into two chapters and aimed to evaluate the antitumor effect of fucoidans from *Dictyota caribaea* (Dc-SP) and *Macrocystis pyrifera* (Mp-SP), regarding their ability to inhibit tumor growth and modulate macrophages towards an M1 phenotype. In Chapter I, a RAW 264.7 macrophage cell line was stimulated with Dc-SP (10, 100, 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or LPS (100 ng/mL), and phenotypic markers of M1 macrophage polarization were evaluated. In Chapter II, in addition to the evaluation of macrophage polarization of RAW 264.7 cells activated with Mp-SP *in vitro*, tumor-associated macrophages in the TME of mice transplanted with B16-F10 were characterized. Tumors and organs were collected, and TAMs were isolated for phenotypic characterization using specific M1 and M2 markers via flow cytometry. Furthermore, the antitumor effect of the combination of Mp-SP (50 mg/kg) with the chemotherapeutic agent Dacarbazine (50 mg/kg) was investigated *in vivo*. Under *in vitro* conditions, stimulation with Dc-SP and Mp-SP was able to polarize RAW 264.7 macrophages towards the M1 profile, with increased production of nitric oxide (NO), increased expression of surface markers CD86 and MHC II, and intracellular marker iNOS. For Mp-SP, it was observed that part of the antitumor effect presented in this study was associated with modulation of the TAM phenotypic profile. Immunophenotyping of TAMs isolated from tumors in mice treated with Mp-SP showed a reduction in the expression of the M2 marker (CD206) and an increase in the expression of one of the main markers for M1 (iNOS), which was related to the inhibition of tumor growth in the animals. Furthermore, the combination of Mp-SP with Dacarbazine resulted in a reduction in tumor growth when compared to the saline-treated groups or groups treated with PS and Dacarbazine alone. These data indicate that both fucoidans promote polarization of TAMs towards an M1-like profile, and that Mp-SP was able to reduce the number of TAMs with an M2-like phenotype, and this effect contributes to its antitumor efficacy. Additionally, the immunostimulation of Mp-SP in the TME may have contributed to the therapeutic sensitization of dacarbazine in the antitumor effect when combined with fucoidan.

Keywords: Polysaccharides; Immunostimulant; Tumor Associated Macrophages;
Dacarbazine

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-----------|--|----|
| Figura 1 | – Características funcionais do câncer | 15 |
| Figura 2 | – Células que compõem o microambiente tumoral | 16 |
| Figura 3 | – Plasticidade fenotípica dos macrófagos..... | 17 |
| Figura 4 | – Características da invasão dérmica no melanoma..... | 17 |
| Figura 5 | – Número de publicações sobre macrófagos associados ao tumor como alvos na terapêutica antitumoral relacionados ao sistema imune desde a década de 1980 até 2023..... | 24 |
| Figura 6 | – Diferentes estímulos levam a uma polarização dos macrófagos para o perfil M1 ou M2 | 28 |
| Figura 7 | – Efeito antiproliferativo do meio condicionado de macrófagos estimulados com polissacarídeo sulfatado de <i>Dictyota caribaea</i> contra células de melanoma B16-F10..... | 30 |
| Figura 8 | – Planejamento experimental do trabalho..... | 32 |
| Figura 9 | – Imagem da alga <i>Dictyota caribaea</i> | 33 |
| Figura 10 | – Imagem do sítio de coleta da alga..... | 34 |
| Figura 11 | – Fotomicrografia da linhagem de melanoma murino B16-F10..... | 35 |
| Figura 12 | – Fotomicrografia da linhagem Raw 264.7..... | 35 |
| Figura 13 | – Reação de Griess..... | 36 |
| Figura 14 | – Polissacarídeo sulfatado da alga parda <i>Dictyota caribaea</i> induz macrófagos para um fenótipo M1..... | 41 |
| Figura 15 | – Polissacarídeo sulfatado da alga parda <i>Dictyota caribaea</i> induz a expressão de marcadores de superfície e intracelular..... | 43 |
| Figura 16 | – Planejamento experimental do trabalho..... | 51 |
| Figura 17 | – Imagem da alga parda <i>Macrocystis pyrifera</i> | 52 |
| Figura 18 | – Esquema do ensaio de seleção de dose..... | 55 |

| | | |
|-----------|--|----|
| Figura 19 | – Esquema do ensaio de imunofenotipagem <i>in vivo</i> | 56 |
| Figura 20 | – Estratégia para seleção de populações (gates) para imunofenotipagem..... | 58 |
| Figura 21 | – Esquema do ensaio de associação de Mp-SP com Dacarbazina | 59 |
| Figura 22 | – Avaliação do efeito antiproliferativo de Mp-SP e ativação de macrófagos RAW264.7 para o perfil M1..... | 61 |
| Figura 23 | – Efeito antitumoral de Mp-SP contra linhagem de melanoma murino B16-F10 | 63 |
| Figura 24 | – Parâmetros hematológicos do sangue periférico de camundongos transplantados com B16-F10..... | 64 |
| Figura 25 | – Expressão de marcadores de superfície e intracelular de macrófagos M1 e M2..... | 66 |
| Figura 26 | – Populações de macrófagos expressando marcadores M1 e M2..... | 67 |
| Figura 27 | – Parâmetros do ensaio antitumoral da associação de Mp-SP com quimioterápico Dacarbazina..... | 70 |
| Figura 28 | – Peso dos órgãos dos animais transplantados com melanoma B16-F10..... | 72 |
| Figura 29 | – Desenho esquemático da inibição tumoral causada pelo polissacarídeo sulfatado da <i>Macrocystis piryfera</i> por meio da modulação de macrófagos no microambiente tumoral..... | 73 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---------------|---|
| ANOVA | Análise de Variância |
| B16-F10 | Linhagem Melanoma Murino |
| Dc-SP | Polissacarídeo sulfatado da <i>Dictyota caribaea</i> |
| DMEM | Dulbecco's modified Eagle's médium |
| DOX | Doxorrubicina |
| FSC | Desvio frontal, do inglês Forward scatter |
| INCA | Instituto Nacional de Câncer |
| LPS | Lipopolissacarídeo de Escherichia coli |
| M1 | Macrófagos ativados pela via clássica |
| M2 | Macrófagos ativados pela via alternativa |
| Mp-SP | Polissacarídeo sulfatado da <i>Macrocystis pyrifera</i> |
| MAT | Microambiente tumoral |
| NO | Óxido Nítrico, do inglês Nitric Oxide |
| PBS | Solução tampão salina, do inglês Phosphate Buffer Solution |
| PI | Iodeto de propídeo, do inglês Propidium Iodide |
| PS | Polissacarídeo sulfatado |
| RAW 264.7 | Linhagem macrófagos murinos |
| MC | Meio condicionado |
| SRB | Sulforrodamina B |
| SSC | Desvio lateral, do inglês Side Scatter |
| FSC | Desvio frontal, do inglês Foward Scatter |
| IL-10 | Interleucina 10 |
| IL-1 β | Interleucina 1 β |
| IL-12 | Interleucina 12 |
| TNF- α | Fator de necrose tumoral α |
| NK | Células assassinas naturais, do inglês <i>natural killer</i> |
| INF- γ | Interferon γ |
| TAM | Macrófagos associados ao tumor, do inglês <i>Tumor associated macrophages</i> |
| TGF- β | Fator de transformação do crescimento |
| Mfs | Macrófagos |
| VEGF | Fator de crescimento endotelial vascular |

| | |
|--------|---|
| TH1 | Linfócito T auxiliar tipo 1 |
| TH2 | Linfócito T auxiliar tipo 2 |
| INCA | Instituto Nacional do Câncer |
| PAMPs | Padrões moleculares associados a patógenos |
| DAMPs | Padrões moleculares associados a danos celulares |
| MMP | Metaloprotease |
| CTLA4 | Antígeno 4 do linfócito T citotóxico |
| PDL-1 | Ligante 1 de morte celular programada |
| IUPAC | União Internacional de Química Pura e Aplicada |
| TLR4 | Receptor do tipo Toll 4 |
| ICI | Inibidores de checkpoint imunológico |
| PSK | Polissacarídeos sulfatado Krestina |
| GM-CSF | Fator estimulante do crescimento de granulócitos e macrófagos |
| iNOS | Óxido nítrico sintase induzida |
| SR | Receptor de varredura |
| A-MuLV | Vírus da leucemia murina de Abelson |
| 5-FU | 5 fluorouracila |
| DCZ | Dacarbazina |
| DC | Células dendríticas |
| MEC | Matriz Extracelular |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO GERAL | 14 |
| 1.1 Câncer | 14 |
| 1.2 Melanoma | 17 |
| 1.3 Produtos Naturais | 20 |
| 1.4 Polissacarídeos sulfatados de algas marinhas | 21 |
| 1.5 Fucoïdanas modificadoras da resposta biológica | 21 |
| 1.6 Justificativa e Relevância | 23 |
| 1.7 Objetivo Geral | 26 |
| 2 CAPÍTULO I | 27 |
| 2 INTRODUÇÃO | 28 |
| 3 OBJETIVOS | 32 |
| 3.1 Geral..... | 32 |
| 3.2 Específicos..... | 32 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS | 33 |
| 4.1 Planejamento experimental..... | 33 |
| 4.2 Isolamento de polissacarídeo sulfatado de <i>Dictyota caribaea</i> (Dc-SP)..... | 34 |
| 4.3 Linhagens celulares, procedimentos de cultura celular e tratamentos..... | 35 |
| 4.4 Avaliação da ativação de macrófagos para fenótipo M1..... | 37 |
| 4.4.1 Dosagem de nitrito | 37 |
| 4.4.1.1 Procedimentos..... | 37 |
| 4.4.1.2 Análise estatística..... | 38 |
| 4.4.2 Dosagem de citocinas | 38 |
| 4.4.2.1 Procedimentos..... | 38 |
| 4.4.2.2 Análise estatística..... | 39 |
| 4.4.3 Análise de marcadores de superfície e intracelular de macrófagos M1 por citometria de fluxo..... | 39 |
| 4.4.3.1 Procedimentos..... | 40 |
| 4.4.3.2 Análise estatística..... | 40 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 41 |
| 6 CONCLUSÕES | 47 |
| 7 CAPÍTULO II | 48 |
| 8 INTRODUÇÃO | 49 |
| 9 OBJETIVOS | 52 |
| 9.1 Geral..... | 52 |
| 9.2 Específicos..... | 52 |

| | |
|--|-----|
| 10 MATERIAIS E MÉTODOS | 53 |
| 10.2 Obtenção da fucoidana da alga parda <i>Macrocystis pyrifera</i> | 53 |
| 10.3 Linhagens celulares, procedimentos de cultura celular e tratamentos..... | 54 |
| 10.4 Avaliação do efeito antiproliferativo de Mp-SP..... | 54 |
| 10.4.1 Ensaio de SRB | 55 |
| 10.5 Avaliação do potencial imunestimulante através da ativação de macrófagos para fenótipo M1 <i>in vitro</i> | 55 |
| 10.5.1 Dosagem de nitrito | 55 |
| 10.5.2 Análise de marcadores de superfície e intracelular de macrófagos M1 por citometria de fluxo..... | 56 |
| 10.6 Ensaios <i>in vivo</i> | 57 |
| 10.6.1. Animais..... | 57 |
| 10.6.2 Avaliação do efeito antitumoral de Mp-SP | 57 |
| 10.6.2.1 Seleção de doses de Mp-SP..... | 58 |
| 10.6.3 Avaliação da expressão de marcadores de superfície e intracelular de macrófagos M1 e M2 <i>in vivo</i> | 59 |
| 10.6.3.1 Modelo de melanoma murino..... | 59 |
| 10.6.3.2 Isolamento de macrófagos associados a tumor (TAMs) | 60 |
| 10.6.3.3 Imunofenotipagem das populações de macrófagos por citometria de fluxo | 61 |
| 10.6.3.4 Estratégia de seleção (gate) das subpopulações de macrófagos | 61 |
| 10.6.4 Avaliação da associação de Mp-SP com quimioterápico Dacarbazina | 62 |
| 10.6.4.1 Análise estatística..... | 63 |
| 11 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 64 |
| 12 CONCLUSÕES..... | 79 |
| 13 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 79 |
| 14 ANEXO | 80 |
| Manuscrito submetido para a revista <i>Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre</i> | 80 |
| REFERÊNCIAS | 101 |

1 INTRODUÇÃO GERAL

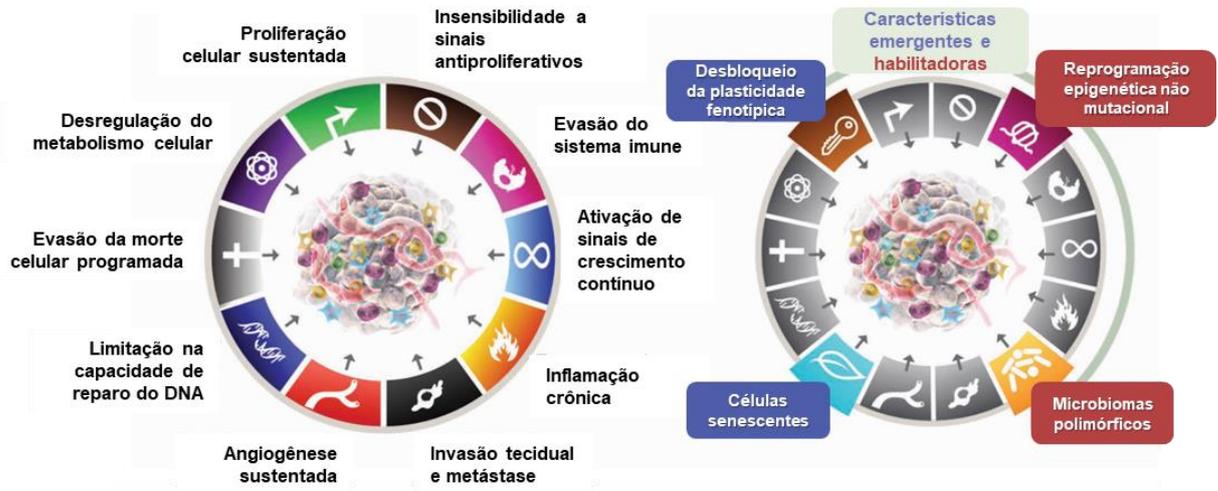
1.1 Câncer

Uma série de características comuns a diversos tipos de câncer foi identificada e descrita por Hanahan e Weinberg em 2000 e posteriormente revisada em 2011. Nestes dois trabalhos, os autores demonstraram que os tumores possuíam diversas características, do inglês *Hallmarks*, (Figura 1) que abrangem uma variedade de processos biológicos conferindo às células tumorais a capacidade de escapar das restrições normais de crescimento e sobrevivência (Hanahan & Weinberg, 2000; Hanahan & Weinberg, 2011).

A proliferação celular sustentada é uma das principais características dentre os *Hallmarks* e permite que as células cancerígenas se dividam de maneira descontrolada, resultando na formação de massas tumorais. A insensibilidade a sinais antiproliferativos e a capacidade de evasão da morte celular programada são mecanismos que contribuem para a sobrevivência prolongada das células tumorais, mesmo quando submetidas a estresses celulares. Outro aspecto importante é a ativação de sinais de crescimento contínuo, onde as células tumorais frequentemente exploram vias de sinalização para promover o crescimento incessante, ignorando os mecanismos de checagem que normalmente limitariam o crescimento celular. A angiogênese sustentada, um processo pelo qual as células cancerosas induzem a formação de novos vasos sanguíneos, é essencial para o fornecimento de nutrientes e oxigênio às massas tumorais em expansão. A capacidade de invasão tecidual e metástase é uma das características mais devastadoras do câncer, onde adquirem a habilidade de se infiltrar em tecidos circundantes e se disseminar para outras partes do corpo, estabelecendo metástases distantes do tumor primário. Em conjunto, a limitação na capacidade de reparo do DNA resulta em um acúmulo de mutações genéticas, fazendo com que haja uma maior heterogeneidade genética das células tumorais. Além disso, a promoção da inflamação crônica é também reconhecida como um importante fator para a progressão do câncer. Processos inflamatórios criam um microambiente mais favorável ao crescimento tumoral, influenciando a resposta imunológica e a comunicação entre as células (Hanahan & Weinberg, 2011).

Uma revisão recente trouxe a perspectiva de novas características funcionais e habilitantes que podem ser incorporadas como componentes centrais dos *Hallmarks* do câncer ao longo do tempo (Figura 1). Dentre essas características destacam-se: (i) “desbloqueio da plasticidade fenotípica”, (ii) “reprogramação epigenética não mutacional”, (iii) “microbiomas polimórficos” e (iv) “senescência celular” (Hanahan, 2022).

Figura 1 – Características funcionais do câncer

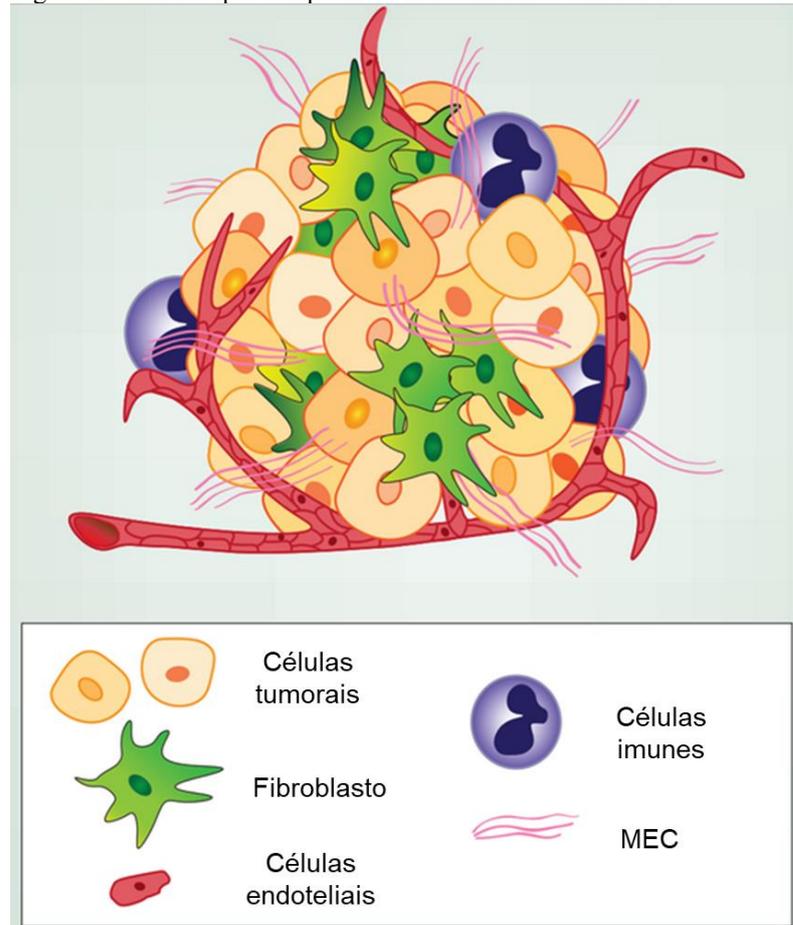


Fonte: Adaptado de Hanahan, 2022.

Vários estudos apontam que a obtenção do fenótipo mais agressivo das células cancerígenas está intimamente ligada às interações, sejam diretas ou indiretas, com os elementos presentes no ambiente onde o tumor se forma. Isso tem relação com o conceito dos *Hallmarks*, que ressaltam a influência do microambiente tumoral (MAT) nas características distintas das células cancerígenas (Brandner e Haass, 2013). Esse MAT é formado não apenas por células neoplásicas, mas também por células do estroma, do sistema imunológico e vários outros tipos de células (Figura 2) não tumorais como fibroblastos, citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e nutrientes que podem ser capazes de favorecer alterações fenotípicas das células tumorais (Joyce e Pollard, 2009; Rogers e Holen, 2011; Quail e Joyce, 2013; Weinstein e Storkus, 2015).

Dentre as células mielóides infiltradas no microambiente tumoral, os macrófagos são o tipo numericamente mais predominante (Chanmee et al., 2014; Majety et al., 2018). Eles possuem uma alta plasticidade e podem adotar diferentes comportamentos funcionais em resposta a citocinas ou estímulos patogênicos (Stout et al., 2005).

Figura 2 – Células que compõem o Microambiente tumoral

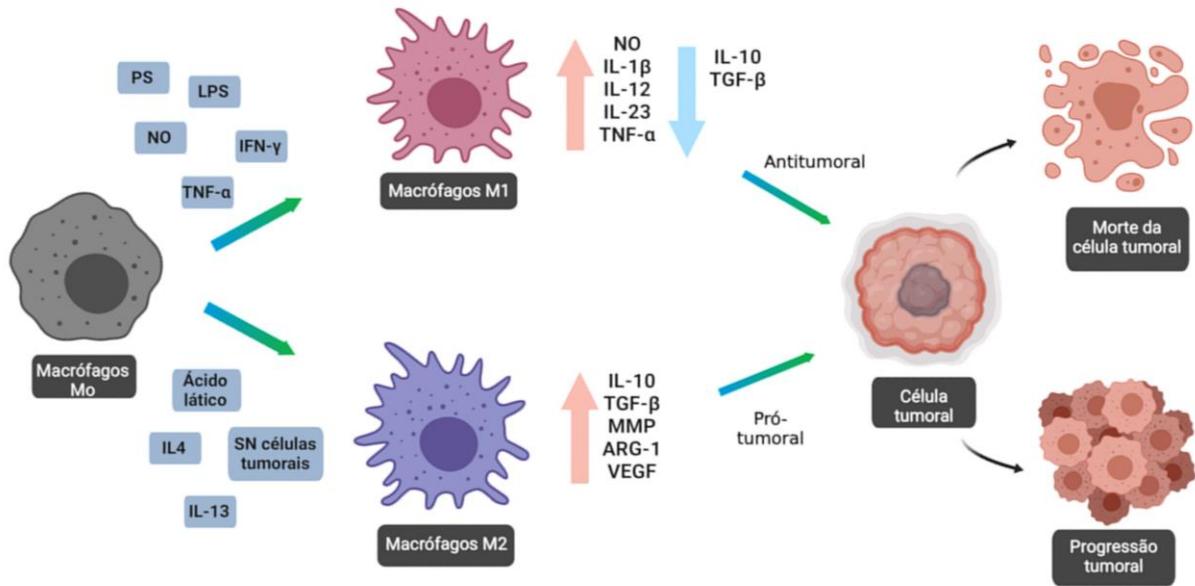


Fonte: Adaptado de Marks et al., 2016

Legenda: MEC: Matriz Extracelular

Essa polarização em macrófagos M1 e M2 (Figura 3) representa os extremos de um amplo espectro de funções contrastantes que os macrófagos podem adquirir ao serem estimulados. Os macrófagos M1 exibem propriedades pró-inflamatórias, imunogênicas e antitumorais, enquanto os macrófagos M2 têm efeitos anti-inflamatórios, tolerogênicos e pró-tumorais (Biswas; Mantovani, 2010; Mosser; Edwards, 2008; Murray et al., 2014). A polarização dos macrófagos em direção ao fenótipo M1 é estimulada por citocinas do tipo Th1 (como TNF, IL-12 e IFN γ), bem como por PAMPs (Padrões Moleculares Associados a Patógenos) e DAMPs (Padrões Moleculares Associados a Danos Celulares). Por outro lado, a exposição a citocinas do tipo Th2 (como IL-4, IL-10, IL-13 e TGF- β) induz a polarização dos macrófagos para o perfil M2 (Biswas; Mantovani, 2010; Mosser; Edwards, 2008).

Figura 3 – Plasticidade fenotípica dos macrófagos



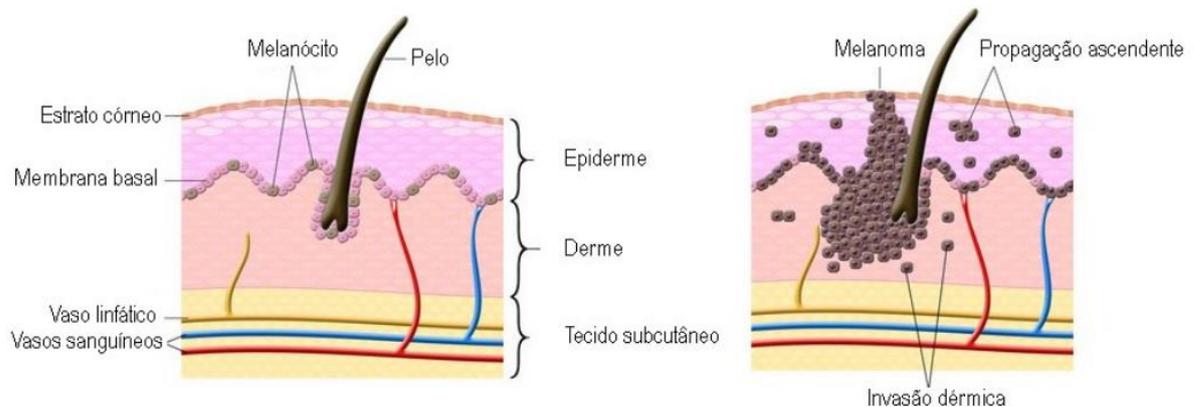
Fonte: Criado pela autora com BioRender.com

Legenda: OS: polissacarídeos sulfatados; NO: óxido nítrico; LPS: lipopolissacarídeo bacteriano de *E. coli*; SN: sobrenadante; MMP: metaloprotease; ARG-1: Arginase-1.

1.2 Melanoma

O câncer de pele do tipo melanoma atinge os melanócitos (Figura 4), células responsáveis pela produção de melanina que desempenha um papel crucial na coloração da pele, cabelo, olhos e outras partes do corpo (Gray-Schopfer et al., 2007; Simões et al., 2015). Embora sua incidência seja baixa, em torno de 1%, sua alta capacidade de metastizar faz com que o melanoma tenha uma alta taxa de mortalidade, chegando a 90% dos casos de morte por câncer de pele (Siegel; Miller; Jemal, 2020).

Figura 4 – Características da invasão dérmica no melanoma



Fonte: Adaptado de Chudnovsky et al. (2005)

De acordo com as projeções para o triênio de 2023 a 2025, estabelecidas pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA), a estimativa é de 220.490 novos casos de câncer de pele do tipo não melanoma para cada ano. Concomitantemente, uma estimativa de 13.620 novos casos anuais de melanoma também é prevista. Analisando a incidência destas patologias, o melanoma não demandaria atenção significativa. Entretanto, uma observação mais minuciosa dos índices de mortalidade revela um cenário mais complexo (INCA, 2022).

No ano de 2020, verificou-se um total de 1.923 óbitos no Brasil decorrentes do melanoma, contrastando com uma taxa de mortalidade associada a tumores não melanoma que não ultrapassou 2.500 casos no mesmo período. Logo, ainda que o melanoma configure apenas 5 a cada 100 casos de neoplasias cutâneas diagnosticadas, essa enfermidade é responsável por 4 dentre 10 óbitos resultantes de tumores de pele. Esta ponderação impõe uma perspectiva mais ampla sobre a relevância e impacto do melanoma, reforçando a necessidade de abordagens mais incisivas para o seu diagnóstico precoce e tratamento eficaz (SBCO, 2023).

Dentre os principais fatores de risco para o desenvolvimento do melanoma, têm-se: indivíduo ser do sexo masculino, idade avançada, exposição solar, presença de sinais atípicos na pele, histórico familiar e mutações genéticas (Bhatia et al., 2009). Entre as mutações genéticas, cerca de 70% dos pacientes apresentam alterações no oncogene BRAF, de 25% a 50% mostram modificações no gene supressor de tumor ciclina dependente de inibidor de cinase 2A (CDKN2A, do inglês *cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A*), e 20% têm alterações no oncogene NRAS (Chin, 2003; Gray-Schopfer et al., 2007; Bandarchi et al., 2013).

O estroma desempenha um papel significativo na agressividade da doença no microambiente do melanoma, pois oferece um suporte crucial para a rápida proliferação dos melanócitos malignos que invadem a derme (Boyce, 2001). Os macrófagos, presentes no estroma do melanoma em aproximadamente 40%, muitas vezes exibem um fenótipo semelhante ao dos macrófagos alternativamente ativados (M2), o que lhes confere a designação de macrófagos associados ao tumor (TAMs, do inglês *tumor associated macrophages*) (Mantovani et al., 2002; Hussein, 2006; Lewis; Pollard, 2006). Esses TAMs estão intimamente relacionados ao melanoma, já que estimulam o crescimento do tumor, potencializam a invasão, promovem a angiogênese e ampliam o potencial metastático. Isso ocorre devido à expressão da proteína Arginase 1, levando à liberação de substâncias que configuram o microambiente do melanoma com um perfil anti-inflamatório e pró-tumoral, incluindo a interleucina-10 (IL-10) e a IL-4 (Mantovani *et al.*, 2002; Chen et al., 2011; Haasekohn et al., 2014; Tham et al., 2014).

Em 1975, a dacarbazina tornou-se o primeiro medicamento a ser usado como terapia padrão para o melanoma maligno (Bhatia et al., 2009). Por apresentar diversos efeitos adversos, com menos de 5% de respostas completas e uma duração média de resposta de 5 a 6 meses, a busca por novas terapias é de extrema importância (Carreau; Pavlick, 2022). Nesse sentido, os avanços na compreensão da biologia do melanoma, no desenvolvimento do tumor e na defesa inata do corpo contra a progressão do tumor facilitaram o desenvolvimento e a subsequente aprovação de várias novas terapias contra o melanoma com a capacidade de melhorar substancialmente os resultados (Michielin et al., 2020).

Por esses motivos, desde então tem havido esforços para desenvolver terapias inovadoras para o tratamento do melanoma maligno que atuem no microambiente tumoral, visando a redução de efeitos adversos e aumentando as taxas de sobrevida em relação a cada nova terapia que surge. A partir de 2011, foram desenvolvidos inibidores de alvos moleculares, incluindo aqueles direcionados ao gene BRAF mutado, como vemurafenib, drabafenib e tremetinib. Embora a resposta inicial tenha sido promissora, a terapia perde eficácia após 5-7 meses devido ao aumento da resistência do melanoma aos efeitos dos medicamentos. Portanto, combinações de medicamentos se mostraram mais eficientes a partir desse ponto (Sullivan et al., 2013).

Atualmente, sabe-se que o melanoma é susceptível ao sistema imunológico, tendo assim a imunoterapia como principal forma de tratamento, aumentando a sobrevida dos pacientes em comparação com as terapias direcionadas desenvolvidas até hoje. A base da imunoterapia para o melanoma e também para outros tipos de tumores envolve inibidores de pontos de controle, incluindo o antígeno 4 do linfócito T citotóxico (CTLA-4) e a proteína de morte celular programada 1 (PD1, do inglês programmed death 1 protein). O CTLA-4 é regulado positivamente nas células T como resultado da ligação do receptor de células T ao antígeno tumoral durante a interação entre uma célula T e uma célula apresentadora de antígeno, atuando como um regulador negativo da ativação de células T. O bloqueio de CTLA-4 com um anticorpo antagonista, como o ipilimumab, melhora a função das células T e a erradicação das células tumorais. Após a ligação do ligante (PD-L1) presente nas células apresentadoras de antígeno, a via PD-1 promove a supressão da ativação dos linfócitos T. O tratamento com anticorpos anti-PD-1 ou anti-PD-L1, como nivolumab ou pembrolizumab, interrompe esse mecanismo inibitório, promovendo a atividade antitumoral dos linfócitos T (Michielin et al., 2020; Seth et al., 2020; Curti; Faries, 2021).

A combinação de procedimentos cirúrgicos e terapias parece ser a abordagem fundamental para aprimorar os desfechos a longo prazo em pacientes com melanoma. Nesse

contexto, ganha destaque a utilização de associação de opções terapêuticas já em uso na prática clínica com a exploração de novos alvos terapêuticos para o melanoma maligno, com o propósito de oferecer tratamentos mais eficazes e com menor incidência de efeitos adversos (Domingues et al., 2018; Leonardi et al., 2020). Dentre esses alvos terapêuticos, os produtos naturais vem ganhando bastante notoriedade com cada vez mais pesquisas sendo feitas relacionando suas atividades biológicas.

1.3 Produtos Naturais

A humanidade tem utilizado a natureza como fonte de substâncias para tratar enfermidades há incontáveis anos. Ao longo de muitos séculos, as plantas medicinais têm oferecido diversos compostos biologicamente ativos, sendo amplamente usadas tanto em sua forma original quanto sob a forma de compostos purificados para tratar uma variedade de doenças. Entre as muitas propriedades terapêuticas já relatadas, incluem-se atividades antitumorais, hipoglicemiantes, antioxidantes, antifúngicas e anti-inflamatórias. Além das atividades biológicas relatadas, esses produtos têm sido relatados como seguros para consumo humano (Kalaivanan; Chandrasekaran; Venkatesalu, 2013; Valente et al., 2013). Até hoje, os produtos naturais continuam a exercer um impacto inegável na saúde humana. A maior parte dos medicamentos usados na prática clínica tem alguma relação com produtos naturais, seja por meio do uso direto do composto ou da incorporação de estruturas derivadas de compostos naturais bioativos. Além das plantas, outros grupos de organismos têm importância como fontes de produtos naturais com atividade biológica, incluindo bactérias, fungos, algas e animais marinhos (Newman & Cragg, 2020).

Os esforços para isolar novos compostos naturais resultaram na descoberta de uma série de medicamentos anticâncer. Estima-se que, entre 1981 e 2019, cerca de 25% de todos os novos medicamentos anticâncer aprovados estavam relacionados a produtos naturais (Newman & Cragg, 2020; Huang et al, 2018). Apesar dessas conquistas, o desenvolvimento de produtos naturais bioativos em medicamentos ainda é um desafio, em parte devido às dificuldades no isolamento em larga escala, na compreensão de seus mecanismos de ação e no desenvolvimento farmacêutico.

Recentemente, devido ao crescimento rápido do conhecimento em terapia contra o câncer e ao surgimento de tecnologias inovadoras, tornou-se possível superar essas barreiras, melhorar a eficiência na descoberta de medicamentos, identificar os alvos diretos dos produtos naturais e compreender os efeitos farmacológicos complexos que eles podem ter.

Esses avanços estão lançando os fundamentos para uma revitalização na pesquisa de produtos naturais e na descoberta de medicamentos anticâncer (Huang et al, 2021).

Vários compostos amplamente utilizados contra o câncer têm origem em fontes naturais, como irinotecano, vincristina, etoposídeo e paclitaxel derivados de plantas, actinomicina D e mitomicina C derivados de bactérias, bem como a bleomicina derivada de *Streptomyces verticillus*. Alguns desses compostos ainda são a base da terapia contra o câncer e continuarão desempenhando um papel fundamental nos tratamentos. Entre eles, a camptotecina e o paclitaxel são, sem dúvida, os dois exemplos mais bem-sucedidos, ambos identificados entre as décadas de 1950 e 1960 (Wall et al, 1995; Wall et al, 1998).

1.4 Polissacarídeos sulfatados de algas marinhas

No contexto dos produtos naturais, podemos destacar os polissacarídeos sulfatados (PS). PS são polímeros naturais constituídos por unidades repetidas de açúcares carregados negativamente, principalmente devido à presença de radicais sulfatados. Eles podem ser encontrados em invertebrados marinhos como polissacarídeos simples, com estrutura linear formada por unidades oligossacarídicas repetitivas, ou como um grupo de compostos de estrutura semelhante aos glicosaminoglicanos presentes nos tecidos de mamíferos, mas com diferenças relacionadas à presença de ramificações e padrões de sulfatação distintos (Alves et al., 1997; Aquino et al., 2005).

Os polissacarídeos sulfatados têm sido estudados por seus diversos efeitos biológicos, como atividades antitumorais e imunomoduladoras (Deng et al, 2020). Assim, são considerados importantes moduladores da resposta biológica (MRB) capazes de ativar o sistema imune inato e adquirido do hospedeiro (Hou et al, 2020).

1.5 Fucoïdanas modificadoras da resposta biológica

Fucoïdanas são polissacarídeos naturais contendo L-fucose e grupos éster de sulfato. Também chamados de homofucanos, são constituintes de algas pardas e alguns invertebrados marinhos (como ouriços-do-mar e pepinos-do-mar) (Chizhov et al, 1999). As fucoïdanas foram pela primeira vez extraídas da matriz de muco extracelular de algas pardas da classe *Phaeophyceae*, especificamente das espécies *Fucus vesiculosus*, *Asophyllum nodosum*,

Laminaria digiata e *Laminaria saccharina*, em 1913, pelo professor sueco Hareld Kylin na Universidade de Uppsala (Hsu et al, 2019; Michel et al, 2010). Inicialmente, o termo fucoídano era utilizado de maneira geral para se referir a diversos polissacarídeos sulfatados de alto peso molecular derivados das paredes celulares fibrilares e matrizes mucosas de diferentes espécies de algas pardas (Bertheau & Mulloy, 2003). Até pouco tempo, a nomenclatura da fucoídano pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) era baseada na estrutura genérica da fucana sulfatada - um polissacarídeo com uma estrutura de base composta por resíduos sulfatados de L-fucose, sendo que a estrutura principal consistia em pelo menos 10 monossacarídeos (Deniaud-Bouet et al, 2017). Assim, os termos fucoídano, fucoídanos e fucanas sulfatados eram utilizados de forma intercambiável na literatura, diferenciando-se das fucanas e fucosanas. Recentemente, em 2017, a definição do termo fucoídano(s) de algas pardas foi revista, passando a se referir claramente a heteropolímeros com espinhas dorsais mais diversificadas (Deniaud-Bouet et al, 2017).

As atividades biológicas desses heteropolissacarídeos diferem dependendo da espécie de alga marinha e das condições ambientais de crescimento. Existem aproximadamente 250 gêneros e 1500-2000 espécies de algas pardas, e a composição química, estrutura das fucoídanos e bioatividade variam de espécie para espécie (Ponce & Startz, 2020). Extratos de fucoídanos de várias espécies de algas pardas consistem em diferentes quantidades de composições de monossacarídeos, incluindo fucose, manose, galactose, glicose e xilose (Obluchinskaya et al, 2022). Os métodos de extração também são fatores importantes que afetam a composição estrutural e as propriedades bioativas das fucoídanos, tanto dentro quanto entre as espécies de algas pardas. Todos esses fatores mencionados contribuem para a dificuldade em determinar o tipo de fucoídano e a dose eficaz de uma fucoídano específica para uso em estudos pré-clínicos e clínico (Zhao et al, 2018; Wang et al, 2010; Ale et al, 2011b; Holtkamp et al, 2009).

As fucoídanos possuem propriedades antitumorais e efeitos imunoestimulantes com baixa toxicidade tanto em modelos animais quanto em seres humanos, além de propriedades anti-inflamatórias e outras propriedades farmacológicas (Lin et al, 2020; Apostolova et al, 2020; Kiselevskiy et al, 2022). Esses polissacarídeos são fortes agonistas do receptor do tipo *Toll-4* (TLR4), o que induz à ativação de células dendríticas em seres humanos. Portanto, as fucoídanos podem ser candidatos desejáveis para uso na imunoterapia contra o câncer (Park et al, 2020a). Embora as fucoídanos sejam candidatos promissores no tratamento do câncer, sua eficácia dependerá em grande parte do tipo de espécie e dos métodos de extração dos compostos de fucoídano. Algumas Fucoídanos usados como adjuvantes têm demonstrado

aumentar a eficácia dos inibidores de checkpoints imunológicos (ICIs) no tratamento de melanoma (Yang et al, 2021; McGowan et al, 2020; Park et al, 2020a; Park et al, 2020b) e câncer de pulmão metastático (Zhang et al, 2021). Além disso, quando usados em combinação com outros medicamentos de imunoterapia contra o câncer, têm avançado significativamente no campo do tratamento do câncer. Em estudos clínicos, fucoidana derivada da alga *Undaria pinnatifida*, administrada em conjunto com 20 mg de tamoxifeno para tratar pacientes com câncer de mama, demonstrou aumento na eficácia do tratamento e não foram detectados efeitos adversos (ACTRN12615000673549) (Tocaciu et al, 2018), sugerindo que as fucoidanas podem ser administradas em conjunto com outros medicamentos terapêuticos hormonais e atuar como adjuvantes eficazes. Contudo, os mecanismos do efeito imunomodulador de fucoidanas são elusivos e ainda não foram totalmente elucidados.

1.6 Justificativa e Relevância

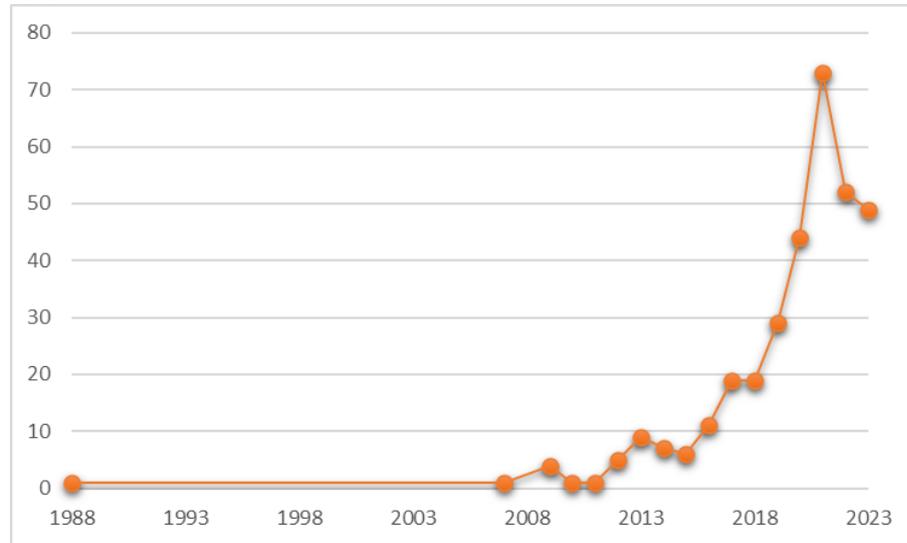
Levando em consideração o uso desses produtos naturais como alvos terapêuticos, a combinação de polissacarídeos nos regimes de quimioterapia pode atenuar os efeitos tóxicos causados por ela, como evidenciado em experimentos realizados em modelos *in vivo* (Sousa et al., 2007; Singh et al., 2016). Atualmente, três polissacarídeos - PSK ou Krestina, lentinana e esquizofilana - derivados de fungos terrestres, têm sido aprovados para uso em terapias contra neoplasias em conjunto com agentes quimioterápicos já utilizados na prática clínica na Ásia (Sun et al., 2012; Namikawa et al., 2015). Wang e colaboradores (2018) mostraram que, em pacientes com câncer de pulmão de não pequenas células (NSCLC), lentinana aumentou significativamente o número de células CD3⁺ CD56⁺ NKT, suprarregulação de subconjunto de células CD4⁺ e CD8⁺, aumentou os níveis de IFN- γ , TNF- α e IL-12, e diminuiu os níveis de IL-10 e TGF- β 1 em pacientes com NSCLC. Os estudos mostram que a lentinana pode não somente aumentar a função imune celular e promover efeito antitumoral com a imunoterapia combinada, mas igualmente inibir a expansão de Tregs. A imunoterapia em associação com a lentinana é uma estratégia antitumoral promissora que promove a proliferação de células T citotóxica e aumenta as quimiocinas/citocinas pró-inflamatórias. Ao mesmo tempo, a proporção de CD4⁺CD25⁺Tregs em pacientes com NSCLC tratados com lentinana foi reduzida, resultando na transformação do estado de Th2 para Th1. Com isso, um efeito sinérgico da imunoterapia com lentinana e anticorpos monoclonais pode ser promissor. O polissacarídeo K (PSK) é um polissacarídeo ligado a proteínas que é extraído do micélio de

Coriolus versicolor estirpe CM-101, um dos Basidiomycetes (Kobayashi et al, 1995). Embora os mecanismos de ação dos efeitos da administração de PSK não tenham sido elucidados, dois possíveis mecanismos são especulados. A primeira possibilidade é que a diminuição das células NK seja mais rápida com a administração de PSK, porque o PSK alivia a leucopenia induzida por quimioterapia em ratinhos (Mell et al, 2008). A segunda possibilidade é que a administração de PSK promova a proliferação de células NK, compensando a diminuição do número de células NK, com base nos achados que o PSK mostrou in vitro ação mitogênica contra células mononucleares do sangue periférico de indivíduos saudáveis Ohno et al, 1976. O PSK promoveu a proliferação de células T esplênicas de camundongos (Hirai et al, 1993) e linhagem celular NK humana (Jiménez-Medina), e o PSK promoveu a produção de interleucina IL-2 e aumentou a expressão do receptor IL-2 em linfócitos humanos normais (Yamaguchi et al, 2004). Esquizofilana é obtida de *Schizophyllum*. Este produto é utilizado no tratamento do câncer de estômago e pescoço (Gründemann et al, 2020). Além disso, é administrado durante a radioterapia devido às suas propriedades radioprotetoras. A esquizofilana restaura a mitose das células da medula óssea anteriormente suprimidas pela radiação gama (Gd; Gordon, 2001; Liu et al.,2017). Esses estudos demonstram como esses compostos podem auxiliar na minimização da toxicidade e dos efeitos colaterais, e até mesmo melhorar a eficácia dos tratamentos quimioterápicos.

No entanto, apesar desses avanços, ainda há escassez de estudos pré-clínicos e clínicos que explorem os polissacarídeos como adjuvantes. Apesar de sua grande promessa, em relação ao PS, ainda não se têm exemplos no Brasil, provenientes de fontes marinhas, em estudos clínicos avançados voltados para o tratamento do câncer. As fucoidanas também podem atuar como agentes antiangiogênicos (Senthilkumar et al., 2013), estimulantes imunológicos em células dendríticas, células NK (células assassinas naturais) e macrófagos, sendo capazes, portanto, de aumentar a imunidade anticancerígena através da ativação dessas células do sistema imunológico, estimulando a produção de citocinas antitumorais (Ale et al., 2011a; Azuma et al., 2012).

Além disso, o interesse por estudos que focam nos macrófagos associados ao tumor como alvos para terapias anticancerígenas e relacionados ao sistema imune tem crescido significativamente nos últimos anos (Figura 5). Isso se deve a um melhor entendimento e reconhecimento da relevância do microambiente tumoral, o que tem levado à descoberta de novas estratégias no combate ao câncer.

5 - Número de publicações sobre macrófagos associados ao tumor como alvos na terapêutica antitumoral relacionados ao sistema imune desde a década de 1980 até 2023.



Fonte: Resultados da busca no “PubMed” utilizando as palavras-chave: "TAM antitumoral target immune" no dia 18/08/2023.

A descoberta de novos compostos com propriedades antitumorais tem sido um grande desafio (Cao et al, 2014; Cui et al, 2018). Aproximadamente 1/3 dos fármacos utilizados atualmente no tratamento do câncer é derivado de produtos naturais, incluindo fontes marinhas (Liu et al, 2017). Das 175 moléculas que foram aprovadas para o tratamento do câncer nos últimos anos, 49% são provenientes de compostos naturais ou diretamente derivadas delas, onde podemos destacar os polissacarídeos sulfatados com considerável potencial na terapia contra o câncer (Fang et al, 2015; Ferreira et al, 2015). Diversos quimioterápicos que já estão na clínica são inespecíficos e apresentam diversos efeitos tóxicos em células normais, e em especial em células do sistema imune (Shemami et al, 2018). Além disso, o uso desses compostos causa diversos efeitos colaterais importantes e uma resistência multidrogas do tumor limitando e/ou reduzindo a resposta do paciente ao tratamento (Leiro et al, 2007).

Nesse contexto, a busca por moléculas com efeitos seletivos sobre as células tumorais e que reduzam efeitos colaterais de quimioterápicos é uma promissora estratégia para o desenvolvimento de novos compostos para o tratamento do câncer (Borazjani et al, 2018). Tendo em vista isso, os PS provenientes de organismos marinhos, também têm destaque na pesquisa para o tratamento do câncer (Bahramzadeh et al, 2019; Kohchi et al, 2009).

Indiretamente, PS podem promover a morte de células tumorais ou inibição de seu crescimento através da estimulação de células do sistema imune, como macrófagos e células *natural killers* (Chen et al, 2018; Pan et al, 2018). Estudos *in vitro* mostraram que PS de algas podem não apresentar um efeito antiproliferativo direto sobre as células cancerígenas. Contudo, ao serem avaliados em modelos de estudo *in vivo*, os mesmos PS possuíram efeito antitumoral por meio da estimulação do sistema imune. Esses estudos indicaram que o efeito antitumoral dos PS ocorreu através da estimulação de macrófagos ativados capazes de secretar NO e TNF- α (Assef et al, 2021; Pan et al, 2018). Nesse sentido, PS de fontes naturais podem atuar como agentes imunoestimulantes, de modo a ativar a resposta imune antitumoral e eliminar as células cancerígenas do corpo (Soares et al, 2017; Farias et al, 2008).

1.7 Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo investigar se os polissacarídeos sulfatados de duas espécies de algas pardas são capazes de inibir o crescimento tumoral através da modulação de macrófagos

2 CAPÍTULO I

**POLISSACÁRIDEOS SULFATOS DA ALGA PARDA *DICTYOTA CARIBAEA*
MODULAM MACRÓFAGOS *IN VITRO* PARA UM FENÓTIPO ANTITUMORAL**

2 INTRODUÇÃO

Entre as células do sistema imunológico que constituem o microambiente tumoral (MAT), os macrófagos (Mfs) desempenham diversos papéis no desenvolvimento do câncer, podendo apresentar um fenótipo com atividade antitumoral nos estágios iniciais de progressão e até mesmo outro fenótipo capaz de promover tumores em câncer estabelecido (Noy e Pollard, 2014). Os Mfs são as células mais versáteis e, ainda assim, relativamente pouco compreendidas no sistema imunológico. Em sua função imunológica benéfica, auxiliam na manutenção da homeostase dos tecidos e órgãos e desempenham um papel ativo na cicatrização de feridas, imunidade inata e adaptativa. No entanto, também podem ser prejudiciais ao promover inflamação, doenças vasculares, autoimunidade e metástases tumorais (Kloc et al., 2017). Os Mfs podem polarizar para um fenótipo inflamatório (M1, ativação clássica) com atividades bactericidas e antitumorais, bem como remodelar tecidos e promover cicatrização (M2, ativação alternativa), estando ainda associados a tumores (TAM, do inglês tumor associated macrophages) (Mantovani; Vecchi; Allavena, 2014).

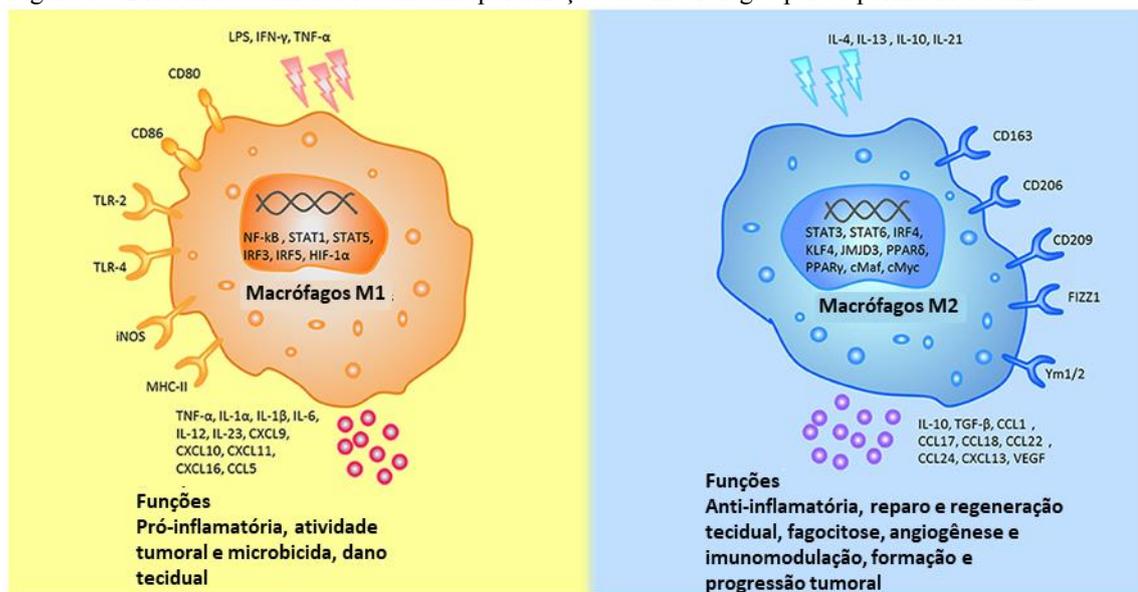
Quando expostos a sinais derivados de microrganismos, tecidos danificados e linfócitos ativados, ou até mesmo certos xenobióticos, os Mfs são reprogramados funcionalmente para exibir uma variedade de fenótipos distintos. Em uma tentativa de emular o paradigma Th1/Th2 dos linfócitos, os macrófagos passam por dois estados de ativação distintos. O IFN- γ , sozinho ou em combinação com estímulos microbianos como lipopolissacarídeos (LPS) de membrana externa de bactérias gram-negativas, ou citocinas como fator de necrose tumoral (TNF) e fator estimulante do crescimento de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), induzem os macrófagos ao estado M1, também conhecido como ativado de forma clássica. Isso leva à secreção de óxido nítrico (NO) e citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, IL-12, IL-23 e TNF- α , em quantidades elevadas, além de marcadores de superfície como óxido nítrico sintase induzida (iNOS), proteínas de membrana como CD86, CD169 e MHC-II expressas em células apresentadoras de antígenos. Por outro lado, a ativação alternativa é desencadeada por citocinas como IL-4 e IL-13, que levam à polarização dos Mfs para o estado M2, também chamado de alternativamente ativado (Figura 6). Isso resulta na produção de citocinas como IL-10, TGF- β e IL-1ra, juntamente com a expressão de marcadores de superfície como o receptor de manose (CD206), o receptor de varredura (SR) e a arginase-1 (Arg-1, expressa em murinos) (Yao et al, 2019).

Os Mfs M1 estão envolvidos como células indutoras e efetoras nas respostas imunes mediadas por Th1 e desempenham um papel efetivo na resistência contra tumores e

parasitas intracelulares. Por outro lado, os Mfs M2 atuam como apresentadores de antígenos deficientes, suprimem a imunidade adaptativa mediada por Th1, removem ativamente detritos celulares, contribuem para a atenuação da inflamação, favorecem a cicatrização de feridas, angiogênese e remodelação tecidual, e acompanham a progressão tumoral (Mantovani; Vecchi; Allavena, 2014; Martinez; Gordon, 2014).

A linhagem celular RAW 264.7 é um modelo de macrófagos geneticamente transformados após injeção do vírus da leucemia murina de Abelson (A-MuLV) em camundongos machos (Raschke et al, 1978). Este modelo é excelente para investigar compostos anti-inflamatórios *in vitro* e avaliar inibidores de vias de sinalização que levam à indução de citocinas pró-inflamatórias (Bonnardel & Guilliams, 2018).

Figura 6 – Diferentes estímulos levam a polarização dos macrófagos para o perfil M1 ou M2



Fonte: Adaptado de Yao et al, 2019

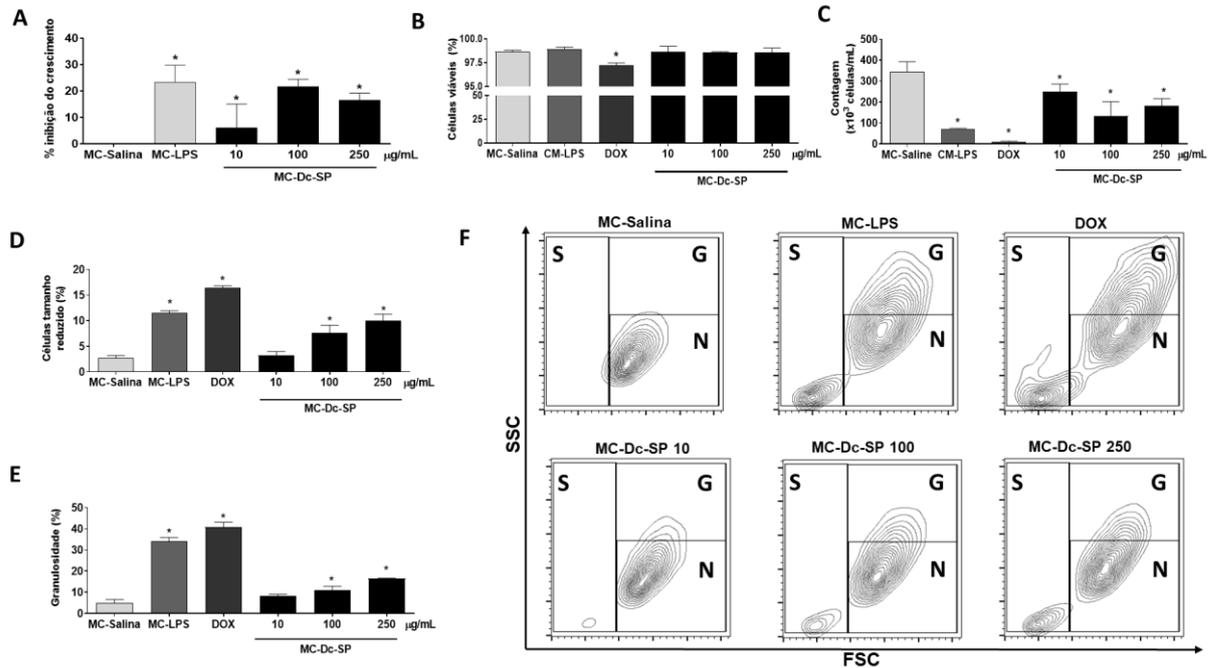
No contexto da prospecção de compostos modificadores da resposta biológica, os produtos naturais de origem marinha vêm ganhando destaque nos últimos anos. A extensa costa brasileira, com aproximadamente 8000 km, apresenta uma diversidade biológica ainda pouco explorada em termos biotecnológicos. Os estudos realizados no ambiente marinho do litoral brasileiro vêm revelando uma variedade de compostos químicos como: alcaloides, peptídeos e policetídeos que apresentam atividades anticancerígenas (Berlinck et al., 2017). Por isso, a busca por novas substâncias de origem marinha pode favorecer a descoberta de um elevado número de compostos bioativos. A pesquisa de produtos naturais que possuam tais atividades

tem se tornado de grande relevância para o conhecimento, dada a urgente necessidade de descobrir novos fármacos com eficácia terapêutica contra agentes infecciosos (Tan et al., 2018). Dentre esses produtos naturais marinhos, os polissacarídeos de algas apresentam diversas atividades biológicas relevantes. A composição e a estrutura dos monossacarídeos das fucoidanas presentes em algas pardas, variam de acordo com a espécie da alga, os métodos de isolamento e purificação dos polissacarídeos, bem como o período de coleta das algas (Skriptsova et al., 2010). Estudos prévios destacaram que a atividade biológica das fucoidanas é grandemente influenciada pela presença de grupos sulfato (Haroun-Bouhedja et al., 2000), pelo peso molecular (YANG et al., 2008), pela composição monossacarídica e pela estrutura da cadeia principal das fucoidanas (PATANKAR et al., 1993). Como resultado, as fucoidanas de baixo peso molecular (> 2000 Da), especialmente aquelas que contêm resíduos de fucose e uma alta densidade de grupos sulfato, exibem maior atividade antitumoral em comparação com os heterofucanos de alto peso molecular e com baixa sulfatação (Cole & Jayson, 2008; Koyanagi et al., 2003).

A atividade antitumoral das fucoidanas está relacionada à intervenção nos estágios de iniciação, desenvolvimento e progressão do tumor, bem como à modulação de diversos mecanismos, incluindo proliferação celular, diferenciação, apoptose, angiogênese e metástase (Aisa et al., 2005; HYUN et al., 2009).

Em nossos estudos anteriores, demonstramos que a fucoidana da alga parda *Dictyota caribaea* (Dc-SP) exibiu uma inibição de 51% no tumor sarcoma-180. No entanto, não induziu citotoxicidade em células tumorais *in vitro*. Além disso, Dc-SP não apresentou efeitos tóxicos em órgãos como rins e fígado de camundongos. No entanto, o peso do baço aumentou junto com uma desorganização da polpa branca, sugerindo que o efeito antitumoral observado pode estar relacionado a um efeito imunomodulador da Dc-SP (Assef et al., 2021). Além disso, trabalhos anteriores também demonstraram que o meio condicionado de RAW 264.7 ativado com Dc-SP foi capaz de induzir alterações na morfologia das células B16-F10 *in vitro* (figura 7), sugerindo um efeito antiproliferativo através da imunomodulação de macrófagos (Assef, 2017). Esses dados sugerem que Dc-SP é capaz de inibir crescimento tumoral através de mecanismos de modulação de macrófagos. No presente estudo, avaliamos então como a ativação de RAW 264.7 para o fenótipo M1 antitumoral pode estar caracterizada quando exposta a Dc-SP.

Figura 7 - Efeito antiproliferativo de meio condicionado de macrófagos estimulados com polissacarídeo sulfatado de *Dictyota caribaea* contra células de melanoma B16-F10



Fonte: Adaptado de Assef, 2017.

O meio condicionado (MC) foi obtido do sobrenadante de células RAW264.7 incubadas com solução salina (MC-Salina), lipopolissacarídeo de *E. coli* a 100 ng/mL (MC-LPS), doxorrubicina a 0,6 μ M (DOX) e Dc-SP 10, 100 e 250 μ g/mL (MC-Dc-SP) por 24h. As células B16-F10 foram então incubadas com MC por 48h. **A**, Efeito antiproliferativo de Dc-SP contra a linhagem de melanoma metastático murino (B16-F10) avaliada por ensaio SRB. **B e C**, Contagem de células e viabilidade celular de células B16-F10 por citometria de fluxo. **D-F**, Morfologia celular analisada por citometria de fluxo, evidenciando células murchas e com alta granulosidade. Os dados de A-E são apresentados como média \pm DP. As diferenças entre os dados normalizados para a porcentagem de inibição do crescimento celular do controle negativo versus outros grupos foram determinadas pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Dunnett. *p<0,05. Legenda: S, Encolhimento celular; G, Granulosidade; N, Morfologia normal das células. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes, cada um realizado em triplicata.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Caracterizar os macrófagos murinos RAW 264.7 ativados por polissacarídeos sulfatados da alga parda *Dictyota caribaea in vitro*

3.2 Específicos

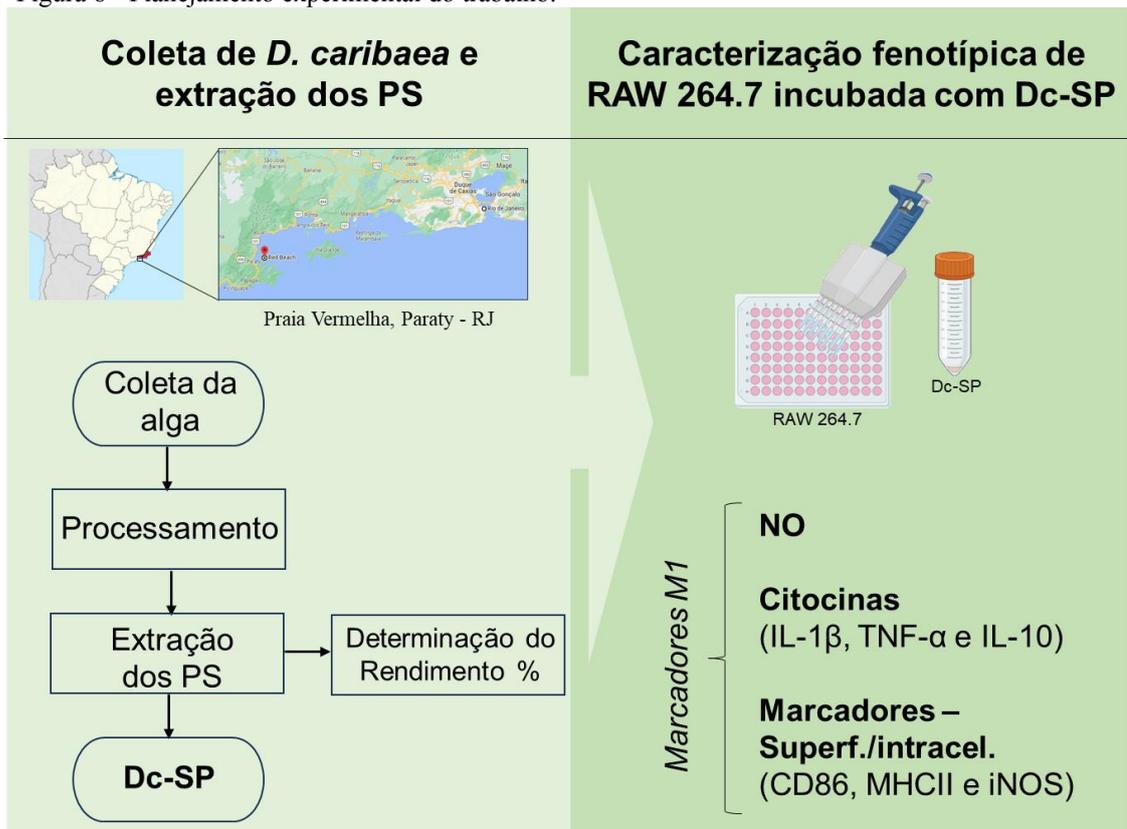
- Avaliar a ativação da linhagem de macrófagos murinos (RAW 264.7) *in vitro* utilizando polissacarídeos de *D. caribaea* (Dc-SP);
- Caracterizar o fenótipo dos macrófagos ativados por Dc-SP *in vitro*;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Planejamento experimental

Espécimes da alga *Dictyota caribaea* foram coletados na Praia Vermelha (Paraty, RJ) para obtenção do extrato bruto e das frações de polissacarídeos sulfatados através de precipitação de solução aquosa com gradiente crescente de concentrações de etanol. Inicialmente, foram avaliadas as atividades imunoestimulante, utilizando macrófagos murino RAW 264.7. Posteriormente, foram realizados ensaios para caracterização dos macrófagos ativados por Dc-SP *in vitro*. A figura 8 resume de forma esquemática o fluxo de trabalho adotado neste estudo.

Figura 8 - Planejamento experimental do trabalho.



Legenda: PS – polissacarídeo sulfatado; Dc-SP – polissacarídeo sulfatado de *Dictyota caribaea*; NO – óxido nítrico.

4.2 Isolamento de polissacarídeo sulfatado de *Dictyota caribaea* (Dc-SP)

A alga marinha, *Dictyota caribaea* (Figura 9), foi coletada na praia Vermelha (23°11'46.0" S e 44°38'38.0" W), Paraty, Rio de Janeiro, Brasil (Figura 10), separada de epífitas e de outras espécies, lavada com água destilada, seco ao ar, pulverizado e armazenado a -20°C. Espécimes testemunho (RFA 38779) foram depositados no Herbário da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil (Simas et al, 2014). O uso de *D. caribaea* foi registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o número #AC2D331. A Dc-SP foi obtida por meio de digestão proteolítica usando papaína incubada a 60°C por 12h e o polissacarídeo sulfatado foi precipitado na presença de etanol (em concentrações finais de 9%) para obter a fração nomeada de Dc-SP. O pico obtido em DEAE-celulose (Dc-SP) foi aplicado a um High Q-HPLC nas mesmas condições de equilíbrio, eluição, coleta e fração verificada conforme descrito anteriormente (Assef et al, 2021).

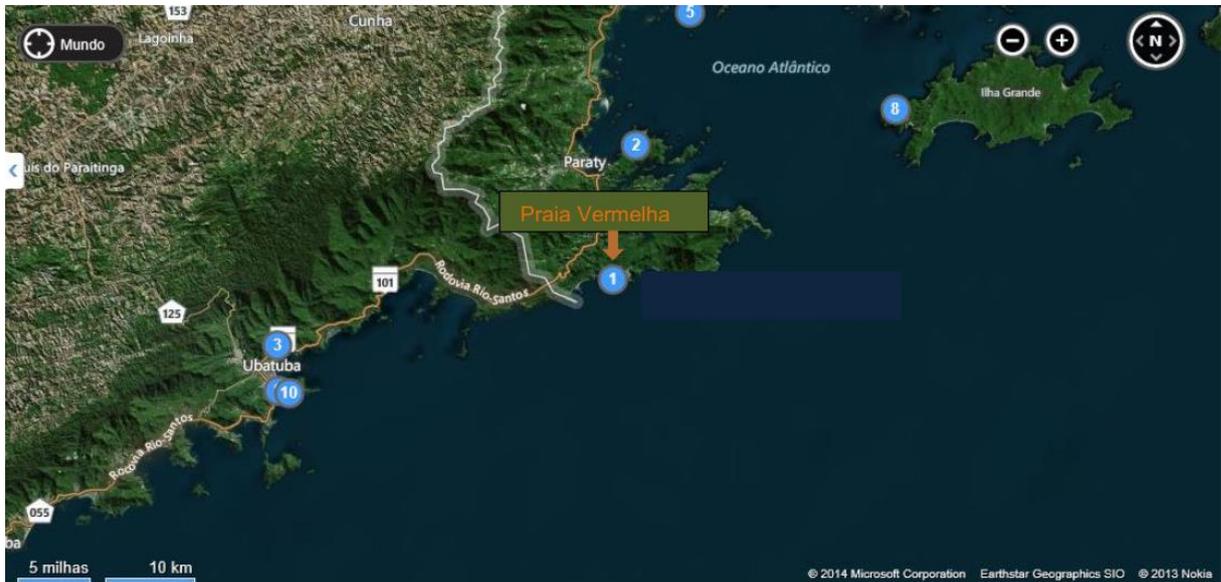
Os polissacarídeos sulfatados foram enviados para o Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia Marinha do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará.

Figura 9 - Imagem da alga *Dictyota caribaea*



Fonte: <http://www.boldsystems.org>

Figura 10 – Imagem do sítio de coleta da alga



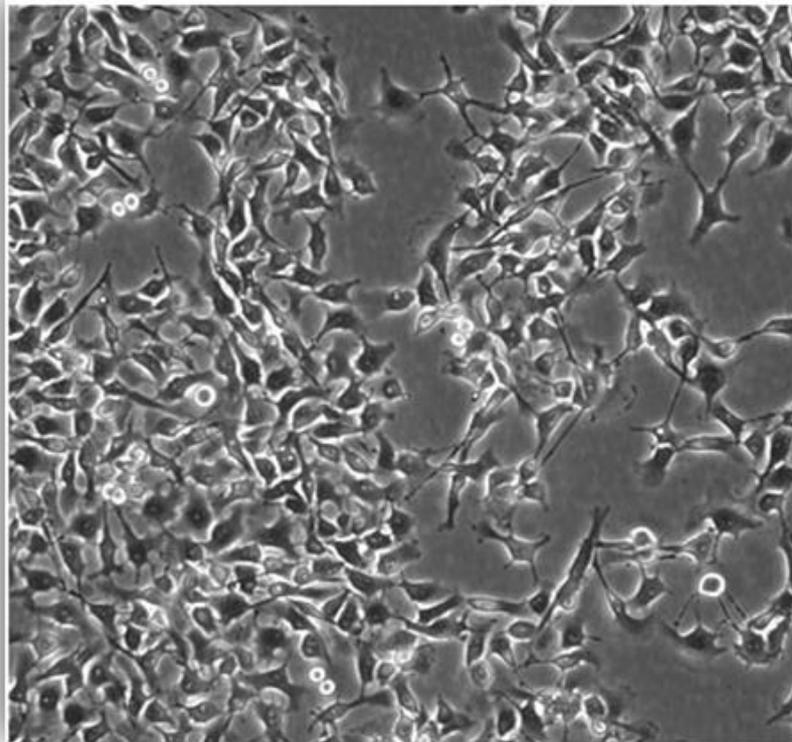
Fonte: Google maps. Coordenadas: 23°11'46"S 44°38'38"O

4.3 Linhagens celulares, procedimentos de cultura celular e tratamentos

RAW 264.7, uma linhagem de Mfs murinos (Figura 11), e uma linhagem de melanoma murino B16-F10 foram utilizadas neste trabalho (Figura 12). As células foram obtidas do banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ) e cultivadas em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco) complementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB) e 1% de antibióticos (para uma concentração final de 100 U/mL penicillina e 100 g/mL estreptomicina).

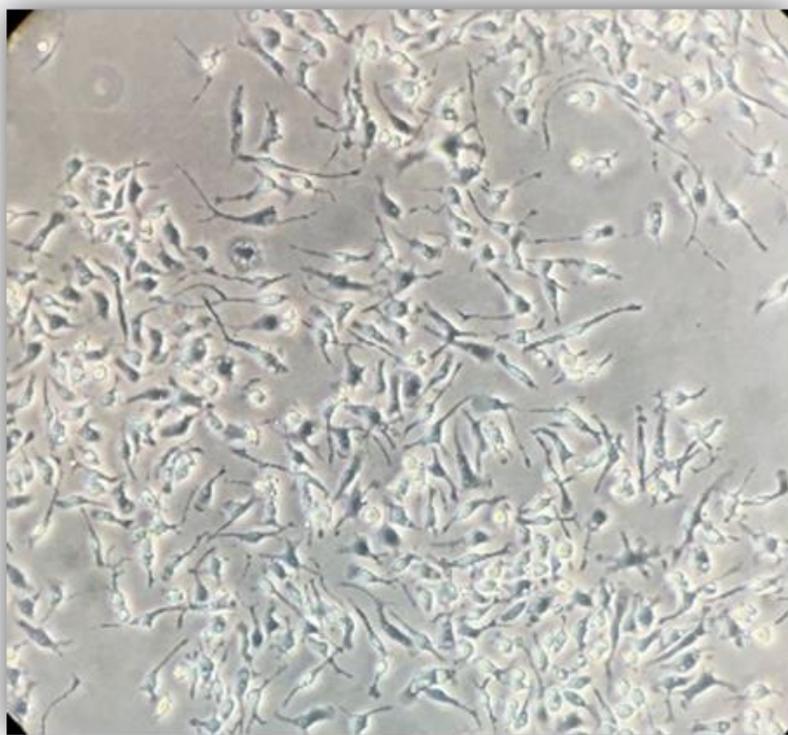
Os ensaios de ativação de Mfs foram conduzidos com células RAW 264.7 plaqueadas em placas de 48 poços na concentração de $1,5 \times 10^5$ células/mL ($7,5 \times 10^4$ /poço) e incubadas por 24h com: Solução Salina 0,9% (como controle negativo), lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* a 100 ng/mL (LPS) como controle positivo ou Dc- SP a 10, 100 e 250 µg/mL.

Figura 11 – Fotomicrografia da linhagem de melanoma murino B16-F10



Fonte: Arquivo pessoal da autora. Aumento: 400x

Figura 12 – Fotomicrografia da linhagem RAW 264.7



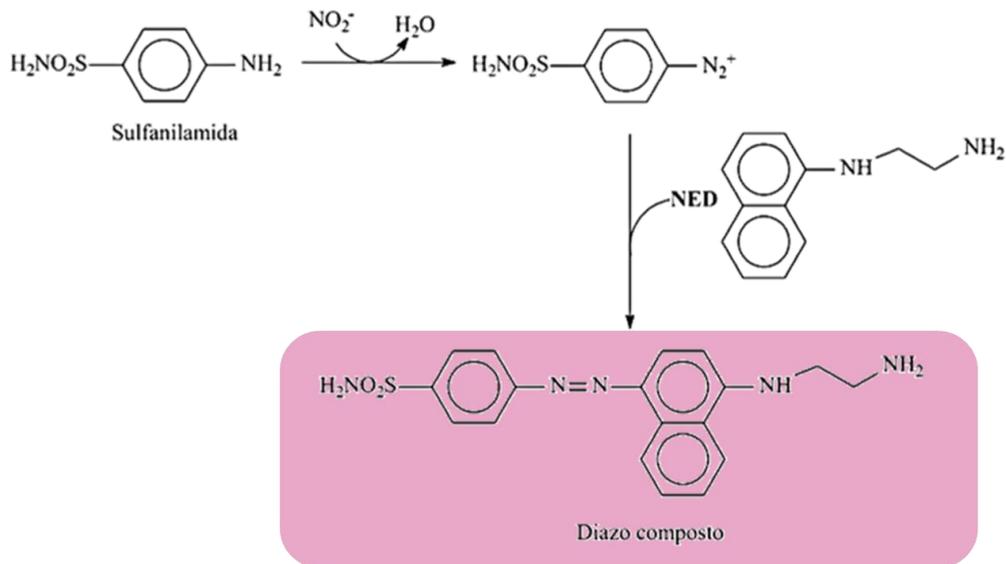
Fonte: Arquivo pessoal da autora. Aumento: 400x

4.4 Avaliação da ativação de macrófagos para fenótipo M1

4.4.1 Dosagem de nitrito

O teste de Griess é um método colorimétrico que permite a quantificação indireta de óxido nítrico (NO) a partir da detecção de nitrito em solução descrito por Green e colaboradores (1981). Na reação o íon nitrito reage com a sulfanilamida em meio ácido formando um sal de diazônio que reage por acoplamento com cloridrato de N-(1-naftil) etilenodiamina (NED) formando um diazo composto, conforme apresentado na Figura 13, de coloração magenta que apresenta um máximo de absorção em torno de 540nm (Ramos, 2006).

Figura 13 - Reação de Griess



Fonte: Adaptado de RAMOS, 2006

4.4.1.1 Procedimentos

Para a realização desse ensaio, os macrófagos murinos RAW 264.7 foram plaqueados 24h antes da adição da amostra teste em placas de 48 poços na concentração de $1,5 \times 10^5$ células/mL ($7,5 \times 10^4$ /poço).

As amostras de Dc-SP foram testadas nas concentrações de 10, 100 e 250 $\mu\text{g/mL}$ e o LPS (100 ng/mL) foi utilizado como controle positivo deste experimento. A solução salina 0,9% foi utilizada como veículo para dissolução dos PS e por isso também foi utilizada como

controle negativo do experimento. Todas as amostras foram incubadas com os tratamentos por 24h. Em seguida uma alíquota de 50 µl dos sobrenadantes dos macrófagos foi adicionada a 50 µl do reagente de Griess [sulfanilamida 1% em ácido acético 30% / N-(1-naftil)-etilenodiamina 0,1 % em ácido acético 60%] em ambiente escuro por um período de 5-10 minutos. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 560 nm. A concentração de nitrito (µM) foi determinada a partir de uma curva-padrão utilizando solução de NaNO₂ a uma concentração inicial de 200 µM seguida de diluições seriadas com fator de diluição igual a 2, com a menor concentração sendo 1,56 µM.

4.4.1.2 Análise estatística

A partir da curva-padrão do nitrito no ensaio de Griess foi utilizada regressão linear para determinar as concentrações de NO₂ em cada amostra. As concentrações de NO₂ encontradas foram analisadas por meio de interpolação dos valores e seguida de Análise de Variância (ANOVA) com pós teste de Dunnett utilizando o programa GraphPad Prism 8 (*p<0,05).

4.4.2 Dosagem de citocinas

Para detectar e quantificar as citocinas TNF-α, IL-1β e IL-10 nos sobrenadantes de macrófagos estimulados por Dc-SP (100 e 250 µg/mL), LPS (100 ng/mL) e salina foi utilizado o ensaio imunoenzimático ELISA. Nesse ensaio um anticorpo reconhece um antígeno para o qual é específico e a enzima covalentemente ligada ao anticorpo catalisa uma reação gerando um corante que pode ser detectado por espectrofotometria.

4.4.2.1 Procedimentos

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

em temperatura ambiente. As placas foram então lavadas três vezes com 200µl de tampão de lavagem e depois incubadas com anticorpo de detecção para TNF- α , IL-1 β e IL-10 em temperatura ambiente por 2 horas. Na etapa seguinte, as placas foram lavadas novamente por três vezes com 200µL de tampão de lavagem e incubadas com 100 µL de estreptavidina em temperatura ambiente por 20 minutos.

As placas foram lavadas três vezes com 200µL de tampão de lavagem. Na etapa seguinte, 100 µL da solução substrato para revelação foram adicionadas em cada poço e incubadas por 20 min à temperatura ambiente protegidos da luz. A reação enzimática foi cessada, adicionando 50 µL solução de parada (H₂SO₄). A absorbância foi medida à 450nm. O resultado foi expresso em pg/mL.

4.4.2.2 Análise estatística

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

4.4.3 Análise de marcadores de superfície e intracelular de macrófagos M1 por citometria de fluxo

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

Para visualização dos marcadores de superfície de ativação de Mfs com fenótipo M1 foram utilizados os anticorpos anti-CD86 conjugados com FITC (11-0862-82) e anti-MHC II conjugados com PE (12-5320-82) da Thermo Fisher (Waltham, MA, EUA). Para a visualização de marcador M1 intracelular iNOS, foi utilizado o anticorpo anti-iNOS conjugado com Alexa Fluor 488 (53-5920-82).

4.4.3.1 Procedimentos

RAW 264.7 foi obtida através da soltura das células utilizando *cell scrapper* (raspador de células). Em seguida, para a marcação de superfície, as células foram incubadas com os anticorpos anti-CD86, anti-MHC II durante 30 minutos a 4°C em tampão FACS (PBS suplementado com 4% de FBS) e depois lavadas novamente com tampão FACS. Para a marcação com iNOS, as células foram fixadas com paraformaldeído 1% por 5 minutos e permeabilizadas com Triton X-100 0,1% por 5 minutos. Posteriormente, essas células foram incubadas com anti-iNOS conjugado com Alexa Fluor 488 por 30 minutos a 4 °C em tampão FACS e lavadas novamente com tampão FACS. Usamos citômetro de fluxo (modelo FACVerse, BD Biosciences, San Jose, EUA) para aquisição de dados e software FlowJo (San Jose, CA, EUA) para a análise. Dez mil eventos foram adquiridos excluindo debris e eventos duplos (duplets) para cada tubo. Os valores de intensidade de fluorescência mediana (MFI) da expressão de iNOS, MHC II e de CD86 foram normalizados usando os valores médios de MFI do controle negativo. Além disso, a porcentagem de células isoladamente ou duplamente marcadas foi usada para mostrar a população de células que expressam MHC II e CD86 simultaneamente.

4.4.3.2 Análise estatística

Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM). As diferenças entre os grupos experimentais foram comparadas por Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de pós-teste de Dunnet ($P < 0,05$) utilizando o programa Graphpad Prism 8 (Intuitive Software for Science, San Diego, CA, EUA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dc-SP nas concentrações de 100 e 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ estimulou a produção de NO (Figura 14 A) e aumentou a expressão de iNOS (Figura 15 A-B) em células RAW 264.7. Nakamura e colaboradores demonstraram que uma fucoïdãna comercial induziu a produção de NO em macrófagos RAW 264.7 num intervalo de doses de 25-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Nakamura et al, 2006). De maneira similar, Teruya e colaboradores mostraram que uma fucoïdãna isolada de *Laminaria angustata* induziu a produção de NO em RAW 264.7 num intervalo de doses de 50-400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Teruya et al, 2010). Essas concentrações são maiores do que as utilizadas no presente trabalho, mostrando que Dc-SP nas doses testadas tem uma atividade imunoestimulatória mais potente em doses que não são tão elevadas como nos trabalhos citados anteriormente. O óxido nítrico é um radical livre altamente volátil que participa de vários processos fisiológicos e patológicos no corpo, como a regulação da pressão sanguínea, inibição da adesão de leucócitos ao endotélio e indução de apoptose (Moncada et al, 1991; Duque et al, 2014). Tanto a presença de microrganismos patogênicos quanto certas substâncias podem ativar Mfs, resultando na secreção de citocinas que desempenham um papel crucial na resposta imunológica do hospedeiro (Shapouri-Moghaddam et al, 2018).

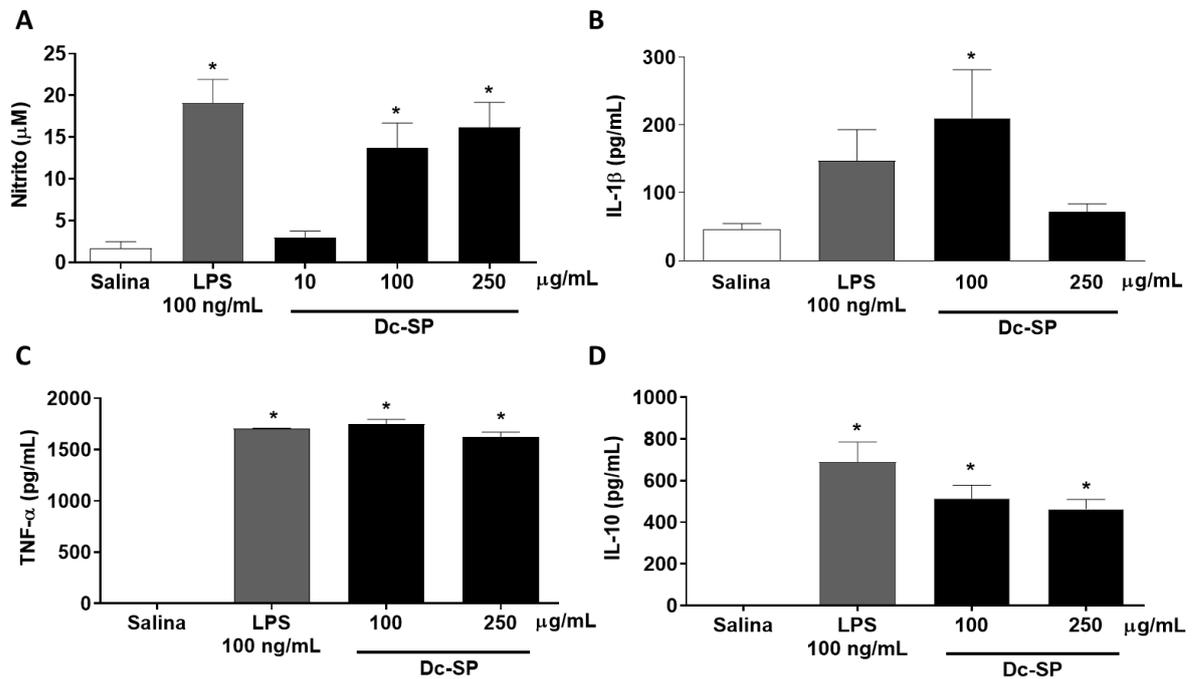
Além disso, Dc-SP também aumentou a secreção das citocinas TNF- α , IL-1 β na (concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e IL-10 (Figura 14 B-D), em comparação com o grupo controle negativo. Como já descrito na literatura, os polissacarídeos sulfatados têm potencial imunomodulatório na produção de citocinas (Pérez-Recalde et al, 2014; Tabarsa et al, 2018; Surayot et al, 2016). TNF- α é secretada principalmente por macrófagos e é um importante mediador inflamatório. É seletivamente citotóxico para alguns tipos de células tumorais *in vitro* e induz múltiplas vias intracelulares (Goossens et al, 1995; Vilcek et al, 1991). Estudos têm demonstrado que fucanas são capazes de modular citocinas e NO, demonstrando o potencial imunomodulatório desse polissacarídeo (Berteau et al, 2003; Rossol et al, 2011). Juntos, esses marcadores indicam que as células RAW 264.7 foram polarizadas para um fenótipo semelhante ao M1, associado a atividades inflamatórias, microbicidas e tumoricidas (Yao et al, 2019; Wang et al, 2019). O efeito imunomodulador de fucoïdãnas em Mfs está associado à produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-6, IL-1 β , bem como a produção de óxido nítrico (NO) e iNOS (Deng et al, 2020; Nakamura et al, 2006; Bi et al, 2018; Tabarsa et al, 2020).

Fucanas sulfatadas derivadas de *Agarum cribrosum* levaram a um aumento notável na produção de óxido nítrico e na regulação da expressão de iNOS e IL-10 devido à ativação do

fator nuclear kappa β (NF- κ β) em cultura de células da linhagem RAW 264.7 (Cho et al, 2014). Outro estudo mostra aumento na produção de NO em células RAW 264.7 de maneira dose-dependente quando expostas à fucoidana de algas pardas *Nizamuddinina zanardinii*. Além disso, essa fucoidana induz uma regulação positiva do mRNA de iNOS, TNF- α , IL-6 e IL-1 β (Tabarsa et al, 2020). Da mesma forma, fucoidana isolada de *Laminaria angustata*, uma alga parda, induziu a ativação de Mfs para um fenótipo semelhante ao M1, aumentando a produção de NO e a síntese e secreção de TNF- α e IL-6 em células RAW 264.7 (Teruya et al, 2010). Tabarsa e colaboradores mostraram que fucoidanas de *Nizamuddinina zanardinii* aumentaram a expressão de iNOS e a produção de NO, além de liberar diversas citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β , IL-6, e a anti-inflamatória IL-10 (Tabarsa et al, 2020). A IL-10 produzida inibiu a superexpressão das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6, exibindo respostas imunológicas (Jiang et al, 2021).

Nossos resultados mostraram um aumento da citocina anti-inflamatória IL10 nas concentrações de Dc-Sp testadas. Os macrófagos M2 são divididos em subcategorias M2a, M2b, M2c e M2d. Estes macrófagos se diferenciam em seus marcadores de superfície celular, citocinas secretadas e funções biológicas (Mantovani, Sica et al. 2004). Os macrófagos M2b são ativados pelo complexo imune, pelos ligantes do receptor do tipo Toll (TLR) e IL-1 β e liberam citocinas pró e anti-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10. Com base nos perfis de expressão de citocinas e quimiocinas, os macrófagos M2b regulam a amplitude das respostas imunes e reações inflamatórias (Wang et al, 2018). No entanto, estudos indicaram que as rotas de indução da polarização desses Mfs e os processos biológicos regulados são sistemas complexos de um espectro em vez de um esquema simplista (Atri et al, 2018)). A polaridade M1/M2 resulta do metabolismo da arginina através de duas vias antagônicas: os macrófagos do tipo M1 são os produtos da via iNOS, que produz citrulina e NO a partir da arginina, enquanto os macrófagos do tipo M2 são os produtos da via arginase, que produz ornitina e uréia a partir de arginina (Lampiasi et al, 2016). Nesse contexto, a produção de citocina anti-inflamatória IL-10 não parece estar associada a uma polarização para o macrófago M2, já que em conjunto, nossos resultados mostram não só a produção de citocinas pró-inflamatórias como também a produção de NO através da iNOS. Portanto, IL-10 pode estar atuando para suprimir a hiperativação das células RAW 264.7, secretando citocinas anti-inflamatórias, auxiliando assim no equilíbrio entre citocinas pró e anti-inflamatórias em células RAW 264.7 ativadas por fucoidanas.

Figura 14 - Polissacarídeo sulfatado da alga parda *Dictyota caribaea* induz macrófagos para um fenótipo M1



Células RAW264.7 foram expostas a solução salina como controle negativo, lipopolissacarídeo de *E. coli* a 100 ng/mL (LPS) como controle positivo e concentrações crescentes de polissacarídeos sulfatados de *D. caribaea* (Dc-SP) por 24h. **A**, os níveis de nitrito produzidos por Mfs (linha celular RAW264.7) foram avaliados pelo ensaio de Griess, enquanto **B-D** mostram os níveis de IL- β , TNF- α e IL-10, respectivamente, avaliados por ELISA. Os dados são apresentados como média \pm DP. As diferenças entre o controle negativo e os outros grupos foram determinadas pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Dunnett. * $p < 0,05$ quando comparado com o controle negativo. Os resultados são representativos de três experimentos independentes, cada um realizado em triplicata.

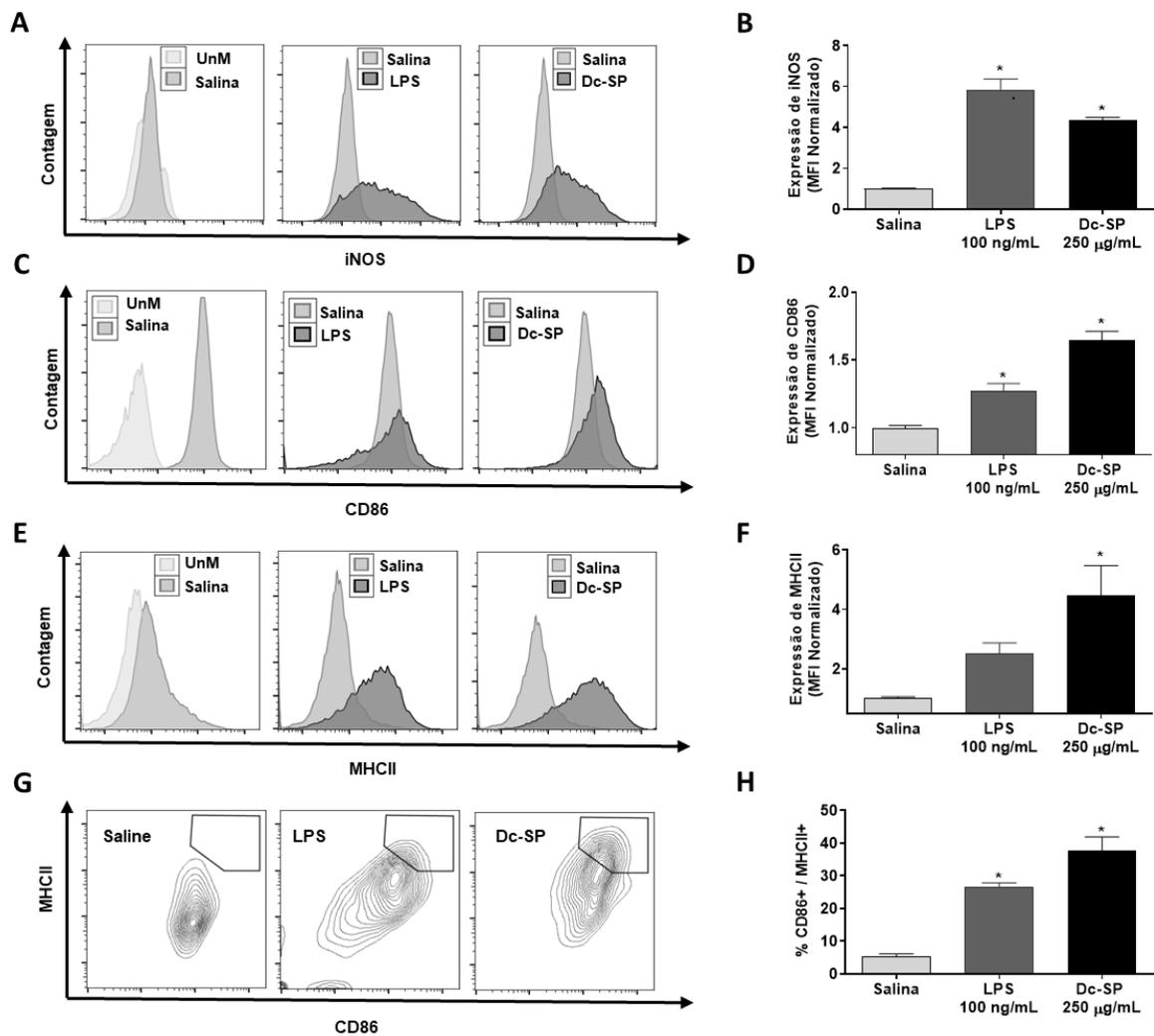
Dc-SP aumentou a expressão do MHC II e do CD86 na superfície das células RAW 264.7 (Fig. 17C-H). A expressão de CD86 aumentou em 1,6 vezes e cerca de 4,5 vezes para o MHC II em comparação com o grupo salina ($p < 0,05$). O CD86 é uma molécula coestimuladora considerada um marcador para o fenótipo M1 (Shapouri-Moghaddam et al, 2018; Wang et al, 2019). Além disso, Mfs apresentam antígenos às células T auxiliares por meio do CD86 e MHC II, regulando respostas imunes inatas e adaptativas na presença de patógenos ou substâncias ativadoras (Zhang et al, 2014). A regulação positiva do MHC II está relacionada à apresentação de antígenos e à ativação das células T, além de estar envolvida na interação entre as células T e as células apresentadoras de antígenos, como Mfs, para atividades antitumorais (Kim et al, 2004; Meng et al, 2014).

A fucoidana extraída de *Laminaria japonica* induziu a liberação de NO, IL-6 e TNF- α em células RAW 264.7. Além disso, esse mesmo polissacarídeo aumentou a porcentagem de células CD86⁺ (marcador para macrófagos semelhantes a M1), enquanto a porcentagem de

células CD206⁺ (marcadores de macrófagos associados ao tumor semelhante a M2) diminuiu após a incubação com RAW 264.7 ou monócitos derivados de medula óssea de camundongo (BMDMs) (Deng et al, 2022). Um estudo demonstrou que o Complexo Polissacarídeo-Proteína de *Lycium barbarum*, uma espécie de planta originária das regiões da Ásia, foi capaz de ativar Mfs, induzindo a expressão de moléculas coestimuladoras como CD80, CD86 e CD40, além de aumentar a produção de MHC II e citocinas TNF- α , IL-1 β em Mfs RAW 264.7 (Chen et al, 2009). Um polissacarídeo de *Tinospora cordifolia*, uma planta medicinal amplamente utilizada na medicina tradicional da Índia e de outras regiões do Sul da Ásia, ativou Mfs através da via clássica de maneira dependente de TLR4-MyD88, levando à produção de marcadores M1, como óxido nítrico (NO), óxido nítrico sintase induzível (iNOS), citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL- β , IL-6, IL-12, IL-10 e IFN- γ , bem como marcadores de superfície de Mfs ativados, como CD86 e MHC II [41]. A ativação M1 é vantajosa para o hospedeiro, uma vez que citocinas como IFN- γ , IL-1 β e IL-6 produzidas por Mfs exibem uma resposta antitumoral. Por outro lado, as TAMs com um fenótipo M2 muitas vezes estão associadas a efeitos pró-tumorais, como crescimento tumoral, metástase e angiogênese (Zhou et al, 2010; Alfano et al, 2013).

Em conjunto, nossos resultados sugerem que Dc-SP é um agente imunomodulador promissor ao modular Mfs para um fenótipo M1. Além disso, Dc-SP exerce inibição antitumoral *in vivo* e pode modular o MAT através da atividade dos Mfs (Assef et al, 2021). Além disso, estudos anteriores demonstraram a atividade antiproliferativa de meio condicionado de RAW 264.7 ativados com Dc-SP em linhagem de melanoma B16-F10, como já mostrado na figura 7 (Assef, 2017)

Figura 15 - Polissacarídeo sulfatado da alga parda *Dictyota caribaea* induz a expressão de marcadores de superfície e intracelular



A expressão de iNOS, CD86 e MHC II foi avaliada em células RAW264.7 por citometria de fluxo. Células RAW264.7 foram incubadas por 24h com solução salina (como controle negativo), lipopolissacarídeo de *E. coli* a 100 ng/mL (LPS) como controle positivo e Dc-SP a 250 µg/mL. Os histogramas de citometria de fluxo são representados em A, C e E. Os dados de intensidade mediana de fluorescência (MFI) são representados em B, D e F, como valores normalizados. A porcentagem de células CD86+/MHC II+ está representada em G e H. Os experimentos de citometria de fluxo adquiriram dez mil eventos, excluindo detritos e dupletos. Células não coradas (UnM) foram usadas como referência para anticorpo basal de fundo. Os dados de B, D, F e H são apresentados como média ± DP. As diferenças médias entre o controle negativo versus outros grupos foram comparadas por análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Dunnett. Os resultados são representativos de três experimentos independentes, cada um realizado em triplicata.

Nos trabalhos anteriores realizados pelo grupo, Dc-SP não apresentou citotoxicidade contra as células de melanoma murino B16-F10, no entanto, as amostras de MC apresentaram inibição do crescimento das células tumorais B16-F10 (Figura 7A). Uma diminuição no número de células pode ser observada nas concentrações de 100 e 250 µg/mL de MC de Mfs ativados por Dc-SP quando comparadas ao grupo controle salina (Figura 7B), sugerindo que o MC de Dc-SP favorece a inibição da proliferação do melanoma murino B16-F10. A Doxorubicina (DOX) a uma concentração 0,6 µM também reduziu a contagem de células.

No entanto, como mostrado na Figura 7C, não foram encontradas alterações na integridade da membrana das células incubadas com MC, indicando que a amostra não causou danos à membrana celular. Apenas a DOX alterou a porcentagem de células com membranas intactas. Além disso, a análise morfológica mostrou aumento nas populações com encolhimento celular e células com alta granulosidade (Figura 7D-F).

Engström e colegas demonstraram que o MC de Mfs humanos polarizados para um fenótipo M1 após exposição ao LPS e interferon-gama (IFN- γ) inibe a proliferação de linhagens de adenocarcinoma colorretal (Engström et al, 2014). Já o MC de RAW 264.7 polarizadas para fenótipo semelhante ao M1 com fucoidana de *L. japonica* reduziu significativamente a viabilidade celular de duas linhagens de células tumorais (HCT116 e RKO) em cerca de 40% (Deng et al, 2022). Da mesma forma, fucoidana de *Cladosiphon okamuranus* não inibiu o crescimento de células de sarcoma 180 *in vitro*. No entanto, quando co-cultivadas com RAW 264.7 em contato com essas fucoidanas, observou-se a inibição do crescimento celular tumoral. Esse efeito foi atribuído à liberação de NO por RAW 264.7 como um marcador para o fenótipo M1 (Takeda et al, 2012).

Nossa abordagem não pôde relacionar o efeito do NO, uma vez que nós utilizamos o meio condicionado, que já converteu o NO em nitrito e não está ativo posteriormente. Além disso, devido ao reconhecido efeito citotóxico da família TNF, testamos a atividade antiproliferativa de TNF- α para avaliar seu papel na inibição de B16-F10 pelo MC de células RAW 264.7 (dados não mostrados). Contudo, o TNF- α não inibiu o crescimento das células B16-F10 após 48 horas de tratamento utilizando as mesmas concentrações encontradas nas amostras de MC no ensaio de ELISA. Portanto, outros mediadores produzidos por Mfs devem estar relacionados à inibição do crescimento celular B16-F10.

A apoptose é um dos principais mecanismos pelos quais os agentes quimioterápicos anticancerígenos matam as células. Marcadores de DNA de alto peso molecular hidrofílico, como o iodeto de propídio, não conseguem penetrar em células intactas devido ao seu tamanho e não rotulam células apoptóticas, a menos que elas apresentem mudanças na permeabilidade da membrana plasmática, como ocorre nas fases tardias da apoptose (Povea-Cabello et al, 2017). O encolhimento celular devido à desidratação pode ser detectado nas fases iniciais da apoptose como uma diminuição na intensidade do sinal de dispersão de luz para a frente (FSC) (Ormerod et al, 1995; Swat et al, 1991). Algumas fucanas apresentam atividade antiproliferativa por meio de vários mecanismos, como indução de parada no ciclo celular, apoptose e ativação do sistema imunológico. Essas atividades, como a indução da

inflamação por meio do sistema imunológico, estresse oxidativo e mobilização de células-tronco, têm sido associadas a essas propriedades anticancerígenas (Kwak-Kim et al, 2014).

Estudos anteriores do nosso grupo sugeriram que a atividade antitumoral de Dc-SP contra células da linhagem S-180 *in vivo* está relacionada ao aumento das respostas imunológicas (Assef et al, 2021). Isso mostra que Dc-SP tem uma atividade antitumoral por meio da imunomodulação do MAT, em vez de matar diretamente as células tumorais, o que poderia ser promissor em termos de redução dos efeitos colaterais de substâncias citotóxicas. O presente estudo forneceu evidências adicionais que apoiam o efeito imunomodulador de Dc-SP em macrófagos confirmando sua polarização para o fenótipo M1 e de que a atividade antitumoral *in vivo* previamente relatada para o Dc-SP (Assef et al, 2021) está relacionada com a influência desses macrófagos no MAT.

6 CONCLUSÕES

- Macrófagos RAW 264.7 ativados por Dc-SP foram polarizados para o fenótipo semelhante ao antitumoral influenciando no efeito antiproliferativo contra melanoma metastático murino B16-F10 *in vitro*

7 CAPÍTULO II

**FUCOIDANA DE *MACROCYSTIS PYRIFERA* ATUA COMO IMUNOESTIMULANTE,
MODULANDO O FENÓTIPO DE MACRÓFAGOS E AUMENTANDO A
SENSIBILIDADE TERAPÊUTICA DE DACARBAZINA EM UM MODELO DE
MELANOMA MURINO *IN VIVO***

8 INTRODUÇÃO

No início da década de 80, as fucoïdanas foram reconhecidas por seu papel no suporte à resposta imune e, posteriormente, na década de 90, trabalhos por seus efeitos sobre estimulação imune (Li, Y. et al., 2021). As fucoïdanas possuem efeito antitumoral através da estimulação do sistema imunológico (Hu et al, 2010); ativam macrófagos (Takeda et al., 2012); induzem a maturação de células dendríticas e direcionam sua diferenciação (Yang; MA et al., 2008), protegem as células dendríticas contra o dano celular induzido pelo quimioterápico 5-fluorouracil (Jeong; Ko & Joo, 2012) para, de maneira indireta, inibir o crescimento tumoral.

Atualmente, as fucoïdanas tem sido cada vez mais utilizadas na terapia complementar em pacientes com câncer gástrico, câncer colorretal e outros tipos de câncer (Wu et al., 2022). Evidências clínicas mostraram que pacientes com câncer gastrointestinal metastático ou recorrente que receberam fucoïdanas como tratamento complementar adjuvante tiveram um tempo de sobrevida significativamente prolongado, maior taxa de controle da doença, melhores perfis anti-inflamatórios, efeitos colaterais mais leves durante a quimioterapia convencional, redução da fadiga e maior tolerância a mais ciclos de quimioterapia (Nagamine, et al, 2020; Wu et al., 2022). Diversos mecanismos têm sido relatados para explicar o efeito antitumoral das fucoïdanas, incluindo a inibição da proliferação de células tumorais regulando o ciclo celular, indução de apoptose de células tumorais, modulação da transdução de sinal, antiangiogênese e atividades anti-inflamatórias, etc.

A atividade imunomoduladora de fucoïdanas na diferenciação de macrófagos demonstrou contribuir para sua atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* (Deng et al., 2022; Stoltzfus et al., 2021). Esses dados sugerem que as fucoïdanas podem ser agentes imunomoduladores com grande potencial na imunoterapia do câncer. No microambiente tumoral, a imunidade contra o câncer envolve uma rede complexa de múltiplos subconjuntos de células imunológicas, como linfócitos T, células dendríticas (DCs), macrófagos, células natural killer, etc., e seus produtos de citocinas secretadas interagem com células tumorais (Jayawardena et al., 2022; Marciscano & Anandasabapathy, 2021). Nas últimas décadas, a visão do câncer como uma mera coleção de células que proliferam de forma desregulada tem sido substituída pela ideia de um conjunto complexo e heterogêneo de células que formam uma rede dinâmica que, além das células do parênquima tumoral, inclui células estromais como: fibroblastos, células do tecido vascular e células do sistema imune. Em conjunto, essas

células dão origem ao microambiente tumoral (MAT) que desempenha diversas funções durante a progressão tumoral (Marks et al., 2016; Northcott et al., 2015).

Entre as células imunes encontradas no MAT, os macrófagos associados ao tumor (TAMs) são as mais abundantes em tumores sólidos. Evidências sugerem que os TAMs desempenham papéis relevantes para a progressão tumoral como: regulação da angiogênese, metástase, imunossupressão e resistência à quimioterapia (Chanmee et al., 2014; Fang et al., 2014; Sun et al., 2014). No MAT, os macrófagos, após a estimulação, podem ser polarizados para um fenótipo semelhante a M1 e um fenótipo semelhante a M2 (Taniguchi et al., 2015).

Os Mfs semelhantes a M1 secretam moléculas e citocinas pró-inflamatórias, como o óxido nítrico e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), promovendo a resposta imune contra células tumorais. Em contraste, os Mfs semelhantes a M2 secretam citocinas e fatores com função anti-inflamatória, como IL-4, IL-13 e VEGF, promovendo resposta pró-tumoral, regulando a remodelação de tecidos e promovendo angiogênese. A polarização dos Mfs no MAT é complexa, sendo os fenótipos M1 e M2 extremos de um espectro de polarização, e os TAMs acabam expressando combinações desses dois marcadores. (Tariq, M. et al., 2017; Boutilier, A.V et al., 2021). Os TAMs têm despontado como alvos de novas terapias para o tratamento do câncer. Algumas estratégias incluem a depleção de TAMs, a inibição do recrutamento de monócitos circulantes e a repolarização de TAMs de fenótipos pró-tumorais para fenótipos anti-tumorais (Allavena & Mantovani, 2012).

A quimioterapia citotóxica não simplesmente mata as células tumorais, mas inevitavelmente destrói subconjuntos de células imunológicas, prejudicando assim a capacidade do sistema imunológico do hospedeiro de combater as células tumorais restantes e agravando ainda mais a evasão tumoral (Rébé & Ghiringhelli, 2015). Devido a isto, há um crescente interesse em complementar as quimioterapias antitumorais já utilizadas na clínica com compostos naturais que sejam potenciais imunomoduladores para melhorar a qualidade de vida em pacientes com câncer (Pan et al., 2019). Em resposta ao sinal de hipóxia, os TAMs geralmente apresentam predominantemente um fenótipo tumorigênico M2, o que contribui para a fuga imunológica das células tumorais e promove a metástase e resistência à quimioterapia do tumor (Andon et al, 2017). No entanto, devido à plasticidade dos macrófagos, eles podem ser induzidos diretamente ao fenótipo M1 (Andon et al, 2017; Sendo et al, 2018). Diferentemente do fenótipo M2, os macrófagos M1 atuam combatendo tumores e podem entregar de forma sinérgica medicamentos quimioterápicos e aumentar a sensibilidade das células cancerígenas a esses medicamentos. Os TAMs mantêm o estado de imunossupressão nos locais do tumor e promovem a progressão do tumor e a resistência à

quimioterapia ao produzir espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico (NO), arginase 1, IL-12 e CCL4, entre outros (Nowak et al, 2020; Shibutani et al, 2021). Além disso, os medicamentos quimioterápicos podem induzir ainda mais a resistência à quimioterapia, reduzindo o acúmulo de Células supressoras de origem mieloide (MDSC do inglês *myeloid-derived suppressor cells*) e macrófagos M1 no tumor (Liu et al, 2020).

Ensaio utilizando fucoidana da alga *Macrocystis pyrifera* mostraram que esse PS foi capaz de retardar a morte de neutrófilos humanos em baixas concentrações e promover ativação e citotoxicidade de células *natural killer* NK contra uma linhagem de linfoma. Além disso, induziu forte ativação de células dendríticas e linfócitos T e resposta imune específica a ovalbumina. Entretanto, não há trabalhos mostrando os efeitos da fucoidana de *M. pyrifera* sobre a modulação fenotípica de Mfs para um fenótipo antitumoral (Zhang, W. et al., 2015). As células do sistema imunológico inato (macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células natural killer), em conjunto com a imunidade adaptativa (linfócitos T e B), fornecem uma forte primeira linha de defesa contra células de câncer, detectando e eliminando células cancerosas mais imunogênicas e combatendo o crescimento espontâneo de tumores (Pasto et al., 2020). As células NK promovem o recrutamento de células dendríticas (DC do inglês *dendritic cells*) para tumores sólidos, liberando quimiocinas (como CCL5, XCL2, etc.), e promovem a polarização das células Th1 ao liberar IFN- γ (Chiossone et al., 2018). No MAT, a interação entre DCs e NKs pode promover a maturação das DCs, fazendo com que elas liberem citocina IL-12 e promovam a expressão de CD86, aumentando assim a ativação das células T CD8. As células NK também podem regular indiretamente as células T, regulando as células apresentadoras de antígenos (APC do inglês *Antigen presenting cells*) para garantir a iniciação das células T (Pierce et al., 2020). Portanto, existe uma correlação significativa entre o comprometimento da função imunológica relacionada ao câncer e a função biológica das células NK.

Alguns trabalhos têm demonstrado que macrófagos RAW264.7 tratados com fucoidanas de algas pardas aumentaram a expressão de mediadores pró-inflamatórios como IL-6 e TNF- α , além de aumentar a produção de NO e iNOS. Além disso, esta mesma fucoidana também ativou a via de sinalização NF- κ B, aumentando a fosforilação de I κ B- α e p65, e aumentou a via de sinalização MAPK, induzindo a fosforilação de p38 (Bi et al, 2018). A produção aumentada de NO nos macrófagos pode ocorrer por meio da via de sinalização p38 MAPK e NF- κ B (Nakamura et al, 2006). Uma fração de fucoidana derivada de *Nizamuddinina zanardiinii* foi capaz de ativar macrófagos RAW264.7, aumentando a expressão de mRNA de citocinas (iNOS, NO, TNF- α , IL-1 β e IL-6) e proteínas que regulam a via de

sinalização MAPK e NF- κ B, como as proteínas p-NF- κ B, p-JNK, p-ERK e p-p38 (Tabarsa et al, 2020). Em resumo, esses resultados mostram que fucoidanas ativam os macrófagos RAW264.7, aumentando as citocinas inflamatórias e as vias de sinalização MAPK e NF- κ B.

Nesse contexto, avaliar o potencial imunoestimulante de polissacarídeos da alga *Macrocystis pyrifera* e seu efeito antitumoral, além da capacidade de influenciar na resposta da associação com quimioterápico é de grande relevância.

9 OBJETIVOS

9.1 Geral

Investigar o potencial imunoestimulante de uma fucoidana da alga *Macrocystis pyrifera* através da diferenciação de macrófagos para fenótipo antitumoral e da sensibilização terapêutica do uso de dacarbazina em modelo de melanoma murino *in vivo*

9.2 Específicos

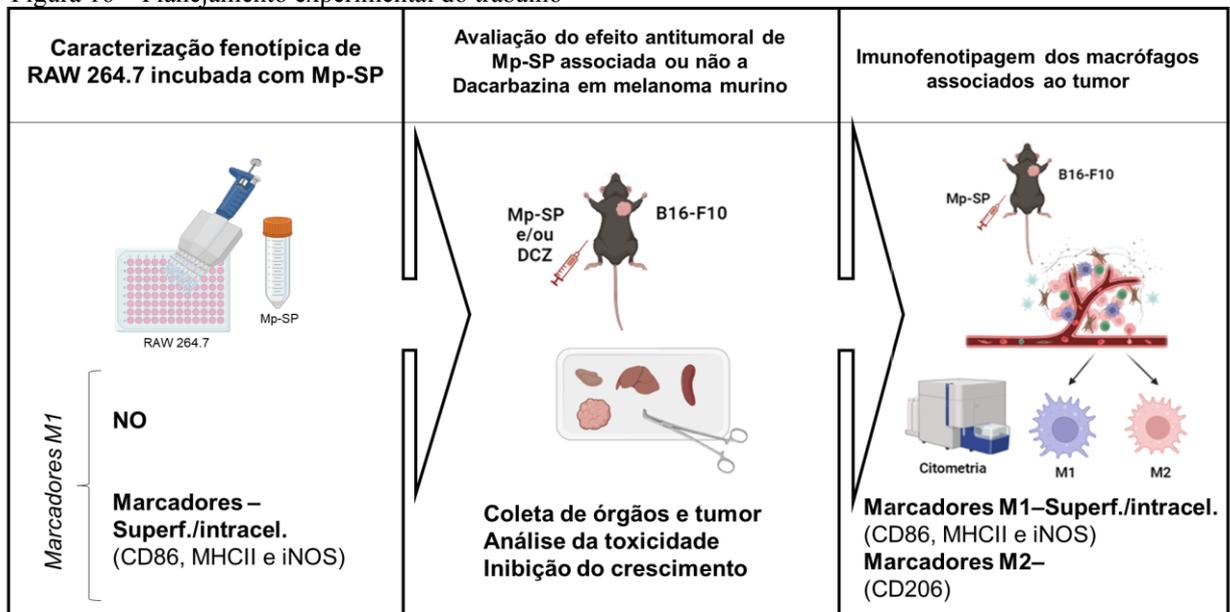
- Avaliar o efeito antiproliferativo do polissacarídeo sulfatado de *Macrocystis pyrifera* (Mp-SP) em na linhagem de melanoma murino B16-F10 *in vitro*
- Avaliar efeito de Mp-SP na ativação de macrófagos *in vitro*
- Avaliar o efeito antitumoral de Mp-SP *in vivo*
- Caracterizar fenotipicamente os macrófagos associados ao tumor dos animais tratados com Mp-SP
- Avaliar o efeito antitumoral da associação de Mp-SP com dacarbazina *in vivo*

10 MATERIAIS E MÉTODOS

10.1 Desenho Experimental

A fucoidana da alga *Macrocystis pyrifera* foi obtida comercialmente. Foi realizada a caracterização do fenótipo de RAW 264.7 ativada por Mp-SP *in vitro*. Além disso, foi avaliado o efeito antitumoral de Dc-SP e posterior caracterização fenotípica dos TAMs, seguido da investigação do efeito antitumoral da associação de Mp-SP e Dacarbazina num modelo de melanoma murino. A figura 16 resume de forma esquemática as etapas de trabalho adotadas neste estudo.

Figura 16 – Planejamento experimental do trabalho



Fonte: Elaborado pela autora com BioRender.com

10.2 Obtenção da fucoidana da alga parda *Macrocystis pyrifera*

A *Macrocystis pyrifera* é uma espécie de alga parda (Figura 17) que forma grandes Kelps. O polissacarídeo sulfatado da alga *Macrocystis pyrifera* (F8065-500MG) foi obtido comercialmente da empresa Sigma-Aldrich Brasil Ltda. A amostra possui $\geq 85\%$ de pureza e é um polissacarídeo do tipo fucoidana, rico em resíduos de fucose.

Figura 17 - Imagem da alga *Macrocystis pyrifera*



Fonte: Foto tirada por Octavio Aburto. Disponível em <https://wildcoast.org/week-3-giant-kelp-macrocystis-pyrifera/>

10.3 Linhagens celulares, procedimentos de cultura celular e tratamentos

RAW 264.7, uma linhagem de Mfs murinos (Figura 11), e uma linhagem de melanoma murino B16-F10 foram utilizadas neste trabalho (Figura 12). As células foram obtidas do banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ) e cultivadas em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco) complementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB) e 1% de antibióticos (para uma concentração final de 100 U/mL penicillina e 100 g/mL estreptomicina).

Os ensaios de ativação de Mfs foram conduzidos com células RAW 264.7 plaqueadas em placas de 48 poços na concentração de $1,5 \times 10^5$ células/mL ($7,5 \times 10^4$ /poço) e incubadas por 24h com os grupos: solução salina 0,9% (como controle negativo), lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* a 100 ng/mL (LPS) como controle positivo ou Mp- SP a 1, 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$.

10.4 Avaliação do efeito antiproliferativo de Mp-SP

10.4.1 Ensaio de SRB

O ensaio da sulforrodamina B (SRB) é utilizado para a determinação da densidade celular, com base na medição do teor de proteínas celulares totais e não depende do metabolismo celular, de acordo com Skehan e colaboradores (1990). Para a realização desse ensaio, as células B16-F10 foram plaqueadas 24h antes da adição das amostras em placas de 96 poços na concentração de 4×10^4 células/mL.

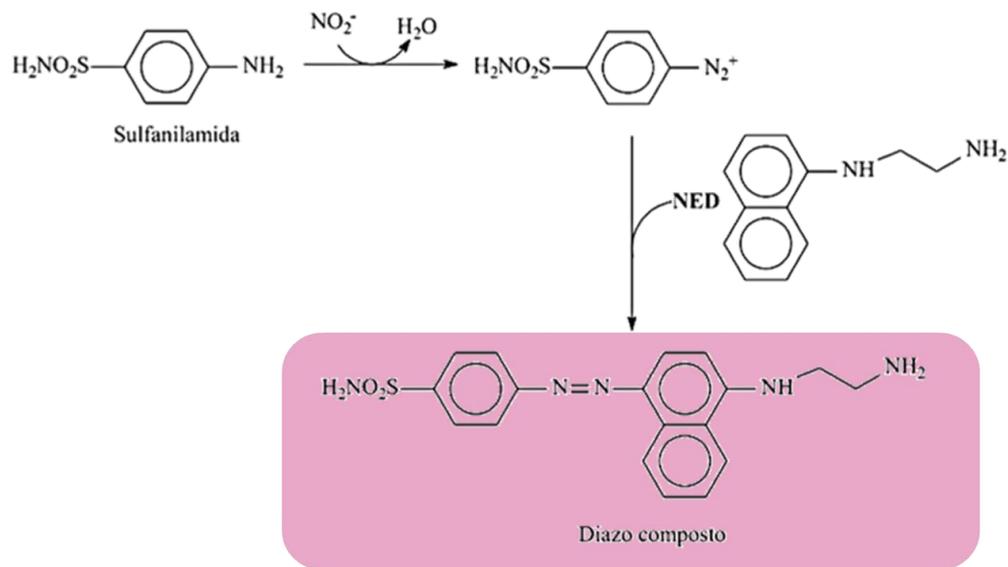
As amostras solução salina (controle negativo) e Mp-SP 1, 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$ foram incubadas durante 48h. No momento em que as células foram incubadas com os tratamentos, a placa tempo zero que não recebeu amostras) foi fixada com ácido tricloroacético (TCA) a 10%. Após o tempo de incubação de 48 h, o sobrenadante das células foi retirado e as mesmas também foram fixadas com TCA a 10%, Em seguida adicionou-se a solução de SRB. Para realizar a leitura das placas, o SRB ligado aos aminoácidos fixados, foi solubilizado em tampão tris base 10 mM. As absorbâncias foram lidas em leitora de placas (Fisher Scientific, modelo Multiskan FC) no comprimento de onda 564 nm ou 570 nm.

10.5 Avaliação do potencial imunoestimulante através da ativação de macrófagos para fenótipo M1 *in vitro*

10.5.1 Dosagem de nitrito

O teste de Griess é um método colorimétrico que permite a quantificação indireta de óxido nítrico (NO) a partir da detecção de nitrito em solução descrito por Green e colaboradores (1981). Na reação o íon nitrito reage com a sulfanilamida em meio ácido formando um sal de diazônio que reage por acoplamento com cloridrato de N-(1-naftil) etilenodiamina (NED) formando um diazo composto, conforme apresentado na Figura 13, de coloração magenta que apresenta um máximo de absorção em torno de 540nm (Ramos, 2006).

Figura 13 - Reação de Griess



Fonte: Adaptado de RAMOS, 2006

Para a realização desse ensaio, os macrófagos murinos RAW 264.7 foram plaqueados 24h antes da adição das amostras em placas de 48 poços na concentração de $1,5 \times 10^5$ células/mL ($7,5 \times 10^4$ /poço).

As amostras de Mp-SP foram testadas nas concentrações de 1, 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$ e o LPS (100 ng/mL) foi utilizado como controle positivo deste experimento. A solução salina 0,9% foi utilizada como veículo para dissolução dos PS e por isso também foi utilizada como controle negativo do experimento. Todas as amostras foram incubadas com os tratamentos por 24h. Em seguida uma alíquota de 50 μl dos sobrenadantes dos macrófagos foi adicionada a 50 μl do reagente de Griess [sulfanilamida 1% em ácido acético 30% / N-(1-nafítil)-etilenodiamina 0,1 % em ácido acético 60%] em ambiente escuro por um período de 5-10 minutos. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 560 nm. A concentração de nitrito (μM) foi determinada a partir de uma curva-padrão utilizando solução de NaNO₂ a uma concentração inicial de 200 μM seguida de diluições seriadas com fator de diluição igual a 2, com a menor concentração sendo 1,56 μM .

10.5.2 Análise de marcadores de superfície e intracelular de macrófagos M1 por citometria de fluxo

Para visualização dos marcadores específicos do fenótipo M1 foi realizado o ensaio de Elisa. A expressão de marcadores foi realizada com os anticorpos anti-CD86 conjugados com FITC (11-0862-82) e anti-MHC II conjugados com PE (12-5320-82) da Thermo Fisher

(Waltham, MA, EUA). Para a visualização de marcador M1 intracelular iNOS, foi utilizado o anticorpo anti-iNOS conjugado com Alexa Fluor 488 (53-5920-82).

RAW 264.7 foi obtida através da soltura das células utilizando *cell scrapper* (raspador de células). Em seguida, para a marcação de superfície, as células foram incubadas com os anticorpos (1:200) anti-CD86 conjugados com FITC (11-0862-82) e anti-MHC II conjugados com PE (12-5320-82) durante 30 minutos a 4°C em tampão FACS (PBS suplementado com 4% de FBS) e depois lavadas novamente com tampão FACS. Para a marcação com iNOS, as células foram fixadas com paraformaldeído 1% por 5 minutos e permeabilizadas com Triton X-100 0,1% por 5 minutos. Posteriormente, essas células foram incubadas com anti-iNOS conjugado com Alexa Fluor 488 (53-5920-82) por 30 minutos a 4 °C em tampão FACS e lavadas novamente com tampão FACS. Usamos citômetro de fluxo (modelo FACSVerse, BD Biosciences, San Jose, EUA) para aquisição de dados e software FlowJo (San Jose, CA, EUA) para a análise. Dez mil eventos foram adquiridos em single cells, excluindo debris e eventos duplos (duplets) para cada tubo. Os valores de intensidade de fluorescência mediana (MFI) da expressão de iNOS, MHC II e de CD86 foram normalizados usando os valores médios de MFI do controle negativo. Além disso, a porcentagem de células isoladamente ou duplamente marcadas foi usada para mostrar a população de células que expressam MHC II e CD86 simultaneamente.

10.6 Ensaios *in vivo*

10.6.1. Animais

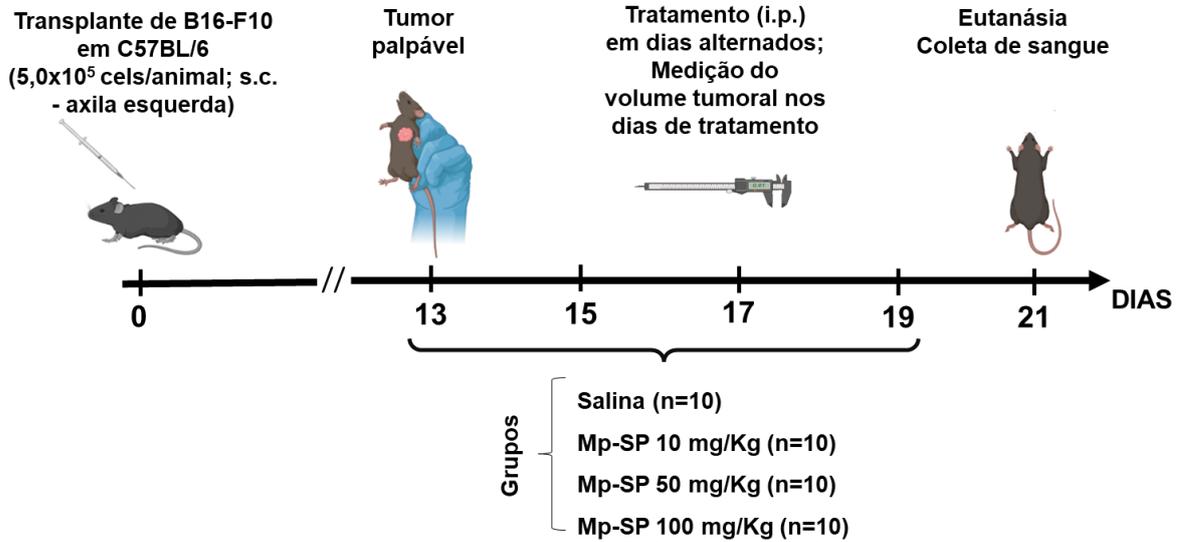
Foram utilizados camundongos *Mus musculus* fêmeas com idade entre 6-8 semanas e peso entre 22-25g da linhagem Black B57BL/6. Todos os animais foram mantidos sob condições ambientais controladas com ciclo claro/escuro de 12/12 h, com ração e água *ad libitum* no Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará. O manejo dos animais seguiu princípios éticos de experimentação animal do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) para amenizar o sofrimento destes (Nº 11.724/2008). Os ensaios *in vivo* tiveram autorização do Comitê de Ética em Pesquisa Animal mediante número do protocolo (Nº 6289010319) correspondente ao presente trabalho.

10.6.2 Avaliação do efeito antitumoral de Mp-SP

10.6.2.1 Seleção de doses de Mp-SP

As células do melanoma B16-F10 foram coletadas de uma cultura tripsinizada e, em seguida, transplantadas (Dia 0) 500 mil células/animal por via subcutânea para a região axilar esquerda dos camundongos C57/BL6. Esperou-se o tumor ficar palpável (tumor aparente) em mais da metade dos animais de cada grupo (dia 13) para iniciar o tratamento. Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos (n=10) e tratados por via intraperitoneal (i.p.) com solução salina (controle negativo) ou Mp-SP (10, 50 e 100 mg/Kg) em dias alternados. Foram realizadas 4 administrações dos tratamentos ao todo, nos dias 13, 15, 17 e 19 após o tumor estar palpável (Figura 18). No dia 21 após o transplante foram coletadas amostras de sangue do plexo retro-orbital dos camundongos sob efeito de anestésico (cetamina 10% + xilasina 2%) para análise dos parâmetros hematológicos e posteriormente os animais foram eutanasiados (cetamina 10% + xilasina 2%) para finalização do experimento. Durante todos os dias de tratamento foram realizadas as medidas dos tumores utilizando paquímetro, onde foram anotados os diâmetros maior e menor. Os volumes tumorais foram calculados de acordo com a fórmula: volume do tumor (mm³) = $L \times W^2/2$, onde L representa o eixo maior (maior diâmetro transversal), e W representa o eixo menor do tumor. Os volumes foram plotados em gráfico para posteriores análises e seleção da dose de Mp-SP para ensaios posteriores.

Figura 18 - Esquema do ensaio de seleções de doses



Fonte: Elaborado pela autora com Biorender.com

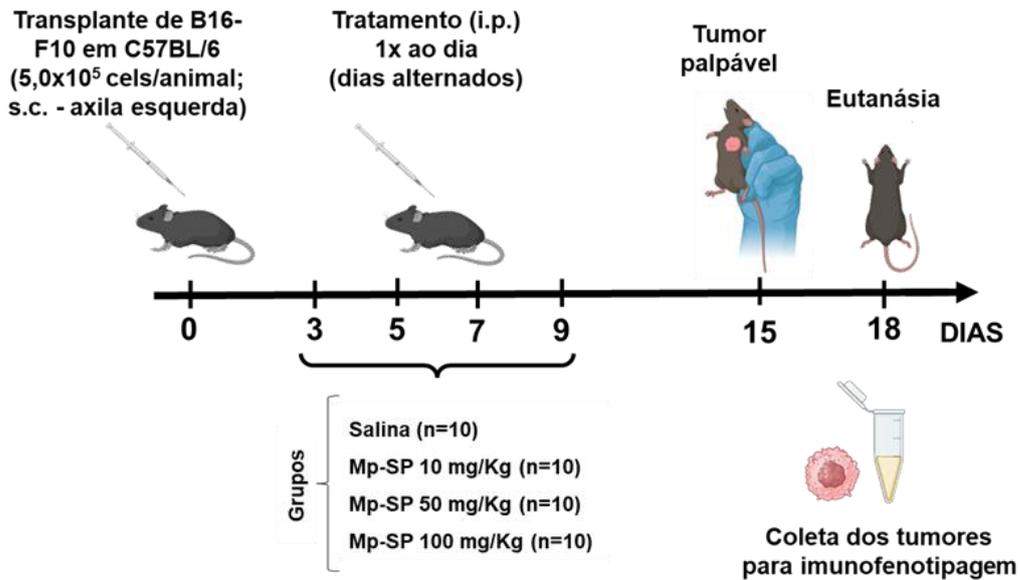
10.6.3 Avaliação da expressão de marcadores de superfície e intracelular de macrófagos M1 e M2 *in vivo*

10.6.3.1 Modelo de melanoma murino

As células do melanoma B16-F10 foram coletadas de uma cultura tripsinizada e, posteriormente, 500 mil células/animal foram injetadas (Dia 0) por via subcutânea na axila esquerda dos camundongos C57BL/6. Nos dias 3, 5, 7 e 9 após o transplante das células (Figura 19), foram iniciados os tratamentos por via intraperitoneal (i.p.) com solução salina (controle negativo n=10) ou Mp-SP (10, 50 e 100 mg/Kg n=10). Este modelo não seguiu o mesmo esquema utilizado na seleção de doses em que esperamos o tumor ficar palpável devido as características necrosantes deste tipo de tumor, por isso um tempo maior não permitiria avaliar com clareza o fenótipo dos Mfs encontrados no MAT. Os tratamentos se deram em dias alternados, totalizando 4 administrações. No dia 15 após o transplante do tumor, foi detectado que os tumores ficaram palpáveis, tendo assim a eutanásia sido realizada no dia 18 após transplante do tumor (cetamina 10% + xilasina 2%). Após eutanásia, os

tumores foram coletados para avaliação do fenótipo funcional dos macrófagos associados ao tumor (TAMs) por citometria de fluxo.

Figura 19 - Esquema do ensaio de imunofenotipagem *in vivo*.



Fonte: Elaborado pela autora com Biorender.com

10.6.3.2 Isolamento de macrófagos associados a tumor (TAMs)

As amostras de tumor (de 4 a 5 animais por grupo) foram processadas (degradação mecânica) e posteriormente digeridas em colagenase tipo II (1 mg/mL, Sigma) durante 60 min à temperatura de 37°C e sob agitação. Em seguida, a massa tumoral foi peneirada em *cell strainer* (peneira de células) de 50µm por 2 vezes para retirar possíveis grumos e separar as células. A solução de células foi centrifugada a 450 G por 2 min e posteriormente foi realizada a contagem em câmara de Neubauer. A concentração de células utilizada para marcação foi de 3x10⁶ células /mL e estas foram marcadas com os anticorpos específicos para identificação de macrófagos M1 e M2 e foram avaliados por citometria de fluxo. Para avaliar a marcação do fenótipo semelhante a M1, foram utilizados CD11b⁺/F4/80⁺/MHC II⁺/CD86⁺ e CD11b⁺/F4/80⁺/MHC II⁺/iNOS⁺. Para marcação do fenótipo semelhante a M2, foram utilizados ou CD11b⁺/F4/80⁺/MHC II⁺ /CD206⁺.

10.6.3.3 Imunofenotipagem das populações de macrófagos por citometria de fluxo

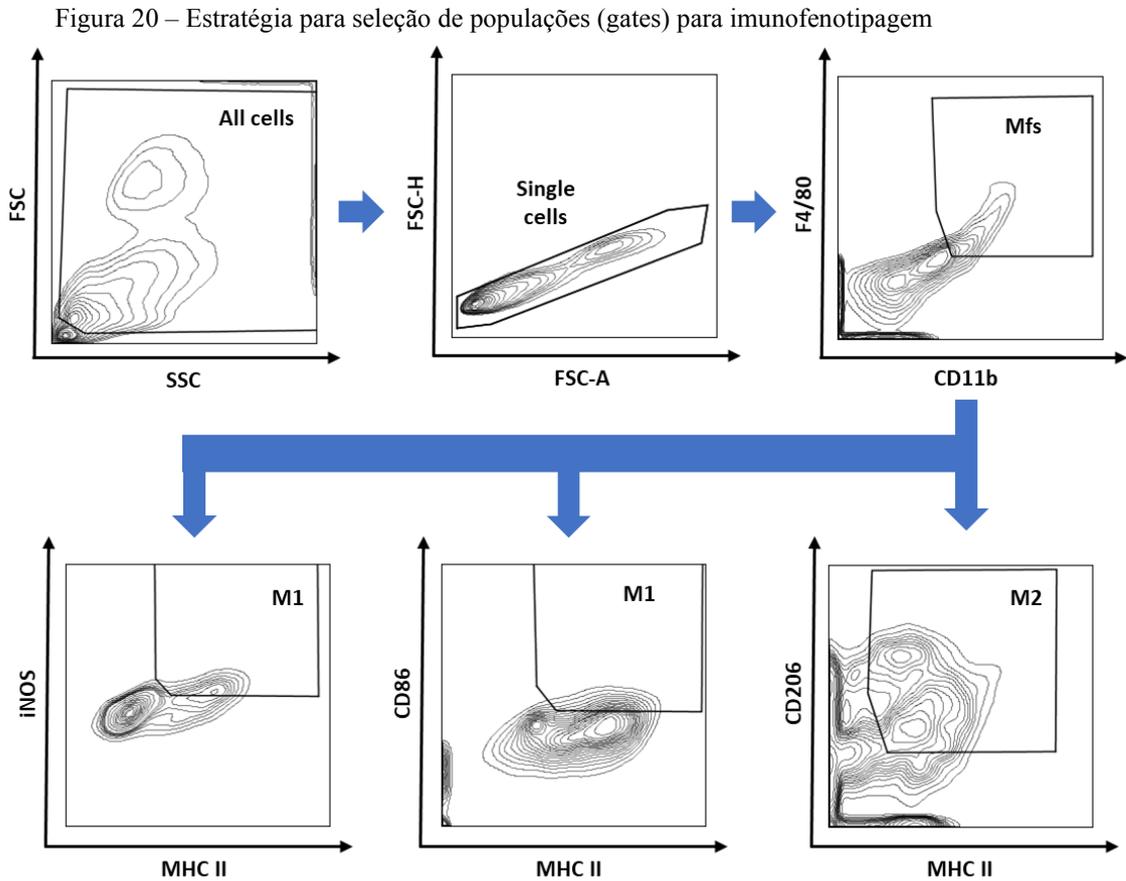
A suspensão de células isoladas do tumor foi submetida à marcação com anticorpos conjugados à fluorocromos para caracterização do perfil fenotípico de macrófagos por citometria de fluxo. As células foram incubadas por 20 min com anticorpos de superfície e intracelular à temperatura ambiente sob proteção da luz. A aquisição das células foi realizada utilizando o citômetro BD FACSVerse™ (BD Bioscience) e os dados foram analisados pelo software FlowJo (V10.0.7). Os resultados foram expressos como porcentagem (análise qualitativa), pelo número total de células (análise quantitativa) dos marcadores.

Os anticorpos anti-CD11b conjugado com Alexa 700 e anti-F4/80 conjugado com APC foram utilizados para selecionar a população de macrófagos. Para a expressão de marcadores específicos de macrófagos com fenótipos M1 e M2, foram utilizados anti-CD86 conjugados com FITC (11-0862-82), anti-MHC II conjugados com PE (12-5320-82) e anti-CD206 conjugado com PE-Cy-7 da Thermo Fisher (Waltham, MA, EUA). Ainda para a visualização de marcador M1 intracelular iNOS, foi utilizado o anticorpo anti-iNOS conjugado com Alexa Fluor 488 (53-5920-82).

10.6.3.4 Estratégia de seleção (gate) das subpopulações de macrófagos

Nos experimentos realizados *in vitro* e *in vivo* a população de macrófagos foi inicialmente selecionada conforme o parâmetro tamanho (FSC – dispersão frontal) e parâmetro complexidade interna (SSC – dispersão lateral). Foram selecionadas células com grande tamanho e baixa granulosidade (figura 20), excluindo-se os debris. Após a seleção, a presença de macrófagos (ensaios *in vitro*) foi confirmada por meio da marcação de F4/80 (marcador de macrófagos maduros). Ainda para avaliar o perfil fenotípico dessas células foi analisado a expressão do CD86 e MHC II (marcadores de macrófagos com perfil M1). Ao final da análise as células F4/80⁺/MHC II⁺/CD86⁺ foram consideradas macrófagos com perfil M1. Na suspensão de massas tumorais obtidas dos animais com melanoma, inicialmente foram selecionadas as células mielóides (CD11b⁺) e em seguida foi avaliada a marcação do CD86 e MHC II ou marcação de CD206 e MHC II nos macrófagos associados ao tumor

(TAMs) positivos para CD11b/F4/80⁺. Além disso, também foi avaliada a marcação da iNOS nos macrófagos associados ao tumor (TAMs) positivos para Cd11b/F4/80⁺.

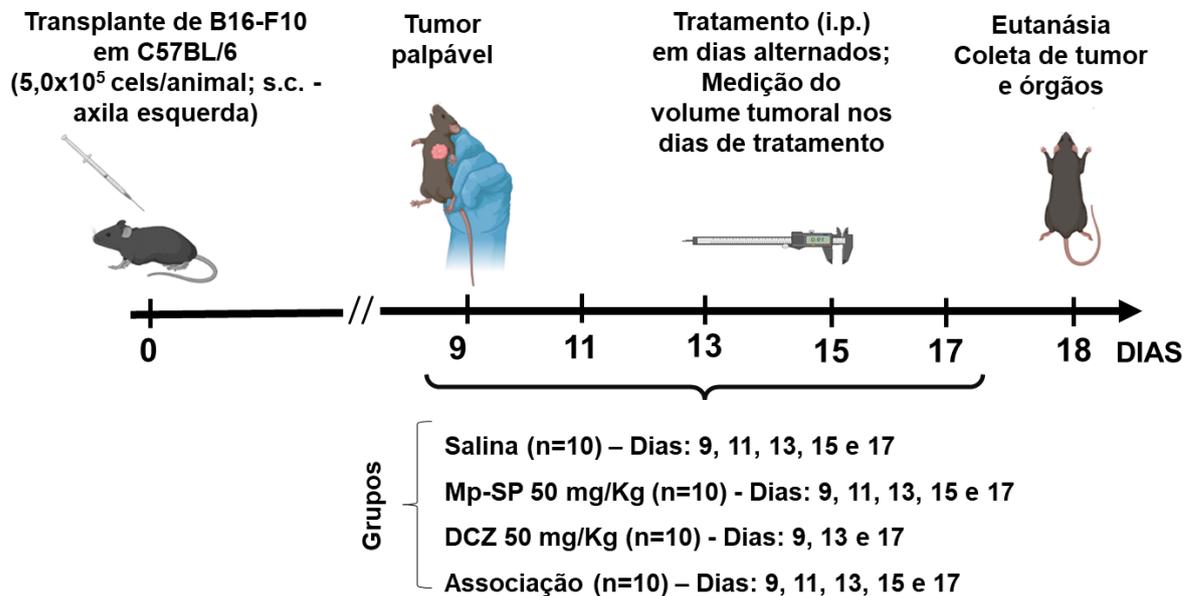


10.6.4 Avaliação da associação de Mp-SP com quimioterápico Dacarbazina

As células do melanoma B16-F10 foram coletadas de uma cultura tripsinizada e diluídas em meio DMEM para o transplante (Dia 0) por via subcutânea na axila esquerda dos animais C57BL/6. Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos de tratamento da seguinte forma: solução salina como controle negativo (n=9), Dacarbazina como controle positivo 50 mg/Kg (n=8), Mp-SP 50 mg/Kg (n=9) ou associação de Dacarbazina 50 mg/Kg + Mp-SP 50 mg/Kg (n=9). O tratamento intraperitoneal iniciou no dia em que os tumores de mais da metade dos animais estavam palpáveis (tumor aparente) (dia 9). Este protocolo seguiu

o esquema da seleção de doses de esperar que o tumor ficasse palpável. Os animais que receberam solução salina (controle negativo) ou Mp-SP (seja de forma isolada ou em associação) foram tratados em dias alternados durante 9 dias (tratamentos nos dias 9,11,12, 15 e 17), totalizando 5 administrações por via intraperitoneal (i.p.). Os animais que receberam Dacarbazina (seja de forma isolada ou em associação) foram tratados a cada 4 dias (nos dias 9, 13 e 17 após o transplante) (Figura21). No dia 18, os camundongos foram anestesiados e eutanasiados (cetamina 10% + xilasina 2%) para a excisão cirúrgica do tumor, rins, baço e fígado. Os órgãos e o tumor foram pesados. A inibição do crescimento tumoral (%) foi calculada da seguinte forma: inibição do tumor (%) = $[(A-B)/A] \times 100$, onde A era o peso médio do tumor do grupo controle negativo e B era o peso do tumor do grupo tratado. Os pesos corporais foram medidos em dias alternados até o último dia de tratamento e no dia da eutanásia. As medidas de volume tumoral foram feitas em dias alternados após o início do tratamento com um paquímetro para avaliação da curva de volume tumoral.

Figura 21 -Esquema do ensaio de associação de Mp-SP com Dacarbazina



Fonte: Elaborado pela autora com Biorender.com

10.6.4.1 Análise estatística

Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM). As diferenças entre os grupos experimentais foram comparadas por Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de pós-teste de Dunnet para avaliar o peso do tumor e dos órgãos ($P < 0,05$)

utilizando o programa GRAPHPAD PRISM 5 (Intuitive Software for Science, San Diego, CA, EUA).

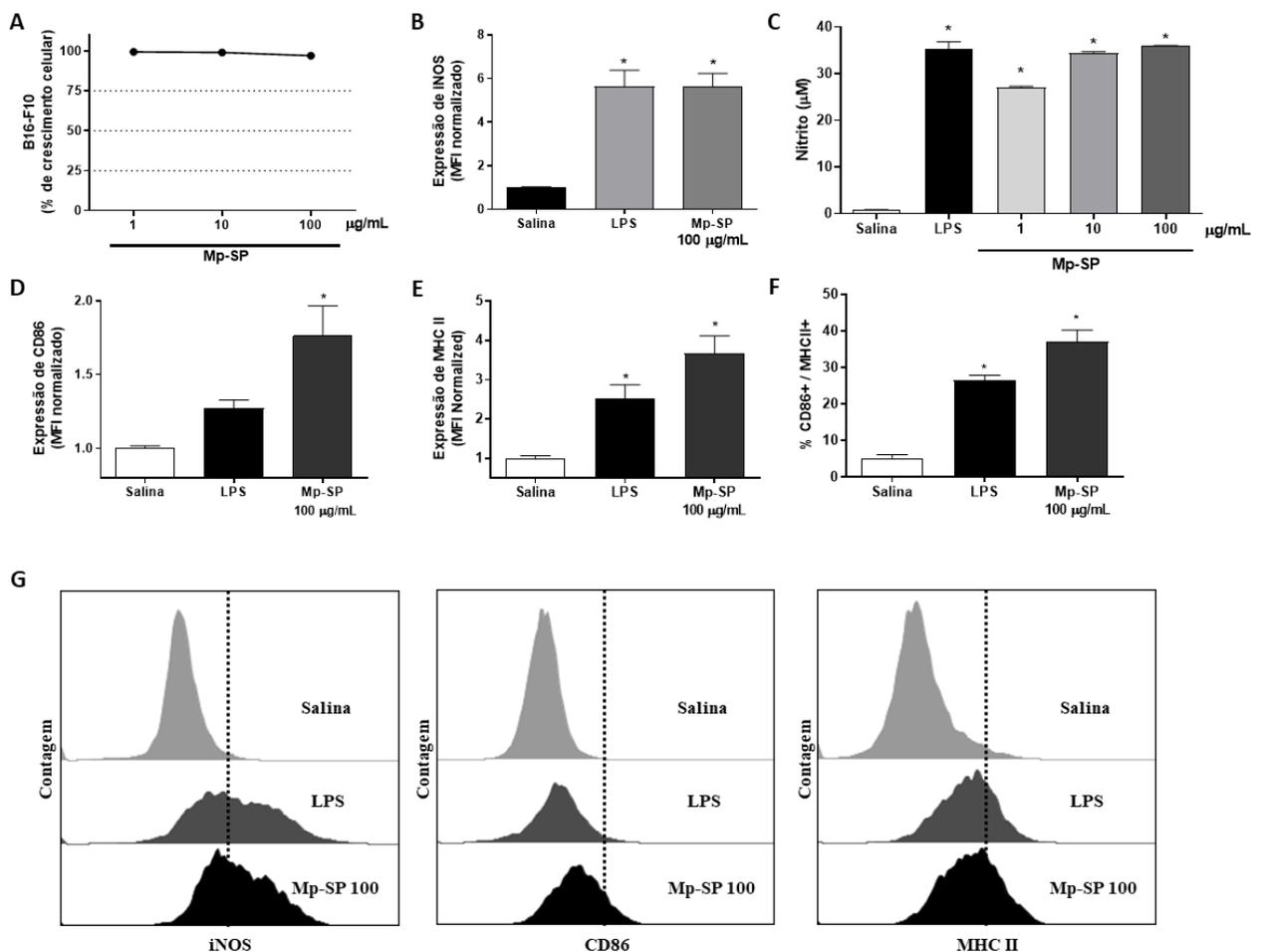
11 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação do efeito antiproliferativo mostrou que Mp-SP não apresentou citotoxicidade contra as células de melanoma murino B16-F10 (Figura 22A). No presente trabalho, as células RAW264.7 incubadas com Mp-SP (100 µg/mL) apresentaram um aumento de 5,6 vezes na expressão de iNOS em comparação ao grupo salina (Fig. 22B), o que está de acordo com os níveis de nitrito observados na Figura 22 C. Além disso, o Mp-SP a 100 µg/mL aumentou as expressões de MHC II e CD86 em 3,66 e 1,76 vezes, respectivamente, em comparação com o grupo salina (Fig. 22 D-F).

Notadamente, polissacarídeos sulfatados de origem marinha apresentam baixa ou nenhuma citotoxicidade direta contra células e tecidos, o que permite que eles sejam utilizados também na indústria alimentícia com segurança (Fedorov et al, 2013). A óxido nítrico sintase induzível (iNOS) é uma isoforma da enzima que sintetiza o NO usando a L-arginina como precursor (Hevel et al, 1991). O ensaio de Griess detecta os níveis de nitrito como evidência indireta da produção de NO. Mfs e outras células do sistema imune expressam moléculas de MHC II para apresentar antígenos para as células T efectoras CD4⁺ (Rock et al, 2016), um processo que envolve moléculas de superfície coestimulatórias CD86 (Porta et al, 2015). O NO é um componente crucial da resposta imunológica do hospedeiro contra diversos patógenos, como parasitas, bactérias e vírus (Xue et al, 2018). A produção de NO é considerada um marcador do fenótipo clássico M1 (Zhu et al, 2015). Polissacarídeos sulfatados da alga marinha parda *Cystoseria indica* induziram a liberação de NO pela RAW 264.7 ativando as vias de sinalização do receptor Toll-like 4 tipo (TLR4)/NF-κB e MAPKs (Bahramzadeh et al, 2019). Outro polissacarídeo sulfatado da alga marinha *Nizamuddinina zanardinii*, de forma semelhante, ativou a RAW 264.7 aumentando a secreção de NO e citocinas pró-inflamatórias (Tabarsa et al, 2020). A consistência desse mecanismo parece ser compartilhada por outros polissacarídeos, incluindo aqueles obtidos das flores de *Panax ginseng* ou dos corpos de frutificação de *Cantharellus cibarius*, que ativam a RAW264.7 para aumentar a fagocitose e a liberação de NO, TNF-α, IL-6, IFN-γ e IL-1β (Cui et al, 2020; Yang et al, 2019). Um conjunto recente de evidências tem sugerido que a eficácia terapêutica de

diversos fármacos antineoplásicas tradicionalmente empregadas na oncologia clínica está ligada à habilidade de seus componentes ativos em modular a resposta imunológica no ambiente tumoral (Ghiringhelli et al., 2004; Goel et al., 2017; Ladoire et al., 2011; Zitvogel et al., 2013).

Figura 22 – Avaliação do efeito antiproliferativo de Mp-SP e ativação de macrófagos RAW 264.7 para o perfil M1



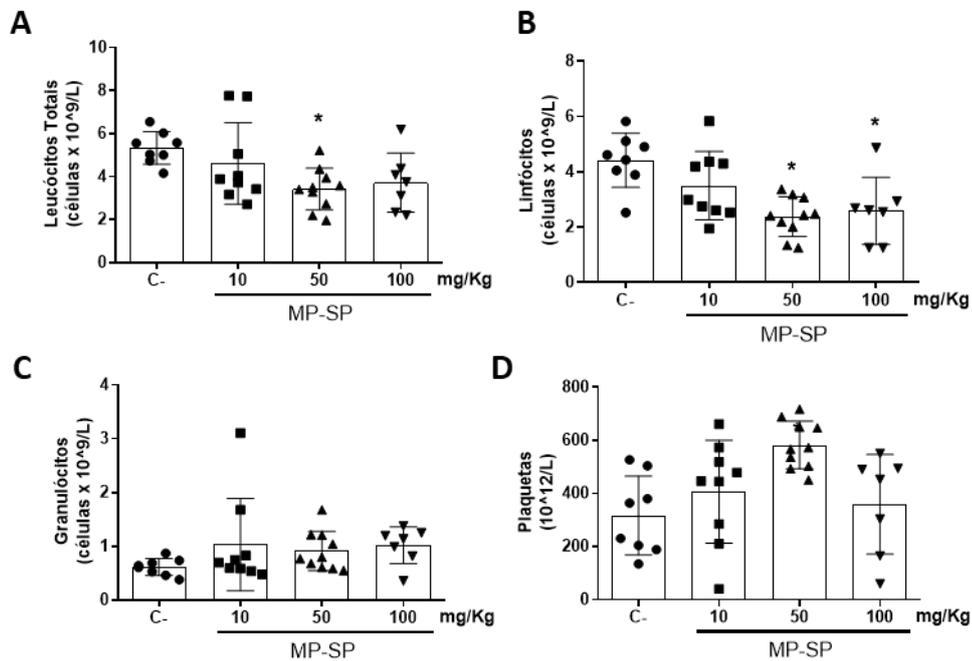
Polissacarídeos sulfatados de *Macrocystis piryfera* não apresentou citotoxicidade contra células de melanoma murino B16-F10, mas foi capaz de ativar macrófagos para o perfil M1. **A.** O efeito antiproliferativo foi avaliado através do ensaio de SRB, não demonstrando citotoxicidade nas concentrações testadas. **B-C.** Os marcadores do perfil M1, iNOS e nitrito apresentaram um aumento nos tratamentos com Mp-SP em todas as concentrações testadas. **D-F.** Observou-se um aumento dos marcadores de superfície específicos de macrófagos do perfil M1, tanto de forma isolada como duplo-marcados. **F.** Histogramas das marcações de iNOS, CD86 e MHC II de forma isolada. Foram realizados 3 experimentos independentes em triplicata para cada ensaio. Os valores foram expressos em intensidade de fluorescência mediana (MFI) e analisados por Análise de Variância seguido de pós-teste de Dunnet. * $p < 0,05$ quando comparados ao grupo salina.

Importante ressaltar que todas essas moléculas são marcadores importantes da ativação de macrófagos M1 (Xue et al, 2018). De forma semelhante, os níveis de NO aumentaram juntamente com a regulação positiva de iNOS e a expressão de superfície MHC-II e CD-86

em Mfs murinos expostos a polissacarídeos de *Tinospora cordifolia* (Gupta et al, 2017). Polissacarídeos sulfatados de *Gracilaria lemaneiformis* induziram a regulação positiva de mRNA de iNOS, IL-6 e TNF- α e a secreção de ROS, NO, IL-6 e TNF- α também em células RAW264.7 (Ren et al, 2017). O paclitaxel, um fármaco quimioterápico altamente citotóxico utilizado no tratamento de diversos cânceres, também reduz o crescimento tumoral reprogramando Mfs para um fenótipo M1, um processo mediado por TLR-4 (Wanderley et al, 2018). Interessantemente, as fucoidanas não citotóxicas de *C. okamuranus* polarizaram Mfs para o fenótipo antitumoral *in vitro* e exerceram efeito antitumoral *in vivo* (Takeda et al, 2012). No geral, nossos resultados sugerem que a fucoidana de Mp-SP é um agente imunomodulador promissor. Para avaliar se Mp-SP pode exibir inibição tumoral através da modulação do microambiente tumoral polarizando Mfs, utilizamos um modelo murino de melanoma *in vivo* para seleção de doses de Mp-SP que seriam usadas nos estudos posteriores.

O tratamento intraperitoneal com Mp-SP inibiu o crescimento do melanoma em animais a 50 e 100 mg/Kg (Figura 23). O volume tumoral no grupo tratado com Mp-SP a 50 mg/Kg apresentou uma redução de 35% ($p < 0,05$) e no grupo tratado com Mp-SP a 100 mg/Kg de 31% ($p < 0,05$) quando comparados ao grupo salina. Esse resultado merece atenção, uma vez que o Mp-SP não foi citotóxico *in vitro* contra células B16-F10, que induzem um modelo de tumor altamente agressivo quando injetadas em camundongos. Nos últimos anos, vários estudos relatam o efeito antitumoral de PS de algas marinhas (Assef et al, 2021; Fan et al, 2012; Azuma et al, 2012; Alekseyenko et al, 2007). Notavelmente, os PS da alga vermelha *Champia feldmannii* não exibem citotoxicidade significativa *in vitro*, no entanto, eles exibem efeito antitumoral *in vivo*. Além disso, os PS desta alga também atuaram como um agente imunomodulador, como evidenciado pelo aumento na produção de anticorpos específicos para OVA (Lins et al, 2009). Observamos também uma redução no número total de leucócitos circulantes nos animais tratados com Mp-SP 50 mg/Kg (Figura 24A). Em relação à população de linfócitos circulantes, também foi observada uma redução em ambas as doses testadas de Mp-SP (Figura 24B). A população de granulócitos não apresentou diferença significativa. Fármacos quimioterápicos citotóxicos podem causar uma variedade de efeitos colaterais, incluindo leucopenia (Aboud et al, 2022). Porém, a estimulação de macrófagos para um fenótipo antitumoral pode indicar que essa diminuição de linfócitos possa estar relacionada a uma migração dessas células imunes para o MAT ou mesmo uma ativação da população de linfócitos que migraram para o tumor. Além disso, a inoculação tumoral por si só já é capaz de causar uma reação de leucopenia em animais experimentais, caracterizada por granulocitose e esplenomegalia (Kodama et al., 1974; Okawa et al., 1992; Sato et al., 2005).

Figura 23 – Efeito antitumoral de Mp-SP contra linhagem de melanoma murino B16-F10

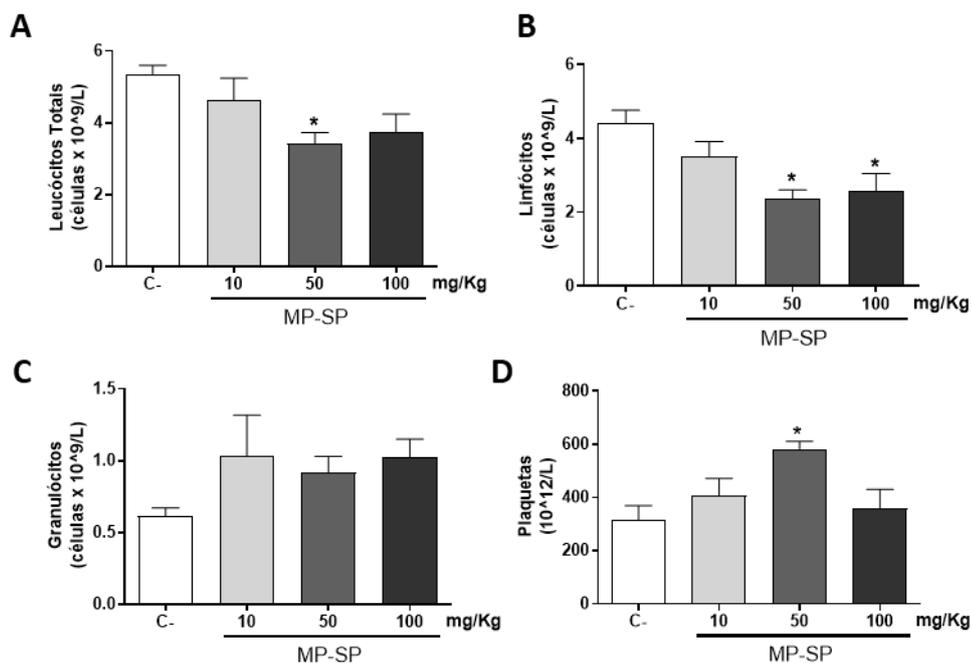


Ensaio antitumoral para seleção da dose de Mp-SP nas doses de 10, 50 e 100 mg/Kg contra a linhagem de melanoma murino B16-F10 em animais C57BL/6. Foram realizadas medidas do volume tumoral nos dias em que se procederam os tratamentos (dias alternados), respectivamente dia 1 (A), dia 3 (B), dia 5 (C) e dia 7 (D) após o tumor estar palpável. Os volumes foram calculados e analisados por Análise de Variância (ANOVA) seguida de pós-teste de Newman-Kells. a: quando comparado com Salina; b: quando comparado com Mp-SP 10; c: quando comparado com Mp-SP 50; d: quando comparado com Mp-SP 100.

Observamos também um aumento na contagem de plaquetas no grupo tratado com 50 mg/Kg quando comparado com o grupo salina. As plaquetas representam um elo essencial entre o dano/disfunção tecidual e a resposta inflamatória, atuando na reparação da lesão. No entanto, se a ativação das plaquetas não for controlada, isso pode levar a uma inflamação crônica associada a várias condições patológicas, incluindo o câncer (Gay et al, 2011; Contursi et al, 2017). A quimioterapia anticâncer frequentemente pode levar a uma trombocitopenia, o que pode acarretar hemorragias e fatalidades (Ciurea & Hofmann, 2007). Portanto, esse efeito da Mp-SP é desejável e pode desempenhar um papel protetor em pacientes submetidos a esse tipo de quimioterapia tóxica. Trabalhos mostraram que polissacarídeos das raízes de *Angelica sinensis* promovem a hematopoiese e trombopoiese em camundongos por meio da via PI3K/AKT (Liu et al., 2010). Trabalhos anteriores do grupo também demonstraram um aumento de plaquetas nos animais tratados com polissacarídeo da alga parda *Dictyota caribaea* contra sarcoma 180 (Assef et al, 2021). Apesar do aumento de plaquetas estar relacionado algumas vezes com o pior prognóstico tumoral, elas vêm sendo

bastante estudadas como uma forma de entrega de fármacos na circulação de maneira mais eficiente e diminuindo efeitos colaterais de quimioterápicos (Dovizio et al, 2020). Sarkar e colaboradores (2013) demonstraram que plaquetas carregadas com doxorubicina (DOX), um medicamento anticâncer que inibe a topoisomerase II, foram capazes de inibir o crescimento das células tumorais e reduzir significativamente o volume de fluido ascítico em camundongos portadores de tumor de carcinoma ascítico de Ehrlich (EAC) De maneira interessante, devido à especificidade das plaquetas em direcionar-se às células cancerosas, o efeito terapêutico foi alcançado com uma dose do medicamento inferior à geralmente prescrita, reduzindo assim a sua toxicidade. Com os resultados encontrados de redução do volume tumoral, nós selecionamos a dose de 50 mg/Kg para o estudo posterior de associação da Mp-SP com Dacarbazina.

Figura 24 - Parâmetros hematológicos do sangue periférico de camundongos transplantados com B16-F10



A. Leucócitos totais apresentaram uma diminuição no grupo Mp-SP 50 mg/Kg. **B.** As maiores doses apresentaram uma diminuição da porcentagem de linfócitos. **C.** camundongos tratados com Mp-SP não apresentaram diferença em granulócitos e **D.** camundongos tratados com Mp-SP a 50 mg/Kg aumentaram a contagem de plaquetas. Os animais foram tratados intraperitonealmente com salina como controle negativo, Mp-SP a 10 mg/Kg, 50 mg/Kg ou 100 mg/Kg durante 9 dias, a partir do primeiro dia após o tumor estar palpável. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. A análise utilizou ANOVA seguido do pós-teste de Dunnett. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo salina.

Após o ensaio de seleção de doses da atividade antitumoral, nós realizamos o ensaio de imunofenotipagem para caracterização dos macrófagos encontrados no MAT. Para

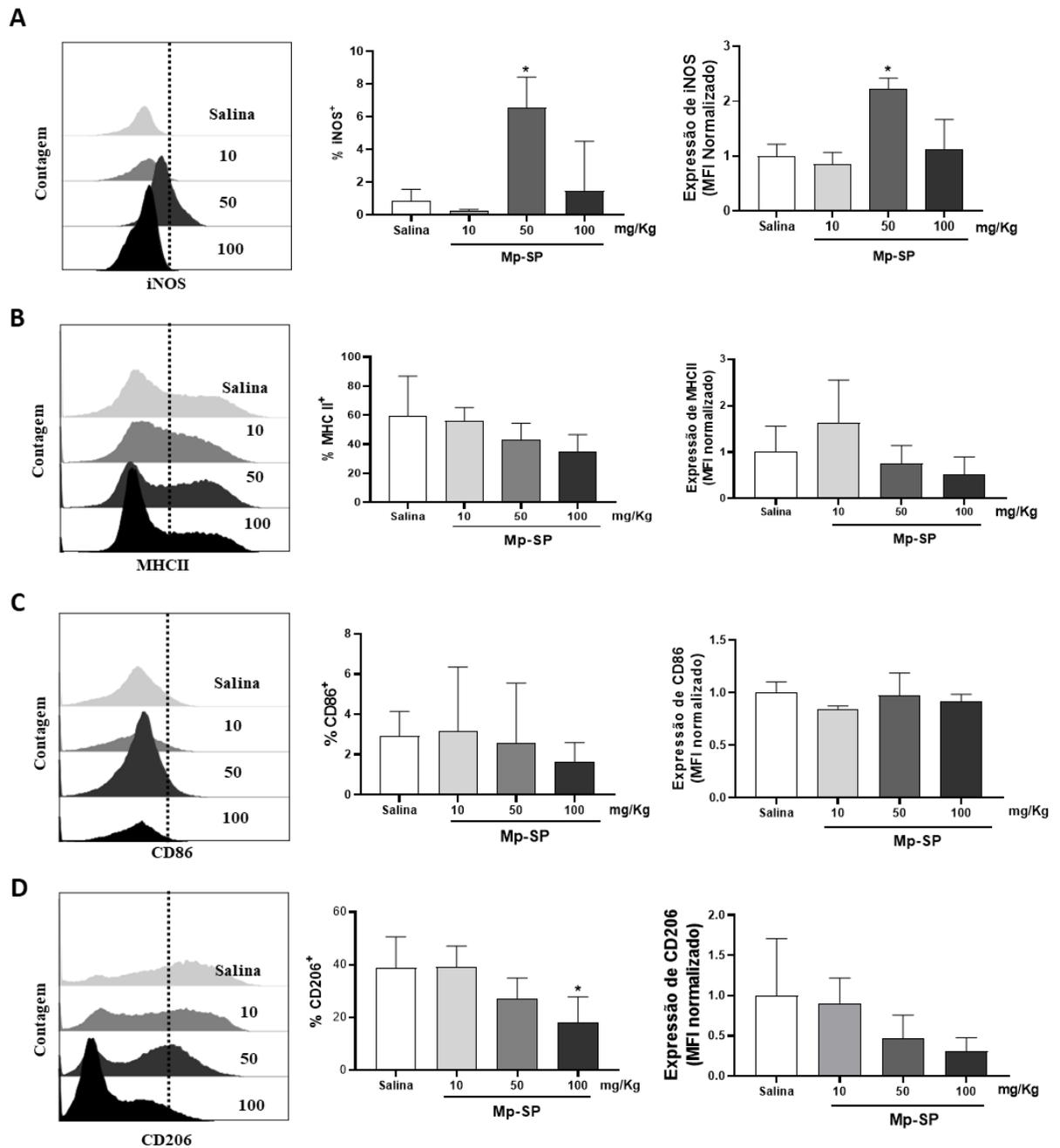
este ensaio, não foi avaliado o efeito antitumoral, apenas os tumores foram utilizados para determinação fenotípica a fim de se entender como o efeito antitumoral pode estar relacionado com o potencial imunomodulador de Mp-SP. No presente trabalho, foi observado uma redução em 2,12 vezes na percentagem de Mfs (CD11b⁺F4/80⁺) que expressaram CD206 (marcador M2), como observado na figura 25 D. Os Macrófagos que se encontram infiltrados no tumor são principalmente oriundos de monócitos circulantes com marcação positiva para CD45/CD11b/Ly6C e que diferenciam-se a macrófagos no MAT e passam a expressar F4/80 e MHC II (Bronte; Murray, 2015).

No microambiente tumoral, os TAMs adotam fenótipo imunossupressor semelhante a M2 e contribuem para a progressão tumoral (Biswas; Mantovani, 2010; Wang; Liang; Zen, 2014). Nesse contexto, uma redução nos macrófagos polarizados para esse perfil M2 é de grande interesse a fim de reduzir a progressão deste tumor. Os TAMs são células derivadas de mielóides com certas características fenotípicas, como CD11b⁺, CD68⁺ e F4/80⁺, e apresentam notável plasticidade sob diferentes estímulos microambientais. Os macrófagos pró-inflamatórios M1 são caracterizados como IL10^{low}, IL12^{high}, CD86⁺ MHCII⁺, são classicamente ativados por LPS ou IFN γ (Jetten et al, 2014), enquanto os macrófagos anti-inflamatórios M2 podem ser subdivididos em quatro subtipos heterogêneos distintos entre si por uma série de marcadores e citocinas: M2a, M2b, M2c e M2d (Zhang et al, 2010). Macrófagos M2b (IL10^{high}, IL12^{low}, CD86⁺ MHCII⁺), cujas características estão entre macrófagos classicamente ativados M1 com função antitumoral pró-inflamatória e macrófagos alternadamente ativados M2 e promovem crescimento e invasão tumoral, são induzidos por complexos imunológicos combinados, bem como agonistas TLR ou IL-1R e produzem IL1, IL6, IL10 e TNF α (Rhee et al, 2016; Liu et al, 2015). Tem sido relatado que o macrófago M2b promove o tumor liberando a citocina imunossupressora IL10 e a citocina pró-inflamatória leva à inflamação correlacionada ao desenvolvimento tumoral (Rószter et al, 2015; Asai et al, 2017). Os mecanismos de M2b em várias funções permanecem em grande parte especulativos.

Além disso, o grupo tratado com Mp-SP 50 mg/Kg apresentou um aumento de 12 vezes na expressão de iNOS (Figura 25A) quando comparado ao grupo salina, o que corrobora com os achados *in vitro* de ativação de macrófagos para um perfil M1, com a produção de NO e expressão de marcadores *in vitro*. Contudo não conseguimos observar uma diferença significativa na expressão de CD86 e MHC II isolados ou nas duplas marcações do perfil M1 (MHC II⁺/CD86⁺) e M2 (MHC II⁺/CD206⁺) (Figura 26), podendo isto estar relacionada a grande heterogeneidade da resposta de cada indivíduo e ao perfil do MAT

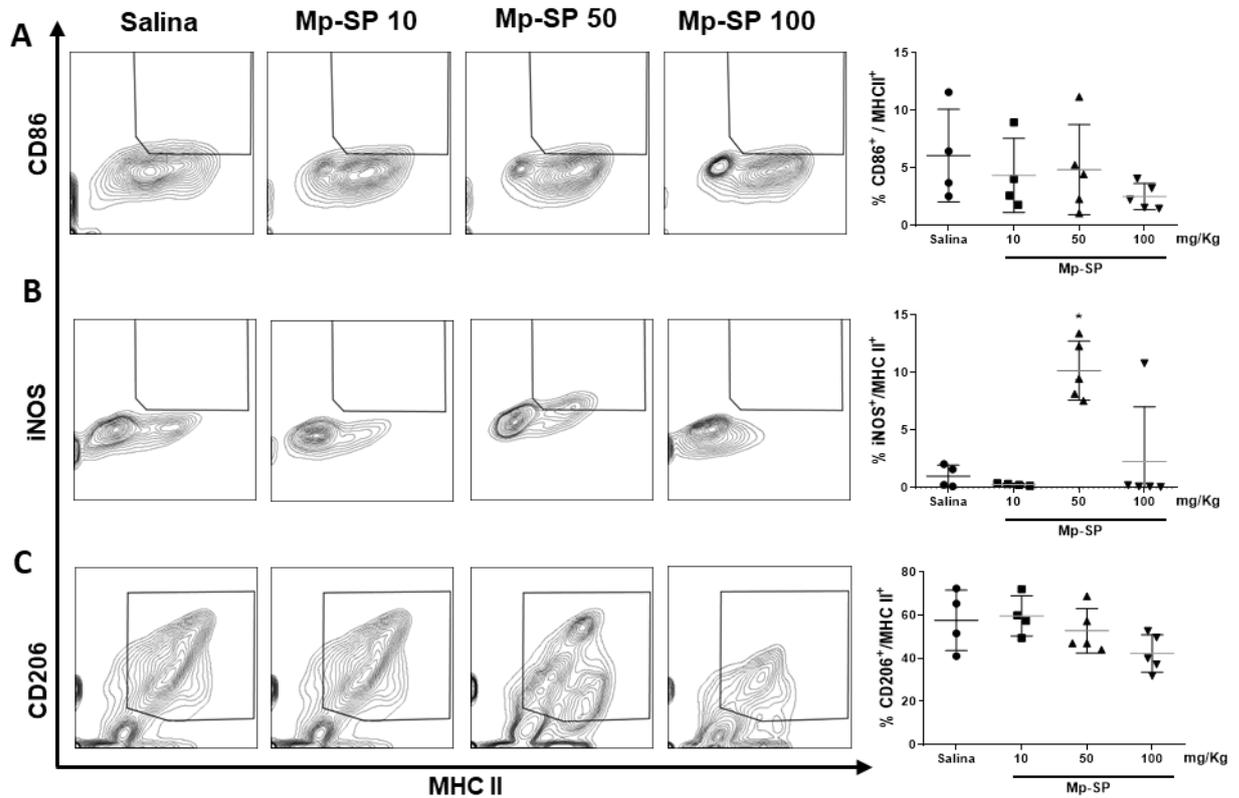
individual. A redução do marcador M2 e aumento de marcadores M1 utilizados neste trabalho foram associados à inibição do crescimento tumoral observado no ensaio da seleção de doses. Trabalho publicado por Deng e colaboradores demonstraram que uma fucoidana obtida da alga *Laminaria japonica* induziu a diferenciação de macrófagos para o fenótipo M1, e essa transformação promoveu a apoptose de células cancerígenas tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Do ponto de vista do mecanismo de ação, a fucoidana induziu a polarização de Mfs para o fenótipo M1 pela ativação da via PI3K/AKT/mTOR mediado pelo receptor TLR4. Os resultados mostraram aumento no percentual de Mfs CD86⁺ e redução de Mfs CD206⁺ *in vitro* utilizando RAW 264.7. (Deng et al., 2022).

Figura 25 – Expressão de marcadores de superfície e intracelular de macrófagos M1 e M2



Os animais tratados com Mp-SP apresentaram uma redução do marcador de superfície CD206 específico para o perfil M2 e aumento da expressão de iNOS (marcador M1) **A-D**. Expressão de marcadores de macrófagos M1 e M2 de forma isolada. Os ensaios foram realizados com uma amostragem de de 4 a 5 animais e os resultados foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) seguida de pós teste de Dunnet. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo salina.

Figura 26 – Populações de macrófagos expressando marcadores M1 e M2



A-C. Porcentagem de macrófagos (CD11b⁺/F480⁺) com população duplo-marcada para perfil M1 (MHC II/CD86) e perfil M2 (MHC II/CD206). Os ensaios foram realizados com uma amostragem de 4 a 5 animais e os resultados foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) seguida de pós teste de Dunnet. *p<0,05 quando comparado ao grupo salina

Em conjunto, a diminuição de células marcadas com CD206 e aumento de células que expressam iNOS, juntamente com a caracterização *in vitro* e efeito antitumoral *in vivo* de Mp-SP já são fortes indícios do seu perfil de inibidor do crescimento tumoral através da imunomodulação de macrófagos no MAT. Vários estudos demonstraram que os TAMs podem influenciar na resposta à quimioterapia antineoplásica (De Palma; Lewis, 2013; Mantovani et al., 1979; Noy; Pollard, 2014). Mantovani e colaboradores demonstraram que a depleção de macrófagos reduz a eficácia do tratamento com doxorubicina em animais com leucemia ou linfoma (Mantovani et al., 1979). Mais recentemente, foi demonstrado que a ativação de macrófagos pelo tratamento com inibidores da histona deacetilase de classe IIa melhora a eficácia da quimioterapia e da imunoterapia com os inibidores de *checkpoint* em camundongos com câncer de mama (Guerriero et al., 2017).

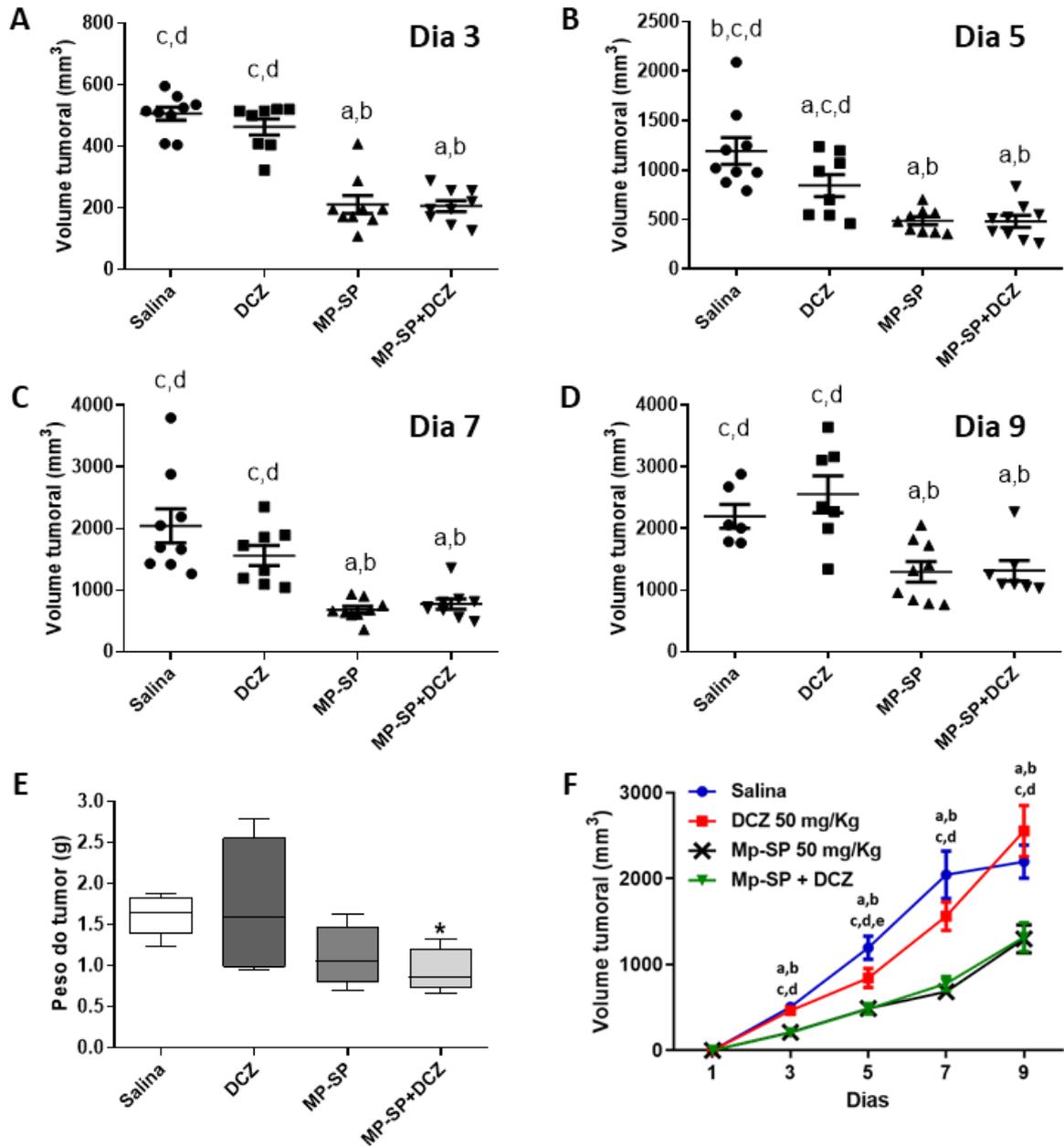
Também observamos um aumento de MHC II nas populações analisadas e quando observada em conjunto com iNOS (MHC II⁺/iNOS⁺), indicando uma supra-regulação de macrófagos polarizados para o perfil M1. Chen e colaboradores (2009b) demonstraram que

polissacarídeos de *Lycium barbarum* podem ativar os macrófagos através da ativação de fatores de transcrição NF- κ B e AP-1, induzir a produção de TNF- α e aumentar a expressão das moléculas de MHC II. De maneira semelhante, Feng e colaboradores (2020) também observaram que o mesmo polissacarídeo aumentou significativamente a liberação de NO, TNF- α e IL-6 pelos macrófagos RAW264.7 e promoveu significativamente a produção de ROS. Além do complexo de antígeno de MHC, as células tumorais necessitam de moléculas coestimuladoras que podem fornecer um segundo sinal para a indução de células T ativadas. Gajewski (2007) descobriu que vários tumores malignos têm níveis baixos de expressão das moléculas B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86), o que enfraquece os sinais coestimuladores das células T ativadas e resulta em tolerância imunológica. No entanto, altos níveis de expressão das moléculas B7-H1 (PD-L1 ou CD274), B7-H3, B7-H4, B7-H6 e outras moléculas coestimuladoras negativas também inibem a proliferação das células T e promovem a secreção de citocinas específicas, resultando assim na fuga imunológica do tumor (Botti et al, 2016). Os macrófagos do tipo M1 expressam moléculas co-estimulatórias CD68, CD86, CD80 e altas quantidades do complexo de MHC classe II. Os receptores scavenger (CD163), receptor de manose (CD206) e baixas quantidades do complexo de MHC classe II são usados como marcadores do fenótipo M2 (Hao et al, 2012). Isso demonstra o potencial da Mp-SP em polarizar esses macrófagos do MAT para um perfil M1 e diminuir aqueles TAMs com perfil M2, sendo esta polarização provavelmente a responsável pelo efeito antitumoral evidenciado no ensaio anterior.

Após a caracterização, investigamos a associação de Mp-SP na dose de 50 mg/Kg com o quimioterápico Dacarbazina (DCZ) 50 mg/Kg. A dose de Mp-SP foi selecionada a partir dos resultados encontrados de inibição do crescimento (35% redução do volume tumoral), além de ter sido a dose a aumentar a expressão de iNOS (em 12 vezes comparado ao grupo salina). Outros trabalhos têm mostrado efeito antitumoral através da imunomodulação com fucoidanas num intervalo de 100-300 mg/Kg (Li et al, 2023), o que demonstra que Mp-SP apresenta uma maior potência em relação ao seu efeito antitumoral já que a dose de 50 mg/Kg foi capaz de causar essa inibição *in vivo*. Observamos que a associação de Mp-SP 50 mg/Kg com DCZ 50 mg/Kg foi capaz de inibir o crescimento tumoral em 41% quando comparado ao grupo salina (Figura 27). Além disso, quando comparado o grupo da associação com dacarbazina isolada, observamos uma redução de 84% no peso do tumor dos animais. Apesar da dacarbazina ser o fármaco de escolha na clínica para pacientes com melanoma, nosso estudo não demonstrou uma inibição do crescimento tumoral dos animais tratados com DCZ isolada.

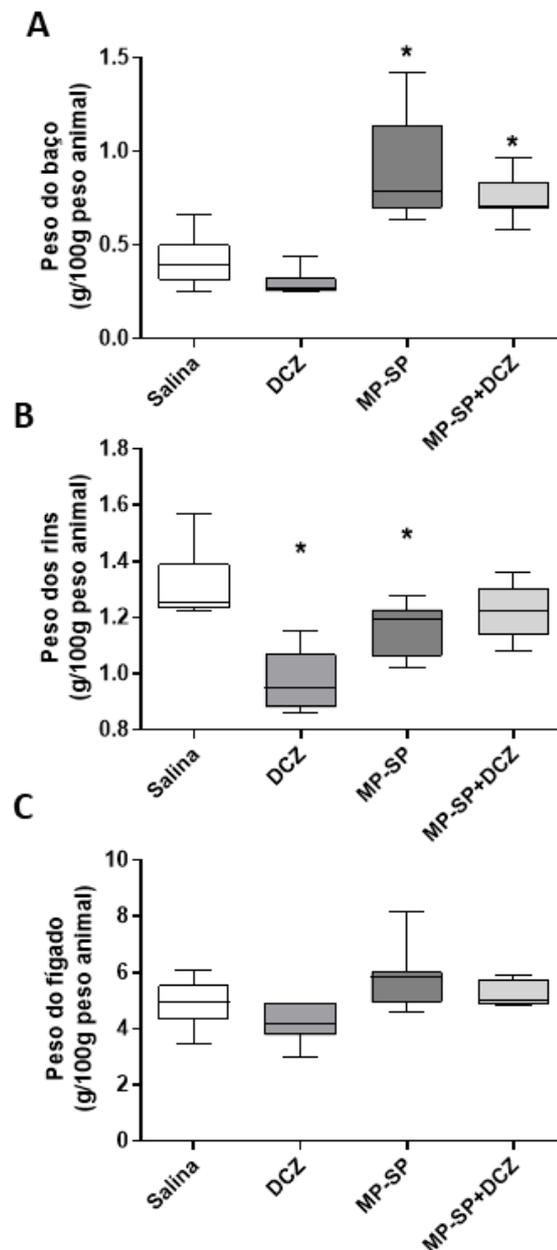
A combinação de quimioterapia eficaz com regimes adjuvantes imunoestimulantes tem se tornado uma nova esperança no tratamento do câncer (Zhang et al, 2009). Estudos têm mostrado que várias combinações de quimioterápicos já utilizados na clínica e imunomoduladores podem prolongar efetivamente a sobrevida de pacientes com câncer, reduzir os efeitos colaterais dos medicamentos quimioterápicos e aumentar a absorção e a sensibilidade à quimioterapia (Zhang et al, 2009; Baars et al, 2002). Como imunomoduladoras, as fucoïdanas têm um efeito único quando usado em combinação com medicamentos quimioterápicos. A cisplatina polariza monócitos e macrófagos M0 para fenótipos M2, e o oligo-fucoïdano reduz esses efeitos colaterais. Além disso, o oligo-fucoïdano potencializa a citotoxicidade da cisplatina (Chen et al, 2020). Pawar e colaboradores relataram nanopartículas carregadas com fucoïdana e doxorubicina (DOX), que aumentaram a citotoxicidade da DOX e melhoraram o microambiente tumoral imunossupressor, induzindo macrófagos associados ao tumor a adotarem um fenótipo M1 (Pawar et al, 2019). De maneira semelhante, Lins e colaboradores (2009) demonstraram o aumento da eficácia antitumoral de 5-FU quando utilizados em associação contra a linhagem de sarcoma 180, além de prevenir contra a imunodeficiência causada por esse quimioterápico.

Figura 27 – Parâmetros do ensaio antitumoral da associação de Mp-SP com o quimioterápico Dacarbazina



Os animais tratados com associação de Mp-SP e Dacarbazina nas doses de 50 mg/Kg apresentaram uma inibição do crescimento tumoral. O tratamento foi realizado após o tumor ficar palpável e foram feitas administrações em dias alternados para os grupos salina e Mp-SP 50mg/Kg, totalizando 5 administrações e tratamento com Dacarbazina isolada ou associada a cada 4 dias, totalizando 3 administrações. **A-D.** Volumes tumorais observados nos dias de tratamento. a: quando comparado com Salina; b: quando comparado com DCZ; c: quando comparado com Mp-SP; d: quando comparado com Associação. **E.** Peso dos tumores coletados no dia da eutanásia. **F.** Volume tumoral de todos os dias juntos. a: Salina quando comparado com Mp-SP; b: Salina quando comparado com Associação; c: DCZ quando comparado com MP-SP; d: DCZ quando comparado com associação; e: Salina quando comparado com DCZ. Os valores foram analisados por Análise de Variância (ANOVA), seguida de pós teste de Dunnet ou Newman Kells. * $p < 0,05$.

O peso dos órgãos também foi avaliado. Mp-SP administrado intraperitonealmente a 50 e 100 mg/Kg induziu um aumento de 57 e 92%, respectivamente no peso do baço de camundongos em comparação com o grupo salina (Figura 28 A). O aumento no peso do baço, pode ser considerada uma característica da ativação da resposta imune do hospedeiro. PS de *Dictyota caribaea* induziu um aumento no peso do baço com hiperplasia da polpa branca em um modelo *in vivo* de sarcoma-180 (Assef et al, 2021). Agarana sulfatada de *Gracilaria lemaneiformis* inibiu o crescimento de tumores em um modelo murino de hepatoma. Além disso, esse PS promoveu um efeito imunomodulador, verificado pelo aumento do peso do baço e do timo, bem como pelo aumento da atividade fagocítica de macrófagos (Fan et al, 2012). Resultados comparáveis foram observados em camundongos portadores de tumor tratados com polissacarídeos de *Sargassum vulgare* (Sousa et al, 2007). Não foi observada diferença significativa no peso do fígado (Figura 28 C), porém o peso dos rins apresentou uma diminuição nos grupos tratados isoladamente, mas não na associação (Figura 28 B) que precisa ser avaliada de forma histopatológica para verificar se há algum dano reversível nesse órgão causado pelos tratamentos. Ensaio bioquímico também devem ser realizados para entender o motivo da associação não ter reduzido o peso dos rins.

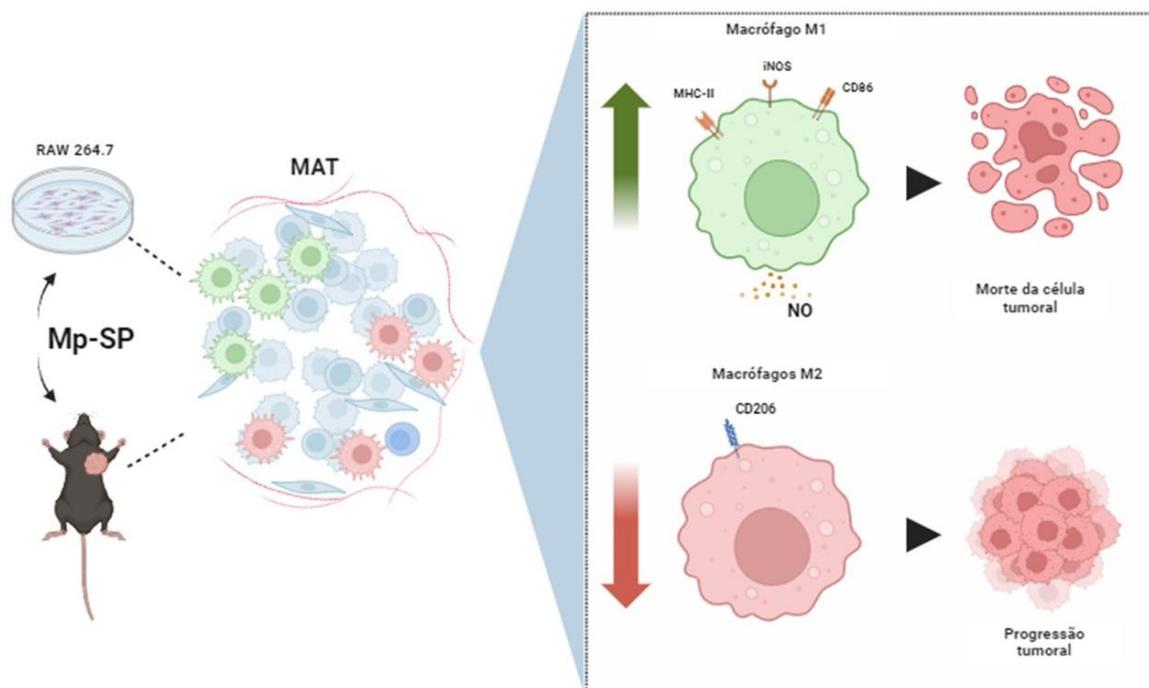


Os animais foram tratados com salina, Mp-SP 50 mg/Kg isolado ou em associação com Dacarbazina 50 mg/ Kg e Dacarbazina 50 mg/Kg isolada, totalizando 5 dias de tratamento. Os órgãos fígado, rins e baço foram coletados no dia da eutanásia para pesagem. Os animais tratados com Mp-SP isolado ou em associação com Dacarbazina apresentaram um aumento do peso do baço (A) e uma diminuição do peso dos rins (B). Não foram observadas mudanças no peso do fígado dos animais (C). Os valores dos pesos foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) seguido do pós-este de Dunnet. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo salina.

Em conjunto, os dados deste trabalho indicam que Mp-SP é capaz de modular o MAT por meio da redução de macrófagos com características semelhantes ao fenótipo M2 e do aumento de macrófagos com características semelhantes ao fenótipo antitumoral. Além disso, a associação com quimioterápico DCZ promoveu um efeito antitumoral provavelmente em

razão da modulação do MAT através da polarização de macrófagos, o que mostra um perfil imunoestimulante importante e promissor de Mp-SP (Figura 29). Além disso, ainda não há trabalhos utilizando fucoidanas de *Macrocystis pyrifera* demonstrando seu efeito antitumoral *in vivo* por meio da modulação do sistema imune. Estudos de mecanismo de ação e vias envolvidas no efeito antitumoral através da polarização dos macrófagos devem ser conduzidos para melhor entendimento da ação deste polissacarídeo.

Figura 29 – Desenho esquemático da inibição tumoral causada pelo polissacarídeo sulfatado da *Macrocystis pyrifera* por meio da modulação de macrófagos no microambiente tumoral.



Fonte: Criado pela autora com BioRender.com

Legenda: Mp-SP: polissacarídeo sulfatado da alga *M. pyrifera*; MAT: microambiente tumoral; NO: óxido nítrico

12 CONCLUSÕES

- Mp-SP apresentou um potencial imunoestimulante através da diferenciação de macrófagos para um fenótipo antitumoral e foi capaz de aumentar a sensibilidade de células B16-F10 à Dacarbazina associada a Mp-SP
- Mp-SP não apresentou citotoxicidade contra células de melanom murino B16-F10, mas modulou macrófagos murinos RAW264.7 para um fenótipo semelhante ao M1 *in vitro*
- Mp-SP também reduziu o crescimento tumoral de B16-F10 através da modulação de macrófagos *in vivo*
- Mp-SP em associação com dacarbazina promoveu a inibição tumoral quando comparado aos grupos isolados do PS e do quimioterápico, causando um aumento do tamanho do baço o que sugere seu potencial imunoestimulante no MAT

13 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Juntos, os resultados do presente trabalho mostram o potencial imunomodulador das fucoidanas e sua capacidade de inibir o crescimento tumoral através da modulação de macrófagos no MAT. Apesar de os resultados sugerirem uma polarização dos macrófagos para o fenótipo antitumoral M1, ensaios mais direcionados de marcação devem ser realizados a fim de comprovar o perfil para o qual os macrófagos estão sendo modulados, considerando o amplo espectro encontrado nestas células.

Além da grande diversidade de produtos naturais que podem ser explorados nesse contexto, os custos para utilização desse tipo de produto são mais baixos do que a quimioterapia e imunoterapia utilizada na clínica, o que traz uma perspectiva de novas abordagens contra o câncer de maneira sustentável, diminuindo efeitos colaterais e potencializando efeito antitumoral desses fármacos. Isso mostra o potencial promissor das fucoidanas sulfatadas no câncer.

14 ANEXO

Manuscrito submetido para a revista *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*

SULFATED POLYSACCHARIDES FROM BROWN ALGAE *DICTYOTA CARIBAEA* STIMULATES MACROPHAGES TO AN ANTITUMORAL PHENOTYPE

Alexia Nathália Brígido Assef¹, Felipe Barros Teles¹, Leonardo Paes Cinelli^{2,3}, Diego Veras Wilke^{1,*}

¹Drug Research and Development Center, Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceara, Brazil.

²PESAGRO-RIO, UFRJ, Macaé, Brazil.

³Glicomedicines Group, Federal University of Rio de Janeiro, Macae, Brazil

*Corresponding author: diegowilke@ufc.br

*Corresponding author:
Diego Veras Wilke, Drug Research and Development Center, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil, 60430-275. E-mail: diegowilke@gmail.com

Abstract

Fucoidans are sulfated polysaccharides capable of exerting biological activities such as antitumor and immunomodulatory effects. Previous studies demonstrated the antitumor activity of non-cytotoxic fucoidans from the seaweed *Dictyota caribaea* (Dc-SP) *in vivo*. Macrophages (Mfs) are innate immune cells capable of promoting or inhibiting tumor growth depending on the stimulus. This study aimed to evaluate the immunostimulant activity of Dc-SP on a murine Mfs cell line (RAW 264.7) *in vitro*. Dc-SP was assessed for its ability to

modify cell viability and stimulate the production of antitumor markers on RAW 264.7 cells. Dc-SP induced an increase ($p < 0.05$) in the production of NO and cytokines TNF- α , IL-1 β , and IL-10. The exposure of RAW 264.7 to Dc-SP also increased ($p < 0.05$) the expression of M1 phenotype markers such as iNOS, CD86, and MHC II. Dc-SP did not exhibit direct cytotoxicity on a murine melanoma cell line (B16-F10). However, the conditioned medium (CM) obtained from RAW 264.7 previously stimulated with Dc-SP (CM-Dc-SP) showed antiproliferative activity on tumor cells. B16-F10 incubated with CM-Dc-SP showed a cytostatic profile, tumor cells did not alter membrane integrity, however, suffered morphological changes such as cell shrinkage and high granularity. In conclusion, Dc-SP stimulated RAW 264.7 to an antitumor phenotype.

Keywords: fucoidan; immunostimulatory activity; *Dictyota caribaea*

1. Introduction

Mfs are innate immune cells involved in a myriad of biological processes. Mfs play different roles in the development of cancer and may present a phenotype with antitumor activity in the early stages of progression and even another phenotype capable of promoting tumors in established cancer [1]. Notably, Mfs are highly plastic cells and, depending on stimulation in the tumor microenvironment (TME), may undergo phenotypic changes in their function. Often, high infiltration of Mfs is strongly associated with a worse prognosis for the patient or even a tumor progression in many types of solid tumors, including melanoma [2]. In addition, Mfs can present antigens, secrete several important molecules, and can regulate the TME and other physiological functions [3]. Depending on the stimulus, these Mfs can be polarized to a classically activated (M1) or an alternatively activated (M2) phenotype with different marker expressions involved [4]. Tumor-associated macrophages (TAMs) predominantly exhibit the M2-like phenotype and are responsible for tissue repair, tumor angiogenesis, and wound

healing, contributing to tumor growth. On the hand, M1-like phenotype are tumoricidal and inhibit tumor growth [5,6]. Therefore, it is beneficial to have lower levels of M2-like phenotype Mfs and higher levels of M1-like phenotype Mfs in TME.

Natural products, including polysaccharides, have been studied for their diverse biological effects such as antitumor and immunomodulatory activities [7]. Thus, they are considered important biological response modulators (BRM) capable of activating the host's innate and acquired immune systems [8]. Fucoidans are natural polysaccharides containing L-fucose and sulfate ester groups. Also called homofucans, they are constituents of brown seaweed and some marine invertebrates (such as sea urchins and sea cucumbers) [9]. Fucoidans show antitumor properties and immunomodulatory effects with low toxicity, anti-inflammatory, and other pharmacological properties [10-12]. In our previous studies, we demonstrated that fucoidan from the brown algae Dc-SP exhibited an inhibitory effect *in vivo* on the sarcoma-180 tumor. However, it did not induce cytotoxicity on tumor cells *in vitro*. Additionally, Dc-SP did not show toxic effects on mice. Nevertheless, spleen weight increased along with an activated morphology, suggesting the observed antitumor effect may be related to an immunomodulatory effect of Dc-SP [13]. *In vitro* studies are suitable to accelerate drug discovery in several aspects highlighting the potential use of substances [14,15]. They include low cost and amount of substances, reproducibility, and avoidance of ethical issues. In this work, we evaluated the Mfs activation *in vitro* to an antitumor phenotype on RAW 264.7 cells exposed to Dc-SP.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), antibiotics (penicillin and streptomycin), and trypsin-EDTA were purchased from Gibco BRL Co. (Grand Island, NY, USA). Lipopolysaccharide from *Escherichia coli* (LPS), acetic acid, triton X-100,

sulfanilamide, and N-(1-Naphthyl)ethylenediamine (NED) reagents were obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Sodium nitrite (NaNO_2) was purchased from Dinâmica (Diadema, São Paulo, Brazil). TNF- α , IL-1 β , and IL-10 ELISA kits were purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Surface markers anti-CD86, anti-MHCII, and intracellular marker anti-iNOS were purchased from Thermo Fisher (Waltham, MA, USA).

2.2. Isolation of sulfated polysaccharide from *Dictyota caribaea* (Dc-SP)

The marine algae, *Dictyota caribaea*, was collected in March 2011 at Vermelha beach (23°11'46.0" S and 44°38'38.0" W), Paraty, Rio de Janeiro, Brazil, separated of epiphytes and from other species, washed with distilled water, air-dried, powdered and stored at -20°C. Voucher specimens (RFA 38779) were deposited at the Herbarium of the Rio de Janeiro Federal University, Brazil (Simas et al, 2014). The use of *D. caribaea* was registered on the National System of Management of Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge (SisGen) under the number #AC2D331. Dc-SP was obtained by proteolytic digestion using papain incubated at 60°C for 12 h and sulfated polysaccharide was precipitated in the presence of ethanol (at final concentrations of 9%) to obtain Dc-SP. The peak obtained at DEAE-cellulose (Dc-SP) was applied to a High Q-HPLC at the same conditions of equilibration, elution, collection, and fraction checked as previously described [13].

2.3. Cell lines, cell culture procedures, and treatments

RAW 264.7, a murine Mfs cell line, and B16-F10, a murine metastatic melanoma cell line, were purchased from the Banco de Células do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, Brazil). They were grown with DMEM medium, and supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin, and 100 U/mL penicillin and incubated at 37 °C with a 5% CO_2 atmosphere.

The Mfs activation assays were conducted with RAW 264.7 cells plated at 1.5×10^5 cells/mL and incubated for 24h with saline (as negative control), *Escherichia coli* lipopolysaccharide at

100 ng/mL (LPS) as a positive control, or Dc-SP at 10, 100, and 250 $\mu\text{g/mL}$. The antiproliferative assays were carried out with B16-F10 cells plated at 4×10^4 cells/mL and incubated for 48h with conditioned medium obtained from saline-treated Mfs (CM-Saline), LPS-treated Mfs (CM-LPS), Dc-SP-treated Mfs (CM-Dc-SP) or Doxorubicin at 0.6 μM (DOX) as a gold standard antiproliferative positive control.

2.4. Griess assay

Mfs activation was initially determined by evaluating the NO production. Griess assay was performed to measure nitrites accumulation the product of NO metabolism [16]. RAW 264.7 cells were incubated for 24 h with saline, LPS 100 ng/mL, or Dc-SP (at all concentrations described above). The nitric oxide (NO) levels formed in the supernatant of Mfs RAW 264.7 were indirectly measured by the Griess test.

2.5. Cytokines expression.

The levels of cytokines IL-10, TNF- α , and IL-1 β present in the CM samples were quantified by ELISA using antibodies obtained from R&D Systems according to the manufacturer's instructions.

2.6. Flow cytometry analysis

We used FITC-conjugated anti-CD86 (11-0862-82) and PE-conjugated anti-MHCII (12-5320-82) antibodies from Thermo Fisher (Waltham, MA, USA) to stain the Mfs activation markers CD86 and MHCII, respectively. Cells were incubated with the antibodies for 30 minutes at 4°C in FACS buffer (PBS supplemented with 4% FBS) and then washed with FACS buffer again. The cells were fixed with paraformaldehyde 1% for 5 minutes and permeabilized with Triton 0.1% for 5 minutes for iNOS labeling. Then, cells were incubated with Alexa Fluor 488-conjugated anti-NOS2 (53-5920-82) for 30 minutes at 4 °C in FACS buffer and washed with FACS buffer again. We used flow cytometry (model FACSVerser, BD Biosciences, San Jose, USA) for data acquisition and FlowJo software (San Jose, CA, USA) for the analysis.

Ten thousand events were acquired excluding debris and doublets for each tube. Median fluorescence intensity values (MFI) of iNOS, MHCII, and CD86 staining were normalized using the mean MFI values of the negative control. Additionally, the percentage of double-labeled cells was used to show the population of cells expressing MHC II and CD86 simultaneously.

2.7. Evaluation of antiproliferative effect in vitro

The antiproliferative effect of samples was performed by the sulforhodamine B (SRB) assay [17]. SRB assay is used for the determination of cell density, based on the measurement of total cellular protein content, and does not depend on cellular metabolism.

B16-F10 cells were then incubated for 48h with CM-Saline, CM-LPS, CM-Dc-SP, or DOX. Therefore, we added 100 μ L of CM to an equal volume of the B16-F10 supernatant (1:1 v/v), resulting in a dilution factor = 2. Absorbances were read on a plate spectrophotometer (Fisher Scientific, model Multiskan FC) at 564 nm or 570 nm. Using the same treatments above, Flow cytometry experiments were performed to evaluate changes in cell characteristics. Also, cell count, membrane integrity, and morphological changes were assessed. Flow cytometry analysis was performed using appropriate gating strategies for the desired cell population, with debris and aggregates excluded from the analysis. 10 thousand events were acquired in the flow cytometer for evaluation of cell count, morphology, and cell viability. The results were analyzed using FlowJo software.

2.8. Statistical analyses

The data are expressed as mean \pm SD. The surface staining for iNOS quantification and the morphological parameters assay were performed in two independent experiments. All other experiments were performed in three independent experiments. The differences between experimental groups were compared by One-way Analysis of Variance (ANOVA) followed by Dunnet's post-test to evaluate the tumor and organs weight ($p < 0.05$) and Newman-Keuls'

post-test for evaluating the biochemical and hematological parameters ($P < 0.05$) using the GraphPad PRISM program 5 (Intuitive Software for Science, San Diego, CA, USA).

3. Results and Discussion

3.1. Dc-SP polarizes macrophages towards to M1 phenotype

3.1.1 Nitric Oxide and Cytokines Release

Dc-SP stimulated the production of NO levels (Fig 1A) and increases iNOS (Fig 2A-B) expression in RAW 264.7 cells. In addition, Dc-SP also increased secretion of the cytokines TNF- α , IL-1 β , and IL-10 (Fig 1B-D), when compared to the negative control group. Nitric oxide is a highly volatile free radical that participates in various physiological and pathological processes in the body, such as the regulation of blood pressure, inhibition of leukocyte adhesion to the endothelium, and induction of apoptosis [18,19]. Both the presence of pathogenic microorganisms and certain substances can activate Mfs, resulting in the secretion of cytokines that play a crucial role in the host immune response [20]. As described in the literature, sulfated polysaccharides have immunomodulatory potential in cytokine production [21-23].

Studies have shown that fucans are capable of modulating cytokines and NO, demonstrating the immunomodulatory potential of this polysaccharide [24,25]. Together, these markers indicate that RAW 264.7 were polarized towards an M1-like phenotype, which is associated with inflammatory, microbicidal, and tumoricidal activities [26,27]. The immunomodulatory effect of fucoidans on Mfs is associated with the production of pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α , IL-6, IL-1 β , as well as the production of nitric oxide (NO) and iNOS. [7, 28-30]. Sulfated fucans derived from *Agarum cribrosum* led to a notable elevation in nitric oxide production and the upregulation of iNOS expression and IL-10 because of nuclear factor kappa B (NF- κ B) activation in the RAW 264.7 cell culture [31]. Another study shows

increased NO production in RAW 264.7 in a dose-dependent manner when exposed to fucoidan from brown algae *Nizamuddinina zanardinii*. Moreover, this fucoidan induces an up-regulation of iNOS, TNF- α , IL-6, and IL-1 β mRNA [30]. Similarly, fucoidan isolated from *Laminaria angustata* induced Mfs activation to M1-like phenotype since increased NO production and TNF- α and IL-6 synthesis and secretion in RAW 264.7 [32]. Fucoidan extracted from *Laminaria japonica* induced the release of NO, IL-6, and TNF- α in RAW 264.7. Furthermore, fucoidan from *L. japonica* enhanced the percentage of CD86⁺ cells, while the percentage of CD206⁺ cells was decreased after incubation with RAW 264.7 or mouse bone marrow-derived monocytes (BMDMs) [33].

Tabarsa and cols showed that a fucoidan from *Nizamuddinina zanardinii* upregulated the iNOS expression and NO production and released several pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1 β , IL-6, and anti-inflammatory IL-10 [30]. The IL-10 produced inhibited the overexpression of cytokines TNF- α , IL-1 β , and IL-6, exhibiting immunological responses [34]. These results suggest that the production of anti-inflammatory cytokines may suppress the overactivation of RAW 264.7 by secreting anti-inflammatory cytokines such as IL-10, thus helping to balance the ratio of pro- and anti-inflammatory cytokines in fucoidan-activated RAW 264.7.

3.1.2 Expression of surface activation markers

Dc-SP increased the expression of the MHC II and the CD86 on the surface of RAW 264.7 cells (Fig. 2C-H). CD86 expression increased by 1.6-fold and about 4.5-fold for MHC-II when compared with the saline group ($p < 0.05$). CD86 is a co-stimulatory molecule considered a marker for M1 phenotype [20,35]. Furthermore, Mfs present antigens to helper T cells through the CD86 and MHC II, regulating innate and adaptive immune responses in the presence of pathogens or activating substances [36]. The up-regulation of MHC II is implicated in antigen presentation and T cell activation, as well as being involved in the

interaction between T cells and antigen-presenting cells, such as Mfs, for antitumor activities. [37,38].

A study demonstrated that Polysaccharide-Protein Complex from *Lycium barbarum* L. was able to activate Mfs by inducing the expression of co-stimulatory molecules such as CD80, CD86, and CD40, as well as increasing the production of MHC II and cytokines TNF- α , IL-1 β in RAW 264.7 Mfs [39]. A polysaccharide from *Tinospora cordifolia* activated Mfs through the classical pathway in a TLR4-MyD88 dependent manner, leading to the production of M1 markers such as nitric oxide (NO), inducible nitric oxide synthase (iNOS), pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL- β , IL-6, IL-12, IL-10, and IFN- γ , as well as activated Mfs surface markers such as CD86 and MHCII [41]. M1 activation is advantageous for the host, as cytokines such as IFN- γ , IL-1 β , and IL-6 produced by Mfs exhibit an anti-tumoral response. On the other hand, TAMs with an M2 phenotype is often associated with pro-tumoral effects, such as tumor growth, metastasis, and angiogenesis [41,42].

Altogether, our results suggest that Dc-SP is a promising immunomodulatory agent by modulating Mfs to an M1 phenotype. Additionally, Dc-SP exerts *in vivo* antitumor inhibition and may modulate the TME targeting Mfs [13]. Then we further investigate the antiproliferative activity of CM-RAW 264.7 exposure to Dc-SP on tumor cells, described below.

3.2. Antitumor potential of macrophages stimulated with Dc-SP

3.2.1 Conditioned medium obtained from RAW 264.7 cells stimulated with Dc-SP inhibits the proliferation of B16-F10 cells

Dc-SP did not show cytotoxicity against the B16-F10 murine melanoma cells (Data not shown). However, the CM samples showed inhibition of tumor growth cells (Fig. 3A).

A decrease in the number of cells can be observed at concentrations of 100 and 250 $\mu\text{g/mL}$ of CM of Mfs activated by Dc-SP when compared with the control group (Fig. 3C), suggesting that Dc-SP favors an inhibition of B16-F10 murine melanoma proliferation. Doxorubicin (DOX) at 0.6 μM also reduced cell counts. However, as shown in Fig. 3B, no changes were found in the integrity of the membrane of cells treated with CM, showing that the sample did not damage the cell membrane. Only DOX changed the percentage of cells with intact membranes. Besides, the morphological analysis showed increases in the populations of cell shrinkage and cells with high granularity (Fig. 3D-F).

Engström and colleagues demonstrated that the CM of human Mfs polarized to an M1-phenotype after LPS and interferon-gamma ($\text{IFN-}\gamma$) exposure inhibits the proliferation of colorectal adenocarcinoma cell lines [43]. Already the CM from RAW 264.7 polarized to M1-like phenotype with fucoidan from *L. japonica* significantly reduced the cell viabilities of two tumor cell lines (HCT116 and RKO) by about 40% [33]. In the same way, fucoidan from *Cladosiphon okamuranus* did not inhibit cell growth of sarcoma 180 *in vitro*. However, when cocultured with RAW 264.7 in contact with these fucoidans, tumor cell growth was inhibited. This effect was attributed to the NO release by RAW 264.7 as a marker for the M1 phenotype [44]. Our approach could not relate NO effect, once we used the supernatant, which already converted NO to nitrite and later is not active. Nevertheless, due to the recognized cytotoxic effect of the TNF family, we used tested the antiproliferative activity of $\text{TNF-}\alpha$ to evaluate its putative role on the B16-F10 inhibition by CM from RAW 264.7 cells. However, $\text{TNF-}\alpha$ did not inhibit B16-F10 cell growth after 48h of treatment at concentrations found in CM samples on ELISA assay. Therefore, other mediators produced by Mfs must be related to the inhibition of B16-F10 cell growth.

Apoptosis is one of the main mechanisms by which anticancer chemotherapeutic agents kill cells. Hydrophilic high molecular weight DNA markers, such as propidium iodide, cannot

penetrate intact cells due to their size and do not label apoptotic cells unless they exhibit changes in plasma membrane permeability, as occurs in the late stages of apoptosis [45]. Cell shrinkage due to dehydration can be detected in the early stages of apoptosis as a decrease in the intensity of the forward scatter (FSC) light scattering signal [46,47]. Some fucans exhibit antiproliferative activity through various mechanisms, such as induction of cell cycle arrest, apoptosis, and activation of the immune system. These activities such as the induction of inflammation through the immune system, oxidative stress, and mobilization of stem cells have been reported to be linked to these anticancer properties [48].

One previous report suggested that the antitumor activity of fucoidan Dc-SP against S-180 cells *in vivo* is related to the enhancement of immune responses [13]. It shows that Dc-SP has an antitumor activity through immunomodulation of the TME rather than directly killing tumor cells, which could be promising in terms of reducing the side effects of cytotoxic substances.

Taken together, our data suggest the antitumor activity *in vivo* previously reported for Dc-SP [13] may be related to Mfs activation to M1 phenotype.

4. Conclusions

Dc-SP polarizes RAW 264.7 to a pro-inflammatory and an antitumor phenotype *in vitro*.

Acknowledgments

This work was supported by National Institute of Science and Technology on Biodiversity and Natural Products (INCT BioNat-CNPq/FAPESP, Finance code #465637/2014-0). The authors also would like to thank the Multi-User Facility of Drug Research and Development Center of Federal University of Ceará for technical support.

Declaration of interest

The authors declare no conflict of interest.

Author contributions

Alexia Nathália Brígido Assef: Methodology, Validation, Writing – Original Draft, Formal analysis, Investigation, Visualization; **Felipe Barros Teles:** Methodology, Writing – Review & Editing; **Leonardo Paes Cinelli:** Funding acquisition, Methodology, and Validation; **Diego Veras Wilke:** Conceptualization, Funding acquisition, Supervision, Validation, Writing – Review & Editing.

Conflict of interest

None.

Data Availability Statement

The data underlying this article will be shared on reasonable request to the corresponding author.

References

- [1] R. Noy, J.W. Pollard, Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy, *Immunity*. 41 (2014) 49–61. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.010>
- [2] H. Torisu, M. Ono, H. Kiryu, M. Furue, Y. Ohmoto, J. Nakayama, Y. Nishioka, S. Sone, M. Kuwano, Macrophage infiltration correlates with tumor stage and angiogenesis in human malignant melanoma: possible involvement of TNFalpha and IL-1alpha, *Int. J. Cancer*. 85 (2000) 182–188. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(20000115\)85:2<182::AID-IJC6>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(20000115)85:2<182::AID-IJC6>3.0.CO;2-M)
- [3] S. Gordon, and A. Plüddemann, Tissue macrophages: heterogeneity and functions, *BMC Biol*. 15 (1), 53 (2017). <https://doi.org/10.1186/s12915-017-0392-4>

- [4] M. Locati, A. Mantovani, and A. Sica, Macrophage activation and polarization as an adaptive component of innate immunity, *Adv. Immunol.* 120 (2013) 163–184. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417028-5.00006-5>
- [5] W. Wei, Z.-P. Li, Z.-X. Bian, and Q.-B. Han, Astragalus polysaccharide RAP induces macrophage phenotype polarization to M1 via the notch signaling pathway, *Molecules.* 24:2016 (2019). <https://doi.org/10.3390/molecules24102016>
- [6] S. Tao, Z. Zhao, X. Zhang, X. Guan, J. Wei, B. Yuan, et al., The role of macrophages during breast cancer development and response to chemotherapy, *Clin. Transl Oncol.* 22 (11) (2020) 1938–1951. <https://doi.org/10.1007/s12094-020-02348-0>
- [7] L. J. Deng, M. Qi, N. Li, Y. H. Lei, D. M. Zhang, and J. X. Chen, Natural products and their derivatives: promising modulators of tumor immunotherapy, *J. Leukoc. Biol.* 108 (2) (2020) 493–508. <https://doi.org/10.1002/JLB.3MR0320-444R>
- [8] C. Hou, L. Chen, L. Yang, and X. Ji, An insight into anti-inflammatory effects of natural polysaccharides, *Int. J. Biol. Macromolecules.* 153 (2020) 248–255. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.315>
- [9] A. O. Chizhov, A. Dell, H. R. Morris, A study of fucoidan from the brown seaweed *Chorda filum*. *Carbohydr. Res.* 320 (1999) 108–119. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(99\)00148-2](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(99)00148-2)
- [10] Y. Lin, X. Qi, H. Liu, K. Xue, S. Xu, Z. Tian, The anti-cancer effects of fucoidan: A review of both *in vivo* and *in vitro* investigations. *Cancer Cell Int.* 20 (2020) 154. <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01233-8>
- [11] E. Apostolova, P. Lukova, A. Baldzhieva, P. Katsarov, M. Nikolova, I. Iliev, L. Peychev, B. Trica, F. Oancea, C. Delattre, et al., Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Effects of Fucoidan: A Review, *Polymers.* 12 (2020) 2338. <https://doi.org/10.3390/polym12102338>
- [12] M.V. Kiselevskiy, N.Y. Anisimova, N.E. Ustyuzhanina, D.Z. Vinnitskiy, A.I. Tokatly, V.V. Reshetnikova, I.O. Chikileva, I.Z. Shubina, K.I. Kirgizov, N.E. Nifantiev, Perspectives for the

Use of Fucoidans in Clinical Oncology. *Int. J. Mol. Sci.* 23 (2022) 11821. <https://doi.org/10.3390/ijms231911821>

[13] A. N. B. Assef, B. B. Costa, T. A. Moreira, et al., Antitumor and immunostimulating sulfated polysaccharides from brown algae *Dictyota caribaea*, *Carbohydrate Polymers*. 2 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2021.100142>.

[14] E. L. Andrade, A. F. Bento, J. Cavalli, S. K. Oliveira, C. S. Freitas, R. Marcon, R. C. Schwanke, J. M. Siqueira, & J. B. Calixto, Non-clinical studies required for new drug development – Part I: early in silico and *in vitro* studies, new target discovery and validation, proof of principles, and robustness of animal studies, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 49(11) (2016). <https://doi.org/10.1590/1414-431X20165644>

[15] A. Ranga, N. Gjorevski, M. P. Lutolf, Drug discovery through stem cell-based organoid models. *Adv Drug Deliv Rev.* 69-70 (2014) 19-28. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.02.006>

[16] L.C. Green, D.A. Wagner, J. Glogowski, et al., Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids, *Anal. Biochem.* 126 (1982). [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(82\)90118-x](https://doi.org/10.1016/0003-2697(82)90118-x)

[17] P. Skehan, R. Storeng, D. Scudiero, et al., New colorimetric cytotoxicity assay for anti-cancer-drug screening, *J. Natl. Cancer Inst.* 82 (1990). <https://doi.org/10.1093/jnci/82.13.1107>

[18] M. Moncada, R. M. J. Palmer, E. A. Higgs, Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43 (1991) 109–142.

[19] G. A. Duque, and A. Desconteaux, Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases, *Front Immunol* 5 (2014) 491. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00491>

[20] A. Shapouri-Moghaddam, S. Mohammadian, H. Vazini, M. Taghadosi, S. A. Esmacili, F. Mardani, B. Seifi, A. Mohammadi, J. T. Afshari, A. Sahebkar, Macrophage plasticity,

polarization, and function in health and disease. *J. Cell. Physiol.* 233 (2018) <https://doi.org/6425-6440>. 10.1002/jcp.26429

[21] M. Pérez-Recalde, M. C. Matulewicz, C. A. Pujol, M. J. Carlucci, *In vitro* and *in vivo* immunomodulatory activity of sulfated polysaccharides from red seaweed *Nemalion helminthoides*. *Int. J. Biol. Macromol.* 63 (2014) <https://doi.org/38-42>. 10.1016/j.ijbiomac.2013.10.024

[22] M. Tabarsa, S. G. You, E. H. Dabaghian, U. Surayot, Water-soluble polysaccharides from *Ulva intestinalis*: Molecular properties, structural elucidation, and immunomodulatory activities. *J. Food Drug Anal.* 26 (2018) 599–608. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2017.07.016>

[23] U. Surayot, J. H. Lee, C. Kanongnuch, Y. Peerapornpisal, W. J. Park, S. G. You, Structural characterization of sulfated arabinans extracted from *Cladophora glomerata* Kützinger and their macrophage activation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 80 (2016) <https://doi.org/972-982>. 10.1080/09168451.2015.1132149

[24] O. Berteau, B. Mulloy, Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. *Glycobiology.* 13 (2003) 29–40. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwg058>

[25] M. Rossol, H. Heine, U. Meusch, D. Quandt, C. Klein, M. J. Sweet, S. Hauschildt, LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. *Crit Rev Immunol* 31 (2011) 379–446. <https://doi.org/10.1615/critrevimmunol.v31.i5.20>

[26] Y. Yao, X. H. Xu, L. Jin, Macrophage Polarization in Physiological and Pathological Pregnancy. *Front Immunol.* 10 (2019) 792. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00792>. PMID: 31037072

- [27] Y. Wang, W. Smith, D. Hao, B. He, L. Kong, M1 and M2 macrophage polarization and potentially therapeutic naturally occurring compounds, *Int Immunopharmacol.* 70 (2019) 459-466. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.02.050>
- [28] T. Nakamura, H. Suzuki, Y. Wada, T. Kodama, T. Doi, Fucoidan induces nitric oxide production via p38 mitogen-activated protein kinase and NF- κ B-dependent signaling pathways through macrophage scavenger receptors, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 343 (2006) 286–294. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.02.146>
- [29] D. Bi, B. Yu, Q. Han, J. Lu, W. L. White, Q. Lai, N. Cai, W. Luo, L. Gu, S. Li, et al., Immune Activation of RAW264.7 Macrophages by Low MolecularWeight Fucoidan Extracted from New Zealand *Undaria pinnatifida*. *J. Agric. Food Chem.* 66 (2018) 10721–10728. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03698>
- [30] M. Tabarsa, E. H. Dabaghian, S. You, K. Yelithao, R. Cao, M. Rezaei, M. Alboofetileh, S. Bita, The activation of NF- κ B and MAPKs signaling pathways of RAW264.7 murine macrophages and natural killer cells by fucoidan from *Nizamuddinina zanardinii*. *Int. J. Biol. Macromol.* 148 (2020) 56–67. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.125>
- [31] M. Cho, D. Lee, J. Kim, S. You, Molecular characterization and immunomodulatory activity of sulfated fucans from *Agarum cribrosum*, *Carbohydr Polym.* 113 (2014) 507–514. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.07.055>
- [32] T. Teruya, S. Takeda, Y. Tamaki, M. Tako, Fucoidan Isolated from *Laminaria angustata* var. *longissima* Induced Macrophage Activation, *Biosci Biotechnol Biochem.* 74 (9) (2010) 1960-2. <https://doi.org/10.1271/bbb.100294>
- [33] Z. Deng, N. Wu, Q. Suo, J. Wang, Y. Yue, L. Geng, Q. Zhang, Fucoidan, as an Immunostimulatory promotes M1 macrophage differentiation and enhances the chemotherapeutic sensitivity of capecitabine in colon cancer, *Int J Biol Macromol.* 222 (2022) 562-572. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.09.201>

- [34] S. Jiang, H. Yin, R. Li, W. Shi, J. Mou, J. Yang, The activation effects of fucoidan from sea cucumber *Stichopus chloronotus* on RAW264.7 cells via TLR2/4-NF-kB pathway and its structure-activity relationship. *Carbohydr. Polym.* 270 (2021) 118353. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118353>
- [35] N. Wang, T. Zhao, S. Li, Y. Li, Y. Wang, D. Li et al., Fibroblast growth factor 21 ameliorates pancreatic fibrogenesis via regulating polarization of macrophages, *Exp. Cell Res.* 382(1) (2019) 111457. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.06.002>
- [36] P. Li, X. Zhang, Y. Cheng, J. Li, Y. Xiao, Q. Zhang, A. Zong, C. Zhong, and F. Wang, Preparation and *in vitro* immunomodulatory effect of curdlan sulfate, *Carbohydrate Polymers* 102 (2014) 852-861. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.10.078>
- [37] G. Y. Kim, G. S. Choi, S. H. Lee, and Y. M. Park, Acidic polysaccharide isolated from *Phellinus linteus* enhances through the up-regulation of nitric oxide and tumor necrosis factor- α from peritoneal macrophages, *Journal of Ethnopharmacology* 95 (2004) 69-76. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.06.024>
- [38] L. Z. Meng, K. Feng, L. Y. Wang, K. L. Cheong, H. Nie, J. Zhao, and S. P. Li, Activation of mouse macrophages and dendritic cells induced by polysaccharides from a novel *Cordyceps sinensis* fungus UM01, *Journal of Functional Foods*. 9 (2014) 242-253. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.04.029>
- [39] Z. Chen, M. Y. Soo, N. Srinivasan, B. K. H. Tan, and S. H. Chan, Activation of macrophages by polysaccharide–protein complex from *Lycium barbarum* L., *Phytother. Res.*, 23 (2009) 1116-1122. <https://doi.org/10.1002/ptr.2757>
- [40] P. K. Gupta, M. G. R. Rajan, S. Kulkarni, Activation of murine macrophages by G1-4A, a polysaccharide from *Tinospora cordifolia*, in TLR4/MyD88 dependent manner, *Int. Immunopharmacol.* 50 (2017) 168–177. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.06.025>

- [41] Q. Zhou, R. Q. Peng, X. J. Wu, Q. Xia, J. H. Hou, Y. Ding, Q. M. Zhou, X. Zhang, Z. Z. Pang, D. S. Wan, Y. X. Zeng, X. S. Zhang, The density of macrophages in the invasive front is inversely correlated to liver metastasis in colon cancer, *J. Transl. Med.* 8 (2010) 13. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-8-13>
- [42] M. Alfano, F. Graziano, L. Genovese, G. Poli, Macrophage polarization at the crossroad between HIV-1 infection and cancer development, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33 (2013) 1145–1152. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.300171>
- [43] A. Engström, A. Erlandsson, D. Delbro, J. Wijkander, Conditioned media from macrophages of M1, but not M2 phenotype, inhibit the proliferation of the colon cancer cell lines HT-29 and CACO-2, *Int J Oncol.* 44(2) (2014)385-92. <https://doi.org/10.3892/ijo.2013.2203>.
- [44] K. Takeda, K. Tomimori, R. Kimura, C. Ishikawa, T. K. Nowling, N. Mori, Anti-tumor activity of fucoidan is mediated by nitric oxide released from macrophages. *Int J Oncol.* 40(1) (2012) 251-60. <https://doi.org/10.3892/ijo.2011.1168>
- [45] S. Povea-Cabello, M. Oropesa-Ávila, P. De la Cruz-Ojeda, M. Villanueva-Paz, M. De la Mata, J. M. Suárez-Rivero, M. Álvarez-Córdoba, I. Villalón-García, D. Cotán, P. Ybot-González, J. A. Sánchez-Alcázar, Dynamic Reorganization of the Cytoskeleton during Apoptosis: The Two Coffins Hypothesis, *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017) 2393. <https://doi.org/10.3390/ijms18112393>
- [46] M. G. Ormerod, F. P. M. Cheetham, X. M. Sun, Discrimination of apoptotic thymocytes by forward light scatter. *Cytometry.* 21 (1995) 300–304. <https://doi.org/10.1002/cyto.990210311>
- [47] W. Swat, L. Ignatowicz, P. Kisielow, Detection of apoptosis of immature CD4+8+ thymocytes by flow cytometry. *J Immunol Methods.* 137 (1991) 79–87. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(91\)90396-w](https://doi.org/10.1016/0022-1759(91)90396-w)

[48] J. Kwak-Kim, S. Bao, S. K. Lee, J. W. Kim, A. Gilman-Sachs, Immunological Modes of Pregnancy Loss: Inflammation, Immune Effectors, and Stress. American Journal of Reproductive Immunology. 72 (2014) 129-140. <https://doi.org/10.1111/aji.12234>

Figures

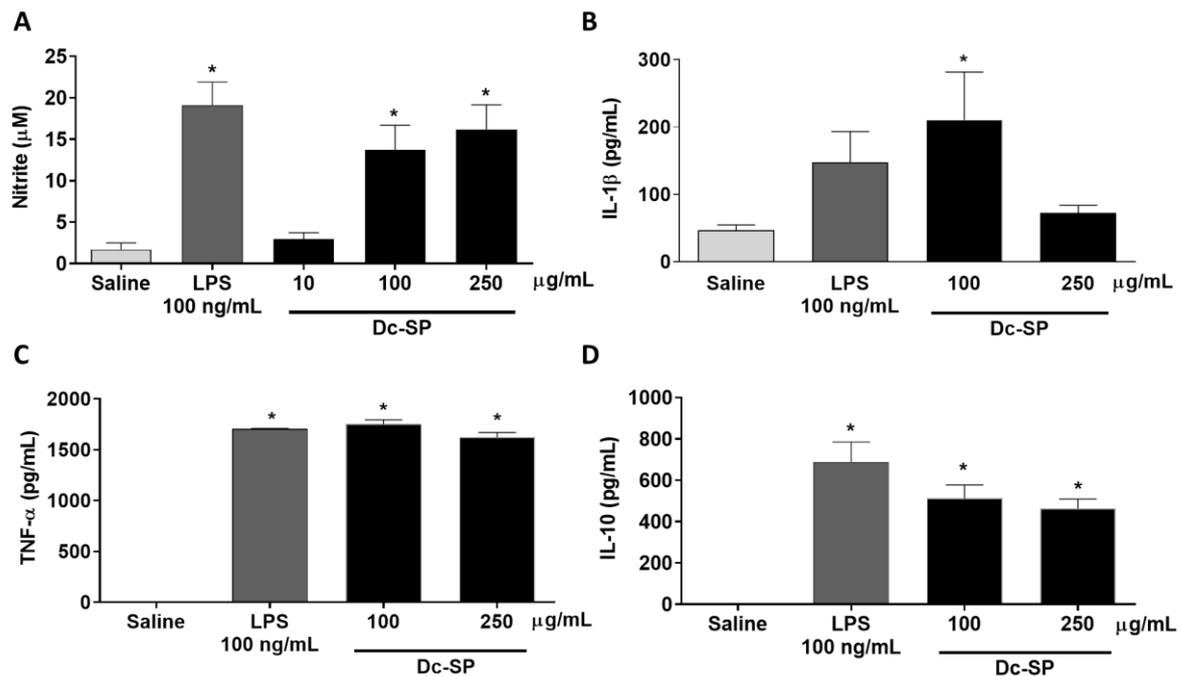


Fig. 1. Sulfated polysaccharide from brown algae *Dictyota caribaea* induces an M1 phenotype on macrophages. RAW264.7 cells were exposed to saline as a negative control, *E. coli* lipopolysaccharide at 100 ng/mL (LPS) as a positive control, and increasing concentrations of sulfated polysaccharides from *D. caribaea* (Dc-SP) for 24h. **A**, Nitrite levels produced by Mfs (RAW264.7 cell line) were evaluated by Griess assay, while **B-D** show the levels of IL-β, TNF-α, and IL-10 respectively evaluated by ELISA. Data are presented as mean ±SD. Differences between the negative control versus the other groups were determined by the analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's post-test. * $p < 0.05$ when compared with negative control. Results are representative of three independent experiments, each one performed in triplicate.

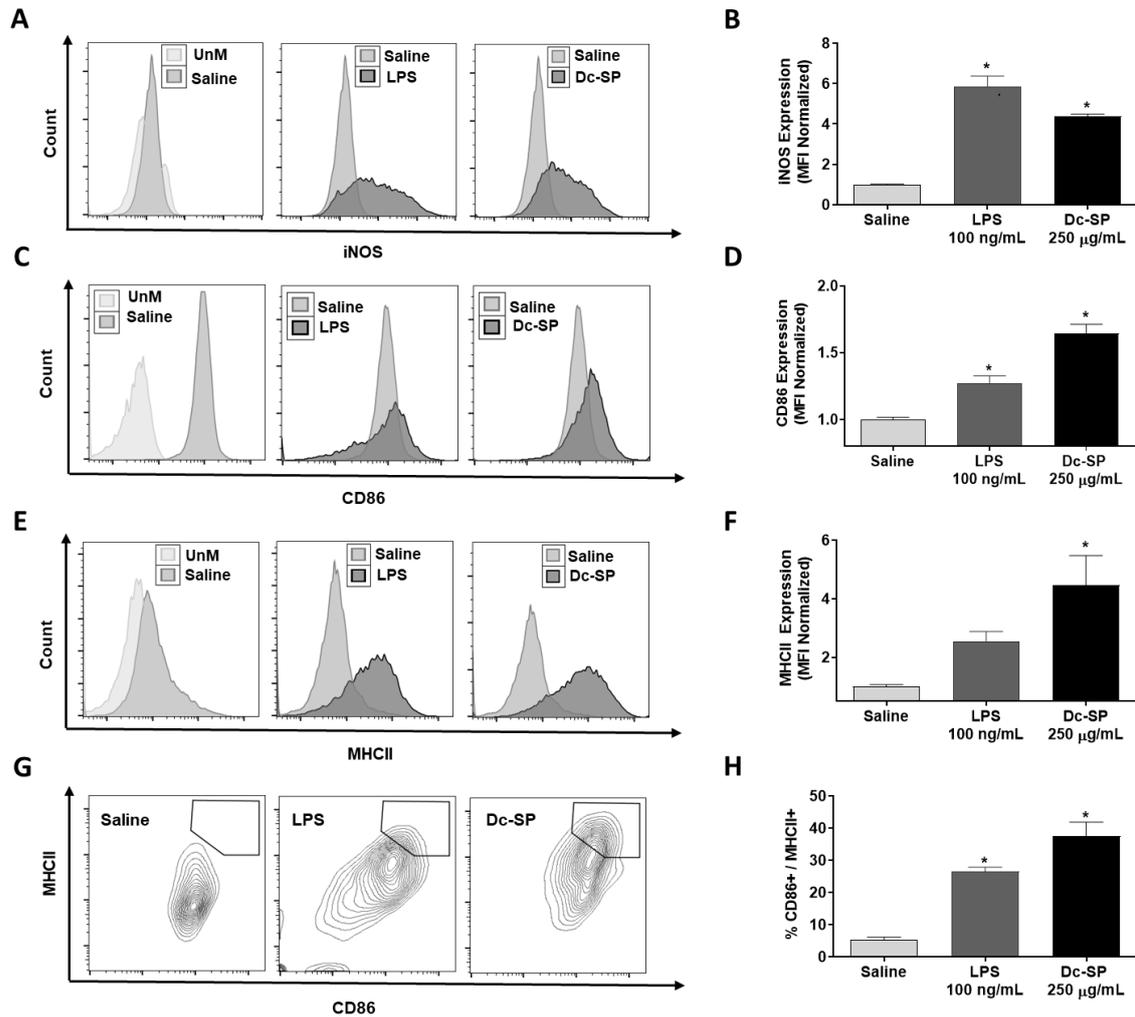


Fig. 2. Sulfated polysaccharide from brown algae *Dictyota caribaea* induces expression surface and intracellular markers. Expression of iNOS, CD86, and MHCII was evaluated on RAW264.7 cells by flow cytometry. RAW264.7 cells were incubated for 24 h with saline as a negative control, *E. coli* lipopolysaccharide at 100 ng/mL (LPS) as a positive control, and Dc-SP at 250 µg/mL. Flow cytometry histograms are depicted in **A**, **C**, and **E**. Median fluorescence intensity (MFI) data are depicted in **B**, **D**, and **F**, as normalized values. The percentage of CD86⁺/MHCII⁺ cells is depicted in **G** and **H**. The flow cytometry experiments acquired ten thousand events, excluding debris and doublets. Unstained cells (UnM) were used as a reference for basal antibody background. Data on **B**, **D**, **F**, and **H** are presented as mean ±SD. The mean differences between the negative control versus other groups were

compared by analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's post-test. Results are representative of three independent experiments, each one performed in triplicate.

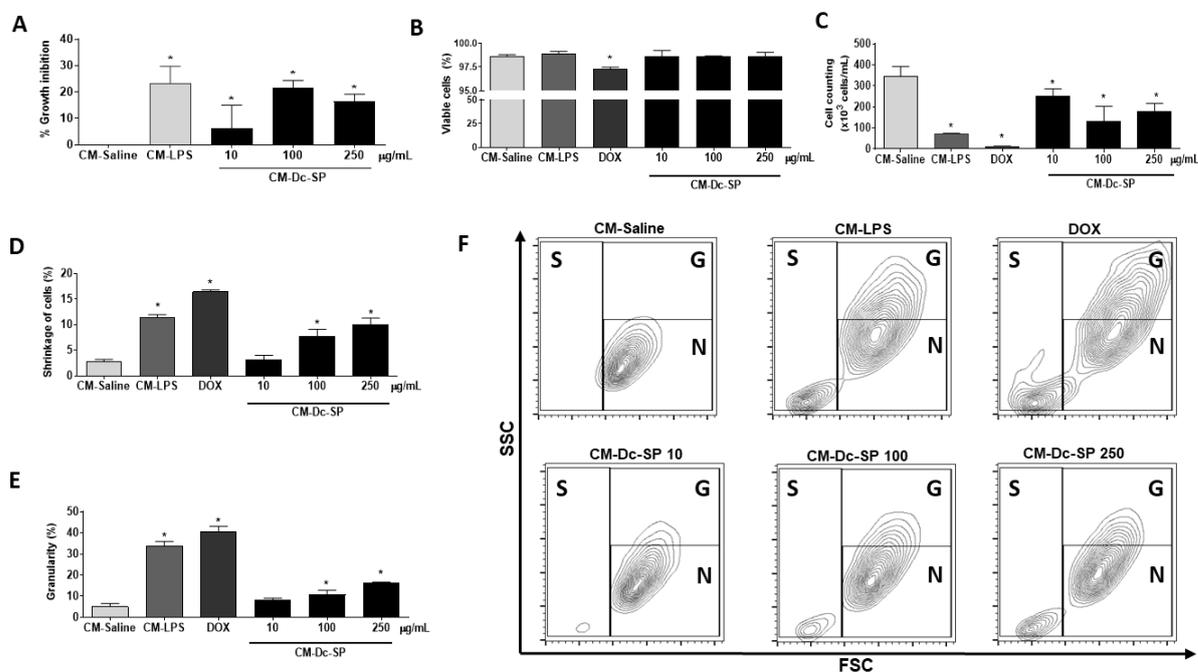


Fig. 3. Antiproliferative effect of conditioned medium of macrophages stimulated with sulfated polysaccharide from *Dictyota caribaea* on melanoma. Conditioned medium (CM) was obtained from the supernatant of RAW264.7 cells incubated with saline (CM-Saline), *E. coli* lipopolysaccharide at 10 ng/mL (CM-LPS), doxorubicin at 0.6 μ M (DOX) and Dc-SP (CM-Dc-SP) for 24h. B16-F10 cells were then incubated with CM for 48h. **A**, Antiproliferative effect of Dc-SP against the murine metastatic melanoma cell line (B16-F10) evaluated by SRB assay. **B** and **C**, Cell count and cell viability of B16-F10 cells by flow cytometry. **D-F**, Cell morphology analyzed by flow cytometry. Data of A-E are presented as mean \pm SD. Differences between data normalized to the percentage of cell growth inhibition of negative control versus other groups were determined by the analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's post-test. * $p < 0.05$. Legend: **S**, Cell shrinkage; **G**, Granulosity; **N**, Normal morphology of cells. Results are representative of two independent experiments, each one performed in triplicate.

REFERÊNCIAS

- ABOUD, K., MEISSNER M., OCEN J., et al., Cytotoxic chemotherapy: clinical aspects, **Medicine.**, v. 51, 23-27, 2022.
- AISA, Y.; MORI, T.; NAKAZATO, T. et al. Effects of immunosuppressive agents on magnesium metabolism after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Transplantation.**, v. 80, p 1046-1050, 2005.
- ALE, M.T.; MARUYAMA, H.; TAMAUCHI, H.; MIKKELSEN, J.D.; MEYER, A.S. Fucoidan from *Sargassum* sp. and *Fucus vesiculosus* reduces cell viability of lung carcinoma and melanoma cells *in vitro* and activates natural killer cells in mice *in vivo*. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 49, p 331–336, 2011a.
- ALE, M.T.; MIKKELSEN, J.D.; MEYER, A.S. Important Determinants for Fucoidan Bioactivity: A Critical Review of Structure-Function Relations and Extraction Methods for Fucose-Containing Sulfated Polysaccharides from Brown Seaweeds. **Mar. Drugs**, v. 9, 2106–2130, 2011b.
- ALEKSEYENKO T.V., ZHANAYEVA S. YA., et al., Antitumor and antimetastatic activity of fucoidan, a sulfated polysaccharide isolated from the Okhotsk sea *Fucus evanescens* brown alga, **Bull. Exp. Biol. Med.**, v. 143, 730-732, 2007.
- ALFANO, M., GRAZIANO F., GENOVESE L., POLI G., Macrophage polarization at the crossroad between HIV-1 infection and cancer development, **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 33, 1145–1152, 2013.
- ALLAVENA, P.; MANTOVANI, A. Immunology in the clinic review series; focus on cancer: Tumour-associated macrophages: Undisputed stars of the inflammatory tumour microenvironment. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 167, n. 2, p. 195–205, 2012.
- ALVES, A. P.; MULLOY, B.; DINIZ, J. A.; MOURÃO, P. A. S. Sulfated polysaccharides from the egg jelly layer are species-specific inducers of acrossosomal reaction in sperm of sea urchins. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 6965-6971, 1997.
- ANDON, F.T.; DIGIFICO, E.; MAEDA, A.; ERRENI, M.; MANTOVANI, A.; ALONSO, M. J.; ALLAVENA, P. Targeting tumor associated macrophages: the new challenge for nanomedicine, **Semin. Immunol.**, v. 34, 103–113, 2017.
- ANDRADE, E. L., BENTO, A. F., CAVALLI, J., OLIVEIRA, S. K., FREITAS, C. S., MARCON, R., SCHWANKE, R. C., SIQUEIRA, J. M., & CALIXTO, J. B., Non-clinical studies required for new drug development – Part I: early *in silico* and *in vitro* studies, new target discovery and validation, proof of principles, and robustness of animal studies, **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 49, 2016.
- APOSTOLOVA, E., LUKOVA, P., BALDZHIEVA, A., KATSAROV, P., NIKOLOVA, M., ILIEV, I., PEYCHEV, L., TRICA, B., OANCEA, F., DELATTRE, C., et al., Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Effects of Fucoidan: A Review, **Polymers**, v. 12, 2338, 2020.

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

ASAI, A. et al. Host antitumor resistance improved by the macrophage polarization in a chimera model of patients with HCC. **Oncoimmunology**, v. 6, e1299301, 2017.

ASSEF, A. N. B. **Meio condicionado de macrófagos ativado por polissacarídeos sulfatados da alga parda *Dictyota caribaea* inibe a proliferação de melanoma metastático *In vitro***. Dissertação (Mestrado) – Farmacologia. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017. Disponível em: <https://repositorio.ufc.br/handle/riufc/24598>

ASSEF, A. N. B, COSTA, B. B., MOREIRA, T. A., et al., Antitumor and immunostimulating sulfated polysaccharides from brown algae *Dictyota caribaea*, **Carbohydrate Polymer Technologies and Applications**, v. 2, 2021.

ATRI, C, GUERFALI FZ, LAOUINI D. Role of human macrophage polarization in inflammation during infectious diseases. **Int J Mol Sci.**, v. 19, 1801, 2018.

AZUMA, K.; ISHIHARA, T.; NAKAMOTO, H.; AMAHA, T.; OSAKI, T.; TSUKA, T.; IMAGAWA, T.; MINAMI, S.; TAKASHIMA, O.; IFUKU, S.; MORIMOTO, M.; *et al.* Effects of oral administration of fucoidan extracted from *Cladosiphon okamuranus* on tumor growth and survival time in a tumor-bearing mouse model. **Mar. Drugs**, v. 10, p 2337–2348, 2012.

BAARS, A.; CLAESSEN, A.M.E.; WAGSTAFF, J.; GIACCONE, G.; ET AL, A phase II study of active specific immunotherapy and 5-FU/Leucovorin as adjuvant therapy for stage III colon carcinoma, Br. J. **Cancer**, v. 86, 1230–1234, 2002.

BAHRAMZADEH, S., TABARSA, M., YOU, S.G., LI, C., BITA, S., Purification, structural analysis and mechanism of murine macrophage cell activation by sulfated polysaccharides from *Cystoseira indica*, **Carbohydr. Polym**, v. 205, 261–270, 2019.

BANDARCHI, B.; JABBARI, C. A.; VEDADI, A.; NAVAB, R. Molecular biology of normal melanocytes and melanoma cells. **Journal of clinical pathology**, v. 66, n. 8, p. 644–8, 2013.

BERLINCK, R. G. S. et al. A Química de Produtos Naturais do Brasil do Século XXI. **Química Nova**, v. 40, n. 6, p. 706–710, 2017.

BERTEAU, O., MULLOY B., Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. **Glycobiology**, v. 13, 29–40, 2003.

BHATIA, S.; TYKODI, S. S.; THOMPSON, J. A. Treatment of metastatic melanoma: an overview. **Oncology**, v. 23, n. 6, p. 488–96, 2009.

BI, D.; YU, B.; HAN, Q.; LU, J.; WHITE, W.L.; LAI, Q.; CAI, N.; LUO, W.; GU, L.; LI, S.; et al. Immune Activation of RAW264.7 Macrophages by Low Molecular Weight Fucoidan Extracted from New Zealand *Undaria pinnatifida*. **J. Agric. Food Chem.**, v. 66, 10721–10728, 2018.

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, 2010.

BONNARDEL, J.; GUILLIAMS, M. Developmental control of macrophage function. **Current Opinion in Immunology**, v. 50, p. 64–74, 2018.

BORAZJANI, J., TABARSA, M., YOU, S., REZAEI, M., Purification, molecular properties, structural characterization, and immunomodulatory activities of water soluble polysaccharides from *Sargassum angustifolium*, **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 109, 793–802, 2018.

BOTTI, G.; SCOGNAMIGLIO, G.; CANTILE, M. PD-L1 Immunohistochemical Detection in Tumor Cells and Tumor Microenvironment: Main Considerations on the Use of Tissue Micro Arrays. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 17, 1046, 2016.

BOUTILIER, A. J.; ELSAWA, S. F. Macrophage Polarization States in the Tumor Microenvironment. **Int J Mol Sci**, v. 22, 6995, 2021.

BOYCE, S. T. Design principles for composition and performance of cultured skin substitutes. **Burns**, v. 27, n. 5, p. 523–533, 2001.

BRANDNER, J. M.; HAASS, N. K. Melanoma's connections to the tumour microenvironment. **Pathology**, London, v. 45, n. 5, p. 443-52, 2013.

CAO, R.A., LEE, Y.J., YOU, S.G., Water soluble sulfated-fucans with immune-enhancing properties from *Ecklonia cava*, **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 67, 303–311, 2014.

CARREAU, N.; PAVLICK, A. Revolutionizing treatment of advanced melanoma with immunotherapy. **Surgical Oncology**, v. 42, 101180, 2022.

CHANMEE, T. et al. Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. **Cancers**, v. 6, n. 3, p. 1670–1690, 2014.

CHEN, L.; HUANG G. The antiviral activity of polysaccharides and their derivatives, **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 115, 77–82, 2018.

CHEN, Z., SOO M. Y., SRINIVASAN N., TAN B. K. H., AND CHAN S. H., Activation of macrophages by polysaccharide–protein complex from *Lycium barbarum* L., **Phytother. Res.**, v. 23, 1116-1122, 2009.

CHEN, L. M.; TSENG, H. Y.; CHEN, Y. A.; AL HAQ, A. T.; HWANG P. A.; HSU, H. L. Oligo-fucoidan prevents M2 macrophage differentiation and HCT116 tumor progression, **Cancers**, v. 12, 421, 2020.

CHEN, P.; HUANG, Y.; BONG, R.; et al. Tumor-Associated Macrophages Promote Angiogenesis and Melanoma Growth via Adrenomedullin in a Paracrine and Autocrine Manner. **Clinical Cancer Research**, v. 17, n. 23, p. 7230–7239, 2011.

CHEN, Z., LU, J., SRINIVASAN, N., TAN, B. K. H., AND CHAN, S. H. Polysaccharide-protein complex from *Lycium barbarum* L. Is a novel stimulus of dendritic cell immunogenicity. **J. Immunol.**, v. 182, 3503–3509, 2009.

CHIN, L. The genetics of malignant melanoma: lessons from mouse and man. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 8, p. 559–570, 2003.

CHIOSSONE, L., DUMAS, P.-Y., VIENNE, M., AND VIVIER, E. Natural killer cells and other innate lymphoid cells in cancer. **Nat. Rev. Immunol**, v. 18, 671–688, 2018.

CHIZHOV, A. O., DELL, A., MORRIS, H. R. A study of fucoidan from the brown seaweed *Chorda filum*. **Carbohydr. Res**, v. 320, 108–119, 1999.

CHO, M., LEE D., KIM J., YOU S., Molecular characterization and immunomodulatory activity of sulfated fucans from *Agarum cribrosum*, **Carbohydr Polym**, v. 113, 507–514, 2014.

CIUREA, S.O., HOFFMAN, R. Cytokines for the treatment of thrombocytopenia. **Semin Hematol**, v. 44, 166–182, 2007.

COLE, C. L.; JAYSON, G. C. Oligosaccharides as anti-angiogenic agents. **Expert Opin Biol Ther**, v. 8, p 351-362, 2008.

CONTURSI, A.; SACCO, A.; GRANDE, R.; DOVIZIO, M.; PATRIGNANI, P. Platelets as crucial partners for tumor metastasis: From mechanistic aspects to pharmacological targeting. **Cell. Mol. Life Sci**, v. 74, 3491–3507, 2017.

CUI, L., CHEN L., YANG G., et al., Structural characterization and immunomodulatory activity of a heterogalactan from *Panax ginseng* flowers, **Food Res. Int**, v. 140, 109859, 2020.

CUI, Y., LIU, X., LI, S., HAO, L., DU, J., GAO, D., KANG, LU, Q., J., Extraction, characterization and biological activity of sulfated polysaccharides from seaweed *Dictyopteris divaricata*, **Int. J. Biol. Macromo**, v. 117, 256–263, 2018.

CURTI, B. D.; FARIES, M. B. Recent advances in the treatment of melanoma. **The New England Journal of Medicine**, v. 384, n. 23, p. 2229–2240, 2021.

DENG, Z., WU N., SUO Q., WANG J., YUE Y., GENG L., ZHANG Q., Fucoidan, as an Immunostimulatory promotes M1 macrophage differentiation and enhances the chemotherapeutic sensitivity of capecitabine in colon cancer, **Int J Biol Macromo**, v. 222 562-572, 2022.

DENG, L. J., QI, M., LI, N., LEI, Y. H., ZHANG, D. M., AND CHEN, J. X., Natural products and their derivatives: promising modulators of tumor immunotherapy, **J. Leukoc. Biol**, v. 108, 493–508, 2020.

DENIAUD-BOUET, E.; HARDOUIN, K.; POTIN, P.; KLOAREG, B.; HERVE, C. A review about brown algal cell walls and fucose-containing sulfated polysaccharides: Cell wall context, biomedical properties and key research challenges. **Carbohydr. Polym.**, v. 175, 395–408, 2017.

DOMINGUES, B.; LOPES, J.; SOARES, P.; POPULO, H. Melanoma treatment in review. **ImmunoTargets and Therapy**, v. 7, p. 35–49, 2018.

DOVIZIO, M.; BALLERINI, P.; FULLONE, R.; TACCONELLI, S.; CONTURSI, A.; PATRIGNANI, P. Multifaceted Functions of Platelets in Cancer: From Tumorigenesis to Liquid Biopsy Tool and Drug Delivery System. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 21, 9585, 2020.

DUQUE G. A., AND DESCONTEAUX A., Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases, **Front Immunol**, v. 5, 491, 2014.

ENGSTRÖM A., ERLANDSSON A., DELBRO D., WIJKANDER J., Conditioned media from macrophages of M1, but not M2 phenotype, inhibit the proliferation of the colon cancer cell lines HT-29 and CACO-2, **Int J Oncol**, v. 44, 385-92, 2014.

FAN Y., WANG W., SONG W., et al., Partial characterization and anti-tumor activity of an acidic polysaccharide from *Gracilaria lemaneiformis*, **Carbohydr. Polym**, v. 88, 1313-1318, 2012.

FANG, Q., WANG, J.F., ZHA, X.Q., CUI, S.H., CAO, L., LUO, J.P., Immunomodulatory activity on macrophage of a purified polysaccharide extracted from *Laminaria japonica*, **Carbohydr. Polym**, v. 134, 66–73, 2015.

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

FARIAS, H. C.; POMIN, V. H.; VALENTE, A. P.; NADER, H. B., ROCHA, H. A. O.; MOURÃO, P. A. S. A preponderantly 4-sulfated, 3-linked galactan from the green alga *Codium isthmocladum*, **Glycobiology**, v. 18, 250–259, 2008.

FEDOROV S.N., ERMAKOVA S.P., ZVYAGINTSEVA T.N., et al., Anticancer and cancer preventive properties of marine polysaccharides: Some results and prospects, **Mar. Drugs**, v. 11, 4876–4901, 2013.

FENG, L., XIAO, X., LIU, J., WANG, J., ZHANG, N., BING, T., et al. Immunomodulatory effects of *Lycium barbarum* polysaccharide extract and its uptake behaviors at the cellular level. **Molecules**, v. 25, 1351, 2020.

FERREIRA, S.S., PASSOS, C.P., MADUREIRA, P., VILANOVA, M., COIMBRA, M.A. Structure-function relationships of immunostimulatory polysaccharides: A review, **Carbohydr. Polym**, v. 132, 378–396, 2015.

GAY, L.J.; FELDING-HABERMANN, B. Contribution of platelets to tumour metastasis. **Nat. Rev. Cancer**, v. 11, 123–134, 2011.

GD, B; GORDON, S. Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. **Nature**, v. 413, n. 6851, p. 36-7, 2001.

GOOSSENS, V.; GROOTEN, J.; DE VOS, K.; FIERS, W. Direct evidence for tumor necrosis factor-induced mitochondrial reactive oxygen intermediates and their involvement in cytotoxicity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, 8115-8119, 1995.

GRAY-SCHOPFER, V.; WELLBROCK, C.; MARAIS, R. Melanoma biology and new targeted therapy. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 851–857, 2007.

GRÜNDEMANN, C; REINHARDT, J. K.; LINDEQUIST, U. European medicinal mushrooms: Do they have potential for modern medicine? –An update. **Phytomedicine**, v. 66, p. 153131, 2020.

GUPTA P. K., RAJAN M. G. R., KULKARNI S., Activation of murine macrophages by G1-4A, a polysaccharide from *Tinospora cordifolia*, in TLR4/MyD88 dependent manner, **Int. Immunopharmacol**, v. 50, 168–177, 2017.

HAASE-KOHN, C.; WOLF, S.; HERWIG, N.; MOSCH, B.; PIETZSCH, J. Metastatic potential of B16-F10 melanoma cells is enhanced by extracellular S100A4 derived from RAW264.7 macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 446, n. 1, p. 143–148, 2014.

HANAHAHAN D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discov**, v. 12, 31-46, 2022

HANAHAHAN, D., & WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, 646-674, 2011.

HANAHAHAN, D., & WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, 57-70, 2000.

HAO, N-B.; LÜ, M-H.; FAN, Y-H.; CAO, Y-L.; ZHANG, Z-R.; YANG, S-M. "Macrophages in Tumor Microenvironments and the Progression of Tumors", **Journal of Immunology Research**, v. 2012, 948098, 2012.

HAROUN-BOUHEDJA, F. et al. Relation between sulfate groups and biological activities of fucans. **Thromb. Res.**, v. 100, p. 453-459, 2000.

HEVEL, J. M., WHITE, K. A., MARLETTA, M. A. Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase: Identification as a flavoprotein, **J. Biol. Chem.**, v. 266, 22789–22791, 1991.

HIRAI R, OGUCHI Y, SUGITA N, MATSUNAGA K, NOMOTO K. Enhancement of T-cell proliferation by PSK. **International journal of immunopharmacology.**, v. 15, 745–750. 1993.

HOLTKAMP, A.D.; KELLY, S.; ULBER, R.; LANG, S. Fucoidans and fucoidanases—Focus on techniques for molecular structure elucidation and modification of marine polysaccharides. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 82, 1–11, 2009.

HOU, C., CHEN, L., YANG, L., AND JI, X. An insight into anti-inflammatory effects of natural polysaccharides, **Int. J. Biol. Macromolecules**, v. 153, 248–255, 2020.

HSU, H.Y.; HWANG, P.A. Clinical applications of fucoidan in translational medicine for adjuvant cancer therapy. **Clin. Transl. Med.**, v. 8, 15, 2019.

HU, Y.; CHENG, S.C.; CHAN, K.T.; KE, Y.; XUE, B.; SIN, F.W.; ZENG, C.; XIE, Y. Fucoidin enhances dendritic cell-mediated T-cell cytotoxicity against NY-ESO-1 expressing human cancer cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v. 392, p 329–334, 2010.

HUANG, M.Y.; ZHANG, L.L.; DING, J.; LU, J.J. Anticancer drug discovery from Chinese medicinal herbs. *Chin. Med.* 13, 35, 2018. Huang M, Lu JJ, Ding J. Natural Products in Cancer Therapy: Past, Present and Future. **Nat Prod Bioprospect.**, v. 11, 5-13, 2021.

HUSSEIN, M. R. Tumour-associated macrophages and melanoma tumourigenesis: integrating the complexity. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 87, n. 3, p. 163–176, 2006.

Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: **INCA**; 2022.

JAYAWARDENA, T. U., NAGAHAWATTA, D. P., FERNANDO, I. P. S., KIM, Y. T., KIM, J. S., KIM, W. S., ... JEON, Y. J. A Review on Fucoidan Structure, Extraction Techniques, and Its Role as an Immunomodulatory Agent., **Marine Drugs**, v. 20, 755, 2022.

JEONG BE, KO EJ, JOO HG. Cytoprotective effects of fucoidan, an algae-derived polysaccharide on 5-fluorouracil-treated dendritic cells. **Food Chem Toxicol.**, v. 50, 1480-4, 2012.

JETTEN, N. et al. Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis in vivo. **Angiogenesis**, v, 17, 109–118, 2014.

JIANG S., YIN H., LI R., SHI W., MOU J., YANG J., The activation effects of fucoidan from sea cucumber *Stichopus chloronotus* on RAW264.7 cells via TLR2/4-NF- κ B pathway and its structure-activity relationship. **Carbohydr. Polym**, v. 270, 118353, 2021.

JIMÉNEZ-MEDINA E, BERRUGUILLA E, ROMERO I, ALGARRA I, COLLADO A, GARRIDO F, GARCIA-LORA A. The immunomodulator PSK induces in vitro cytotoxic activity in tumour cell lines via arrest of cell cycle and induction of apoptosis. **BMC cancer.**, v. 8, 78, 2008.

JOYCE, J. A.; POLLARD, J. W. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nature reviews.* **Cancer, London**, v. 9, n. 4, p. 239-52, apr. 2009.

KALAIIVANAN C, CHANDRASEKARAN M, VENKATESALU V. Screening of selected medicinal plants for *in vitro* antidermatophytic activity. **J Mycol Med**, v. 23, 247-54, 2013.

Kim G. Y., Choi G. S., Lee S. H., and Park Y. M., Acidic polysaccharide isolated from *Phellinus linteus* enhances through the up-regulation of nitric oxide and tumor necrosis factor- α from peritoneal macrophages, *Journal of Ethnopharmacology* 95, 69-76, 2004.

KISELEVSKIY, M.V., ANISIMOVA, N.Y., USTYUZHANINA, N.E., VINNITSKIY, D.Z., TOKATLY, A.I., RESHETNIKOVA, V.V., CHIKILEVA, I.O., SHUBINA, I.Z., KIRGIZOV, K.I., NIFANTIEV, N.E. Perspectives for the Use of Fucoidans in Clinical Oncology. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 23, 11821, 2022.

KLOC, M. (Ed.) *Macrophages Origin, Functions and Biointervention*; **Springer Nature: Cham**, Germany, v. 62, 2017.

KOBAYASHI H, MATSUNAGA K, OGUCHI Y. Antimetastatic effects of PSK (Krestin), a protein-bound polysaccharide obtained from basidiomycetes: an overview. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, v. 4, 275–281, 1995.

KOHCHI, C., INAGAWA, H., NISHIZAWA, T., G. SOMA, ROS and innate immunity., **Anticancer Res**, v. 29, 817–21, 2009.

KWAK-KIM J., BAO S., LEE S. K., KIM J. W., GILMAN-SACHS A., Immunological Modes of Pregnancy Loss: Inflammation, Immune Effectors, and Stress. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 72, 129-140, 2014.

LAMPIASI N, RUSSO R, ZITO F. The alternative faces of macrophage generate osteoclasts. **Biomed Res Int.**, v. 2016, 9089610, 2016.

LEIRO, J.M.; CASTRO, R.; ARRANZ, J.A.; LAMAS, J. Immunomodulating activities of acidic sulphated polysaccharides obtained from the seaweed *Ulva rigida* C. Agardh, **Int. Immunopharmacol**, v. 7, 879–888, 2007.

LEONARDI, G. C.; CANDIDO, S.; FALZONE, L.; SPANDIDOS, D. A.; LIBRA, M. Cutaneous melanoma and the immunotherapy revolution (Review). **International Journal of Oncology**, v. 57, n. 3, p. 609–618, 2020.

LEWIS, C. E.; POLLARD, J. W. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. **Cancer Research**, v. 66, n. 2, p. 605–612, 2006.

LI P., ZHANG X., CHENG Y., LI J., XIAO Y., ZHANG Q., ZONG A., ZHONG C., AND WANG F., Preparation and *in vitro* immunomodulatory effect of curdlan sulfate, **Carbohydrate Polymers**, v. 102, 852-861, 2014.

LI Y, WANG X, MA X, LIU C, WU J AND SUN C. Natural Polysaccharides and Their Derivates: A Promising Natural Adjuvant for Tumor Immunotherapy. **Front. Pharmacol**, v. 12, 621813, 2021.

LI, Q.; WANG, X.; WAN, Y.; HU, X.; LIU, J.; WANG, J. In vivo immunomodulatory activity of fucoidan from brown alga *Undaria pinnatifida* in sarcoma 180-bearing mice, **Journal of Functional Foods**, v. 103, 105486, 2023.

LIN, Y., QI, X., LIU, H., XUE, K., XU, S., TIAN, Z., The anti-cancer effects of fucoidan: A review of both *in vivo* and *in vitro* investigations. **Cancer Cell Int**, v. 20, 154, 2020.

LINS K.O.A.L., BEZERRA D.P., ALVES A. P. N. N., et al., Antitumor properties of a sulfated polysaccharide from the red seaweed *Champia feldmannii* (Diaz-Pifferer), **J Appl Toxicol**, v. 29, 20-26., 2009.

LIU, C. et al. A new concept on quality marker for quality assessment and process control of Chinese medicines. **Chinese Herbal Medicines**, v. 9, n. 1, p. 3-13, 2017

LIU, Q. M.; XU, S. S.; LI, L.; PAN, T. M.; SHI, C. I.; et al. *In vitro* and *in vivo* immunomodulatory activity of sulfated polysaccharide from *Porphyra haitanensis*, **Carbohydr. Polym**, v. 165, 189–196, 2017.

- LIU, R. X. et al. Chemokine (C-X-C motif) receptor 3-positive B cells link interleukin-17 inflammation to protumorigenic macrophage polarization in human hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, v. 62, 1779–1790, 2015.
- LIU, Z., XIE, Y.; XIONG, Y.; LIU, S.; et al. TLR 7/8 agonist reverses oxaliplatin resistance in colorectal cancer via directing the myeloid-derived suppressor cells to tumoricidal M1-macrophages, **Cancer Lett**, v. 469, 173–185, 2020.
- LIU, C. LI, J., MENG, F.Y., LIANG, S.X., DENG, R., LI, C.K., PONG, N.H., LAU, C.P., C HENG, S.W., YE, J.Y., CHEN, J.L., YANG, S.T., YAN, H., CHEN, S., CHONG, B.H., YAN G, M. Polysaccharides from the root of *Angelica sinensis* promotes hematopoiesis and thrombopoiesis through the PI3K/AKT pathway. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 10, 2–12, 2010.
- MAJETY, M. et al. A drug development perspective on targeting tumor-associated myeloid cells. **FEBS Journal**, v. 285, n. 4, p. 763–776, 2018.
- MANTOVANI, A.; VECCHI, A.; ALLAVENA, P. Pharmacological modulation of monocytes and macrophages. **Curr Opin Pharmacol**, v. 17, 38-44, 2014.
- MANTOVANI, A., A. SICA, S. SOZZANI, P. ALLAVENA, A. VECCHI AND M. LOCATI. “The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization.” **Trends Immunol**, v. 25, 677–686, 2004.
- MANTOVANI, A.; SOZZANI, S.; LOCATI, M.; ALLAVENA, P.; SICA, A. Macrophage polarization: Tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Trends in Immunology**, v. 23, n. 11, p. 549–555, 2002.
- MARCISCANO, A. E., & ANANDASABAPATHY, N. The role of dendritic cells in cancer and anti-tumor immunity. **Seminars in Immunology**, v. 52, 101481, 2021.
- MARKS, D. L.; OLSON, R. LO; FERNANDEZ-ZAPICO, M. E. Epigenetic control of the tumor microenvironment. **Epigenomics**, v. 8, n. 12, p. 1671–1687, 2016.
- MARTINEZ, F. O., & GORDON, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. **F1000 prime reports**, v. 6, 13, 2014.
- MCGOWAN, E.; LIN, Q.; MA, G.; YIN, H.; CHEN, S.; LIN, Y. PD-1 disrupted CAR-T cells in the treatment of solid tumors: Promises and challenges. **Biomed. Pharmacother.**, v. 121, 109625, 2020.
- MELL, L. K., SCHOMAS, D.A., SALAMA, J. K., DEVISETTY, K., AYDOGAN, B., MILLER, R. C., JANI, A. B., KINDLER, H. L., MUNDT, A. J., ROESKE, J. C., CHMURA, S. J. Association between bone marrow dosimetric parameters and acute hematologic toxicity in anal cancer patients treated with concurrent chemotherapy and intensity-modulated radiotherapy. **Int J Radiat Oncol Biol Phys.**, v. 70, 1431–1437, 2008.
- MENG, L. Z., FENG, K., WANG, L. Y., CHEONG, K. L., NIE, H., ZHAO, J., AND LI, S. P., Activation of mouse macrophages and dendritic cells induced by polysaccharides from a novel *Cordyceps sinensis* fungus UM01, **Journal of Functional Foods**, v. 9, 242-253, 2014.

MICHALAK, I.; CHOJNACKA, K. Algae as production systems of bioactive compounds. **Engineering in Life Sciences**, v. 15, n. 2, p. 160–176, 2015.

MICHEL, G.; TONON, T.; SCORNET, D.; COCK, J.M.; KLOAREG, B. The cell wall polysaccharide metabolism of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*. Insights into the evolution of extracellular matrix polysaccharides in Eukaryotes. **New Phytol.**, v. 188, 82–97, 2010.

MICHIELIN, O.; ATKINS, M. B.; KOON, H. B.; DUMMER, R.; ASCIERTO, P. A. Evolving impact of long-Term survival results on metastatic melanoma treatment. **Journal for ImmunoTherapy of Cancer**, v. 8, n. 2, p. 1–13, 2020.

MONCADA, M., PALMER, R. M. J., HIGGES, E. A., Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev**, v. 43, 109–142, 1991.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 12, p. 958–969, 2008.

MURRAY, P. J. et al. Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. **Immunity**, v. 41, n. 1, p. 14–20, 2014.

NAGAMINE, T., KADENA, K., TOMORI, M., NAKAJIMA, K., & IHA, M. Activation of NK cells in male cancer survivors by fucoidan extracted from *Cladosiphon okamuranus*. **Molecular and Clinical Oncology**, v. 12, 81–88, 2020.

NAKAMURA, T., SUZUKI, H., WADA, Y., KODAMA, T., DOI, T., Fucoidan induces nitric oxide production via p38 mitogen-activated protein kinase and NF- κ B-dependent signaling pathways through macrophage scavenger receptors, **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v. 343, 286–294, 2006.

NAMIKAWA, T.; FUKUDOME, I.; OGAWA, M.; MUNEKAGE, E; SHIGA, M.; MAEDA, H. et al. Clinical efficacy of protein-bound polysaccharide K in patients with gastric cancer undergoing chemotherapy with an oral fluoropyrimidine (S-1). **Euro. J. of Surg. Oncol**, v. 41, p. 795-800, 2015.

NEWMAN, D.J. & CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **J. Nat. Prod.**, v. 83, 770-883, 2020.

NORTHCOTT, J. M. et al. Fighting the force: Potential of homeobox genes for tumor microenvironment regulation. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1855, p. 248-253, 2015.

NOWAK, M.; KLINK, M. The role of tumor-associated macrophages in the progression and chemoresistance of ovarian cancer, **Cells**, v. 9, 1299, 2020.

NOY, R., POLLARD, J.W., Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy, **Immunity**, v. 41, 49–61, 2014.

OBLUCHINSKAYA, E.D.; POZHARITSKAYA, O.N.; SHIKOV, A.N. *In Vitro* Anti-Inflammatory Activities of Fucoidans from Five Species of Brown Seaweeds. **Mar. Drugs**, v. 20, 606, 2022.

OHNO R, YOKOMAKU S, WAKAYAMA K, SUGIURA S, YAMADA K. Blastoid transformation of human lymphocytes cultured with protein-bound polysaccharide preparation, PS-K, in vitro. **GANN Japanese Journal of Cancer Research.**, v. 67, p. 713–716, 1976.

ORMEROD M. G., CHEETHAM F. P. M., SUN X. M., Discrimination of apoptotic thymocytes by forward light scatter. **Cytometry**, v. 21, 300–304, 1995.

PAN, X. X.; TAO, J. H.; JIANG, S.; ZHU, Y.; QIAN, D.W., DUAN, J. A. Characterization and immunomodulatory activity of polysaccharides from the stems and leaves of *Abelmoschus manihot* and a sulfated derivative, **Int. J. Biol. Macromol**, v. 107, 9–16, 2018.

PARK, H.B.; HWANG, J.; LIM, S.M.; ZHANG, W.; JIN, J.O. Dendritic cell-mediated cancer immunotherapy with Ecklonia cava fucoidan. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 159, 941–947, 2020.

PARK, H.B.; LIM, S.M.; HWANG, J.; ZHANG, W.; YOU, S.; JIN, J.O. Cancer immunotherapy using a polysaccharide from *Codium fragile* in a murine model. **Oncoimmunology**, v. 9, 1772663, 2020.

PASTO, A., CONSONNI, F. M., AND SICA, A. Influence of innate immunity on cancer cell stemness. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 21, n. 9, 3352, 2020.

PATANKAR MS, OEHNINGER S, BARNETT T, WILLIAMS RL, CLARK GF. A revised structure for fucoidan may explain some of its biological activities. ,v. 268, n. 29, p 21770-6, 1993.

PAWAR, V. K.; SINGH, Y.; SHARMA, K.; SHRIVASTAV, A.; et al. Improved chemotherapy against breast cancer through immunotherapeutic activity of fucoidan decorated electrostatically assembled nanoparticles bearing doxorubicin, **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 122, 1100–1114, 2019.

PÉREZ-RECALDE, M. et al. *In vitro* and *in vivo* immunomodulatory activity of sulfated polysaccharides from red seaweed *Nemalion helminthoides*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 63, p. 38–42, 2014.

PIERCE, S., GEANES, E. S., AND BRADLEY, T. Targeting natural killer cells for improved immunity and control of the adaptive immune response. **Front. Cel. Infect. Microbiol**, v. 10, 231, 2020.

PONCE, N.M.A.; STORTZ, C.A. A Comprehensive and Comparative Analysis of the Fucoidan Compositional Data Across the Phaeophyceae. **Front. Plant Sci.**, v. 11, 556312, 2020.

PORTA C., RIBOLDI E., IPPOLITO A., et al., Molecular and epigenetic basis of macrophage polarized activation, **Semin. Immunol.**, v. 27, p. 237-248, 2015.

POVEA-CABELLO S., OROPESA-ÁVILA M., CRUZ-OJEDA P. DE LA, VILLANUEVA-PAZ M., DE LA MATA M., SUÁREZ-RIVERO J. M., ÁLVAREZ-CÓRDOBA M., VILLALÓN-GARCÍA I., COTÁN D., YBOT-GONZÁLEZ P., SÁNCHEZ-ALCÁZAR J. A., Dynamic Reorganization of the Cytoskeleton during Apoptosis: The Two Coffins Hypothesis, **Int. J. Mol. Sci.**, v. 18, 2393, 2017.

QUAIL, D. F.; JOYCE, J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. **Nature medicine**, New York, v. 19, n. 11, p. 1423-37, 2013.

RANGA, A., GJOREVSKI, N., LUTOLF, M. P., Drug discovery through stem cell-based organoid models. **Adv Drug Deliv Rev.**, v. 69-70, p. 19-28, 2014.

RASCHKE, W. C. et al. Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. **Cell**, v. 15, n. 1, p. 261-267, 1978.

RÉBÉ, C., GHIRINGHELLI, F. Cytotoxic effects of chemotherapy on cancer and immune cells: how can it be modulated to generate novel therapeutic strategies?. **Future Oncol.**, v. 11, n. 19, p. 2645-2654, 2015.

REN, Y., ZHENG, G., YOU, L., et al., Structural characterization and macrophage immunomodulatory activity of a polysaccharide isolated from *Gracilaria lemaneiformis*, **Journal of Functional Foods**, v. 33, 286-296., 2017.

RHEE, I. Diverse macrophages polarization in tumor microenvironment. **Arch. Pharm. Res.**, v. 39, 1588–1596, 2016.

ROCK, K. L., REITS, E., NEEFJES, J., Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class II Molecules, **Physiol. Behav.**, v. 176, p. 139-148, 2016.

ROGERS, T. L.; HOLEN, I. Tumour macrophages as potential targets of bisphosphonates. **Journal of translational medicine**, London, v. 9, p. 177, 2011.

ROSSOL M., HEINE H., MEUSCH U., QUANDT D., KLEIN C., SWEET M. J., HAUSCHILDT S., LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. **Crit Rev Immunol**, v. 31, 379–446, 2011.

RŐSZER, T. Understanding the mysterious M2 macrophage through activation markers and effector mechanisms. **Mediators Inflamm.**, v. 2015, 1–16, 2015.

SARKAR, S.; ALAM, M.A.; SHAW, J.; DASGUPTA, A.K. Drug delivery using platelet cancer cell interaction. **Pharm. Res.**, v. 30, 2785–2794, 2013.

SENDO, S.; SAEGUSA, J.; MORINOBU, A. Myeloid-derived suppressor cells in non-neoplastic inflamed organs, **Inflamm. Regen.** 38, n. 19, 2018.

SENTHILKUMAR, K.; MANIVASAGAN, P.; VENKATESAN, J.; KIM, S.K. Brown seaweed fucoidan: Biological activity and apoptosis, growth signaling mechanism in cancer. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 60, p. 366–374, 2013.

SETH, R.; MESSERSMITH, H.; KAUR, V.; et al. Systemic therapy for melanoma: ASCO guideline. **Journal of Clinical Oncology**, v. 38, n. 33, p. 3947–3970, 2020.

SHAPOURI-MOGHADDAM, A., MOHAMMADIAN, S., VAZINI, H., TAGHADOSI, M., ESMAEILI, S. A., MARDANI, F., SEIFI, B., MOHAMMADI, A. et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. **J. Cell. Physiol.**, v. 233, n. 9, 2018.

SHEMAMI, M.R., TABARSA, M., YOU, S.G., Isolation and chemical characterization of a novel immunostimulating galactofucan from freshwater *Azolla filiculoides*, **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 118, 2082–2091, 2018.

SHIBUTANI, M.; NAKAO, S.; MAEDA, K.; NAGAHARA, H., et al. The impact of tumor-associated macrophages on chemoresistance via angiogenesis in colorectal cancer, **Anticancer Res.**, v. 41, n. 9, p. 4447–4453, 2021.

SIEGEL, R.L., MILLER, K.D., JEMAL, A. Cancer statistics. **CA: Cancer J Clin.**, v. 70, p. 7-30, 2020.

SIMÕES, M. C. F.; SOUSA, J. J. S.; PAIS, A. A. C. C. Skin cancer and new treatments perspectives: A review. **Cancer Letters**, v. 357, n. 1, p. 8–42, 2015.

SINGH, B. P., SALAMA, A. K. Updates in Therapy for Advanced Melanoma. **Cancers (Basel)**, v. 8, n. 1, 17, 2016.

SKRIPTSOVA, A. V.; SHEVCCHENKO, N. M.; ZVYAGINTSEVA, T. N.; IMBS, T. I. Monthly changes in the content and monosaccharide composition of fucoidan from *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Phaeophyta). **J. Appl. Phycol.**, v. 22, p 79-86, 2010.

SOARES, P.A.G.; QUEIROZ, I.N.L.; POMIN, V.H. NMR structural biology of sulfated glycans, **J. Biomol. Struct. Dyn.**, v. 35, 1069–1084, 2017.

Sociedade Brasileira de Cirurgia Oncológica (SBCO), 2023. Disponível em: <https://sbco.org.br/atualizacoes-cientificas/melanoma-responde-por-4-entre-10-mortes-alerta-sbco/>

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

STOLTZFUS, C. R., SIVAKUMAR, R., KUNZ, L., OLIN POPE, B. E., MENIETTI, E., SPEZIALE, D., ... GERNER, M. Y. Multi-Parameter Quantitative Imaging of Tumor Microenvironments Reveals Perivascular Immune Niches Associated With Anti- Tumor Immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 12, n. 726492, 2021.

STOUT, R. D. et al. Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. **Journal of immunology**, v. 175, n. 1, p. 342–349, 2005.

SULLIVAN, R. J.; LORUSSO, P. M.; FLAHERTY, K. T. The intersection of immune-directed and molecularly targeted therapy in advanced melanoma: Where we have been, are, and will be. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 19, p. 5283–5291, 2013.

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

SUN, T. et al. Inhibition of Tumor Angiogenesis by Interferon- γ by Suppression of Tumor-Associated Macrophage Differentiation. **Oncology research**, v. 21, p. 227–35, 2014.

SURAYOT, U., LEE, J. H., KANONGNUCH, C., PEERAPORNPISAL, Y., PARK, W. J., YOU, S. G., Structural characterization of sulfated arabinans extracted from *Cladophora glomerata* Kützing and their macrophage activation. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 80, n. 5, 2016.

SWAT, W., IGNATOWICZ, L., KISIELOW, P., Detection of apoptosis of immature CD4+8+ thymocytes by flow cytometry. *J Immunol Methods*. 137, 79–87, 1991.

TABARSA M., DABAGHIAN E. H., YOU S., YELITHAO K., CAO R., REZAEI M., ALBOOFETILEH M., BITA S., The activation of NF-kB and MAPKs signaling pathways of RAW264.7 murine macrophages and natural killer cells by fucoidan from *Nizamuddiniazanardinii*. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 14, 56–67, 2020.

TABARSA M., YOU S. G., DABAGHIAN E. H., SURAYOT U., Water-soluble polysaccharides from *Ulva intestinalis*: Molecular properties, structural elucidation, and immunomodulatory activities. **J. Food Drug Anal.**, v. 26, 599–608, 2018.

TAKEDA, K.; TOMIMORI, K.; KIMURA, R.; ISHIKAWA, C.; NOWLING, T.K.; MORI, N. Anti-tumor activity of fucoidan is mediated by nitric oxide released from macrophages. **Int. J. Oncol.**, v. 40, p 251–260, 2012.

TAN, X. M., ZHOU, Y. Q., ZHOU, X. L. et al. Diversity and bioactive potential of culturable fungal endophytes of *Dyosma versipellis*; a rare medicinal plant endemic to China. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 5929, 2018.

TANIGUCHI, K. et al. Essential Role of Lysophosphatidylcholine Acyltransferase 3 in the Induction of Macrophage Polarization in PMA-Treated U937 Cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 116, n. 12, p. 2840–2848, dez. 2015.

TARIQ, M. et al. Macrophage Polarization: Anti-cancer Strategies to Target Tumor-associated Macrophage in Breast Cancer. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 18, p. 1-18, 2017.

TERUYA T., TAKEDA S., TAMAKI Y., TAKO M., Fucoidan Isolated from *Laminaria angustata* var. *longissima* Induced Macrophage Activation, **Biosci Biotechnol Biochem.**, v. 74, n. 9, 1960-2, 2010.

THAM, M.; TAN, K. W.; KEEBLE, J.; et al. Melanoma-initiating cells exploit M2 macrophage TGF β and arginase pathway for survival and proliferation. **Oncotarget**, v. 5, n. 23, p. 12027–42, 2014.

TOCACIU, S.; OLIVER, L.J.; LOWENTHAL, R.M.; PETERSON, G.M.; PATEL, R.; SHASTRI, M.; MCGUINNESS, G.; OLESEN, I.; FITTON, J.H. The Effect of Undaria pinnatifida Fucoidan on the Pharmacokinetics of Letrozole and Tamoxifen in Patients With Breast Cancer. **Integr. Cancer Ther.**, v. 17, 99–105, 2018.

VALENTE, J.; ZUZARTE, M.; GONÇALVES, M. J.; LOPES, M. C.; CAVALEIRO, C.; SALGUEIRO, L.; CRUZ, M. T. Antifungal, antioxidant and anti-inflammatory activities of *Oenanthe crocata* L. essential oil. **Food and Chemical Toxicology**, v. 62, p. 349-354, 2013.

VASCOSCELOS, A. G.; ARAÚJO, K. V. D.; SANTANA, L. DE A. B. Polissacarídeos Extraídos De Algas Marinhas E Suas Aplicações Biotecnológicas: Uma Revisão. **Revista Brasileira De Inovação Tecnológica em Saúde**, v. 5, n. 3, p. 27–51, 2015.

VILCEK, J.; LEE, T. H. Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. **J. Biol. Chem.**, v. 266, 7313-7316, 1991.

WALL, M. E, WANI MC. Camptothecin and taxol: discovery to clinic--thirteenth Bruce F. Cain Memorial Award Lecture. **Cancer Res.**, v. 55, n. 4, 753-760, 1995.

WALL, M. E. Camptothecin and taxol: discovery to clinic. **Med Res Rev.**, v. 18, n. 5, 299-314, 1998.

WANDERLEY, C.W., COLÓN D.F., LUIZ J.P.M., et al., Paclitaxel reduces tumor growth by reprogramming tumor-associated macrophages to an M1 profile in a TLR4-dependent manner, **Cancer Res.**, v. 78, 5891–5900, 2018.

WANG, L. X, ZHANG, S.X, WU, H. J., RONG, X.L., GUO, J. M2b macrophage polarization and its roles in diseases. **J Leukoc Biol.**, v. 106, n. 2, 1–14, 2018.

WANG, N., ZHAO, T., LI, S., LI, Y., WANG, Y., LI, D. et al., Fibroblast growth factor 21 ameliorates pancreatic fibrogenesis via regulating polarization of macrophages, **Exp. Cell Res.**, v. 382, 111457, 2019.

WANG, Y., SMITH, W., HAO, D., HE, B., KONG, L. M1 and M2 macrophage polarization and potentially therapeutic naturally occurring compounds, **Int Immunopharmacol.**, v. 70, 459-466, 2019.

WANG, J.; ZHANG, Q.; ZHANG, Z.; ZHANG, H.; NIU, X. Structural studies on a novel fucogalactan sulfate extracted from the brown seaweed *Laminaria japonica*. **Int. J. Biol. Macromol.** v. 2010, n. 47, 126–131, 2010.

WEINSTEIN, A. M.; STORKUS, W. J. Therapeutic Lymphoid Organogenesis in the Tumor Microenvironment. **Advances in cancer research**, New York, v. 128, p. 197- 233, 2015.

WU, C. J., YE H, T. P., WANG, Y. J., HU, H. F., TSAY, S. L., & LIU, L. C. Effectiveness of Fucoidan on Supplemental Therapy in Cancer Patients: A Systematic Review. **Healthcare** (Basel, Switzerland), v. 10, 923, 2022.

XUE, Q., YAN, Y., ZHANG, R., et al., Regulation of iNOS on immune cells and its role in diseases, **Int. J. Mol. Sci.**, v. 19, 3805, 2018.

YAMAGUCHI, Y., MINAMI, K., OHSHITA, A., KAWABUCHI, Y., NOMA, K., TOGE, T. Enhancing effect of PS-K on IL-2-induced lymphocyte activation: possible involvement of antagonistic action against TGF-beta. **Anticancer Res.**, v. 24, 639–648, 2004.

YANG, G., QU, Y., MENG, Y., et al., A novel linear 3-O-methylated galactan isolated from *Cantharellus cibarius* activates macrophages, **Carbohydr. Polym.**, v. 214, 34–43, 2019.

YANG, B., LIANG, M. H., ZHANG, Y. X., & SHEN, B. Z. Clinical application of a combination therapy of lentinan, multi electrode RFA and TACE in HCC. **Advances in Therapy**, v. 25, 787–794, 2008.

YANG, J.; YANG, X.; PAN, W.; WANG, M.; LU, Y.; ZHANG, J.; FANG, Z.; ZHANG, X.; JI, Y.; BEI, J.-X.; et al. Fucoidan-Supplemented Diet Potentiates Immune Checkpoint Blockage by Enhancing Antitumor Immunity. **Front. Cell Dev. Biol.**, v. 9, 733246, 2021.

YANG, M.; MA, C.; SUN, J.; SHAO, Q.; GAO, W.; ZHANG, Y.; LI, Z.; XIE, Q.; DONG, Z.; QU, X. Fucoidan stimulation induces a functional maturation of human monocyte-derived dendritic cells. **Int. Immunopharmacol.**, v. 8, p 1754–1760, 2008.

YAO, Y, XU XH, JIN L. Macrophage Polarization in Physiological and Pathological Pregnancy. **Front Immunol.**, v. 10, 792, 2019.

ZHANG, T.; HERLYN, D. Combination of active specific immunotherapy or adoptive antibody or lymphocyte immunotherapy with chemotherapy in the treatment of cancer, **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 58, 475–492, 2009.

ZHANG, W. et al. Fucoidan from *Macrocystis pyrifera* has powerful immune-modulatory effects compared to three other fucoidans. **Marine Drugs**, v. 13, n. 3, p. 1084-1104, 2015.

ZHANG, W., XU, W. & XIONG, S. Blockade of Notch1 signaling alleviates murine lupus via blunting macrophage activation and M2b polarization. **J. Immunol.**, v. 184, 6465–6478, 2010.

ZHANG, W.; HWANG, J.; YADAV, D.; AN, E.-K.; KWAK, M.; LEE, P.C.-W.; JIN, J.-O. Enhancement of Immune Checkpoint Inhibitor-Mediated Anti-Cancer Immunity by Intranasal TreMA Tnt of Ecklonia cava Fucoidan against Metastatic Lung Cancer. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 22, 9125, 2021.

ZHAO, Y.; ZHENG, Y.; WANG, J.; MA, S.; YU, Y.; WHITE, W.L.; YANG, S.; YANG, F.; LU, J. Fucoidan Extracted from *Undaria pinnatifida*: Source for Nutraceuticals/Functional Foods. **Mar. Drugs**, v. 16, 321, 2018.

ZHOU, Q., PENG, R. Q., WU, X. J., XIA, Q., HOU, J. H., DING Y., ZHOU Q. M., ZHANG X., PANG Z. Z., WAN D. S., ZENG Y. X., ZHANG X. S., The density of macrophages in the invasive front is inversely correlated to liver metastasis in colon cancer, **J. Transl. Med.**, v. 8, 13, 2010.

ZHU, L., ZHAO, Q., YANG, T., et al., Cellular metabolism and macrophage functional polarization, **Int. Rev. Immunol.**, v. 34, 82-100, 2015.