



UFPB

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

ÉSSIA DE ALMEIDA LIMA

**EFEITO IMUNOMODULADOR DAS FRAÇÕES
HEXANO:ACETATO E ACETATO DE ETILA DE
*Canistrocarpus cervicornis***

JOÃO PESSOA - PB

2016

ÉSSIA DE ALMEIDA LIMA

**EFEITO IMUNOMODULADOR DAS FRAÇÕES
HEXANO:ACETATO E ACETATO DE ETILA DE
*Canistrocarpus cervicornis***

Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito parcial para obtenção do grau de bacharel em biotecnologia na Universidade Federal da Paraíba - UFPB.

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas

JOÃO PESSOA - PB

2016

L732e Lima, Éssia de Almeida.
Efeito imunomodulador das frações hexano: acetato e acetato de etila de *Canistrocarpus cervicornis* / Éssia de Almeida Lima.- João Pessoa, 2016.
49f.
Orientadora: Sandra Rodrigues Mascarenhas
Trabalho de Conclusão de Curso - TCC (Graduação) - UFPB/CB
1. Biotecnologia. 2. Imunomodulação. 3. Óxido nítrico. 4. Citocinas. 5. Algas pardas.

UFPB/BC

CDU: 60(043.2)

ÉSSIA DE ALMEIDA LIMA

**EFEITO IMUNOMODULADOR DAS FRAÇÕES
HEXANO:ACETATO E ACETATO DE ETILA DE
*Canistrocarpus cervicornis***

Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito parcial para obtenção do grau de bacharel em biotecnologia na Universidade Federal da Paraíba - UFPB.

Aprovado em: ____ \ ____ \ ____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas - UFPB
(Orientadora)

Profa. Dra. Fabíola da Cruz Nunes - UFPB
(Prof^a. Examinadora)

Prof. Dr. Rafael de Almeida Travassos - UFPB
(Prof. Examinador)

Dedico este trabalho a Deus e minha família, meus pais Edna e Evandes e minhas irmãs Éssica e Edvânia, pelo incentivo e por serem sempre meu porto seguro.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida.

Aos meus pais, pelo amor, carinho e confiança em mim depositada. Eu agradeço principalmente pela educação que me foi dada, por terem me incentivado aos estudos desde pequena e por todos os momentos em que tiveram a paciência e sabedoria para me guiar pelos melhores caminhos. Vocês são a razão do meu esforço!

Às minhas irmãs, com quem dividi e ainda divido a mesa de estudos. Apesar das brigas, eu amo vocês!

Ao meu namorado, Rogério, pelo apoio, incentivo e por sempre me fazer acreditar que tudo será como eu sempre quis. Te amo!

Aos meus tios, primos e amigos, que contribuíram direta ou indiretamente não só para a realização desse trabalho, mas para a realização de um sonho.

Aos amigos da graduação, em especial à Deyse, Eduarda e Rephany, pela amizade sem limites, por estarem sempre presentes e por não me deixarem desistir nos momentos mais difíceis.

À minha professora e orientadora, Sandra Rodrigues Mascarenhas, pela confiança em me deixar fazer parte da sua família científica, pela amizade ao longo desses anos e por me permitir conhecer e fazer ciência. Muito obrigada!

A Luiz Henrique Agra, que foi essencial na realização deste trabalho. Obrigada por sua interminável paciência comigo!

Aos professores do Centro de Biotecnologia, que mesmo com todas as dificuldades enfrentadas desempenharam da melhor forma suas funções. Que cada um conquiste o espaço que merece!

Aos amigos do Laboratório de Imunofarmacologia, dentre eles, Anne, Julliane, José Marreiro, José Guilherme, Fagner, Raquel, Allysson, Adriano, Talissa, Giciane, Larrisa, Júlia e Jhon, local onde fiz grandes amigos e tive a oportunidade de adquirir diferentes conhecimentos. E aos que já não se encontram mais, mas que

foram de igual importância na minha formação científica, Jacqueline, Rachel, Talita e Priscila.

À professora Márcia Regina Piuvezam, por estar sempre presente no laboratório e contribuir com o que fosse preciso.

Aos Professores Doutores José Maria Barbosa-Filho e Josean Fachine Tavares, por terem cedido gentilmente as frações da alga que gerou esse trabalho, assim como a aluna Camila Silva de Figueiredo, que as obteve.

Aos membros da Banca Examinadora, a Profa. Dra. Fabíola da Cruz Nunes e o Prof. Dr. Rafael de Almeida Travassos por aceitarem fazer parte e contribuir para o enriquecimento desse trabalho.

À funcionária Mônica, pela humildade, conselhos, amizade e companhia ao longo dessa jornada.

A José Crispim Duarte, por sua dedicação ao biotério, pelas conversas e amizade.

À Universidade Federal da Paraíba (UFPB), por possibilitar a infraestrutura necessária para execução dos experimentos.

Muito obrigada!

“O sucesso é ir de fracasso em fracasso sem perder o entusiasmo.”

Winston Churchill

RESUMO

Canistrocarpus cervicornis é uma alga marinha marrom da família Dictyotaceae, que produz uma grande variedade de metabólitos secundários bioativos, principalmente diterpenos. Estudos farmacológicos têm demonstrado o potencial anti-inflamatório de *Dictyota menstrualis*, também pertencente à família Dictyotaceae. No entanto, o possível papel de *C. cervicornis* no processo inflamatório não tinha sido investigado anteriormente. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar, *in vitro*, os efeitos anti-inflamatórios desencadeados pelas frações hexano:acetato (H:A 85/15) e acetato de etila (AcOEt) de *C. cervicornis*. Inicialmente, macrófagos isolados da cavidade peritoneal de camundongos foram cultivados na concentração de 4×10^5 cels/poço. As células foram tratadas com as frações H:A 85/15 e AcOEt (10, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) na presença ou ausência de lipopolissacarídeo (LPS) a 1 $\mu\text{g/mL}$ por 24 h. Em seguida, os sobrenadantes foram recolhidos para determinação do óxido nítrico (NO) com o reagente de Griess e quantificação das citocinas (TNF- α , IL 6 e IL-10) por ELISA. A viabilidade celular foi determinada pelo método de MTT. Os dados foram analisados usando one-way ANOVA seguido pelo teste de Dunnett. Todos os procedimentos adotados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética do Centro de Biotecnologia (0301/13). Como esperado, o LPS induziu aumento da produção de NO e das citocinas IL-10, IL-6 e TNF- α . Este efeito foi inibido pelo tratamento com as frações H:A 85/15 e AcOEt. Do mesmo modo, os níveis de IL-10 também foram reduzidos pelo tratamento com ambas as frações, assim como os níveis da citocina pró-inflamatória IL-6. Por outro lado, os níveis de TNF- α não foram modificados pelo tratamento com as frações H:A 85/15 e AcOEt. O efeito anti-inflamatório de *C. cervicornis* não está relacionado com a morte celular, visto que as frações H:A 85/15 e AcOEt não foram capazes de interferir na viabilidade celular. Este trabalho demonstrou, que a alga *Canistrocarpus cervicornis* apresenta, *in vitro*, efeitos anti-inflamatórios relacionados com a inibição do óxido nítrico, IL 6 e IL-10.

Palavras-chave: Imunomodulação. Óxido nítrico. Citocinas. Algas pardas.

ABSTRACT

Canistrocarpus cervicornis is a marine brown seaweed from the Dictyotaceae family, which produces a wide variety of bioactive secondary metabolites, mostly diterpenes. Pharmacological studies have demonstrated an anti-inflammatory potential of *Dictyota menstrualis*, also belonging to the family Dictyotaceae. However, the possible role of *C. cervicornis* on inflammatory process had not been investigated previously. Thus, the aim of this study was to evaluate, *in vitro*, anti-inflammatory effects triggered by hexane:acetate (H:A 85/15) and ethyl acetate (EtOAc) fractions from *C. cervicornis*. Initially, macrophages isolated from mouse peritoneal cavity were cultured at a concentration of 4×10^5 cells/well. Cells were treated with H:A/85:15 or EtOAc fractions from *C. cervicornis* (10, 50 and 100 $\mu\text{g/mL}$) in absence or presence of lipopolysaccharide (LPS) at 1 $\mu\text{g/mL}$ for 24 h. Next, supernatants were harvested for nitric oxide (NO) determination with Griess reagent and cytokine quantification (TNF- α , IL-6 and IL-10) by ELISA. Cell viability was determined by MTT method. Data were analyzed using one-way ANOVA followed by Dunnett test. All procedures adopted in this study were approved by Ethics Committee of Biotechnology Center (0301/13). As expected, LPS induced increased NO production and cytokines IL-10, IL-6 and TNF- α levels. This effect was inhibited by H:A/85:15 or EtOAc fractions treatment. Similarly, IL-10 levels were also reduced by the treatment with both fractions as well as the IL-6 pro-inflammatory cytokine levels. On the other hand, TNF- α levels were not modified by H:A 85/15 and EtOAc treatments. The anti-inflammatory effect of *C. cervicornis* is not associated with cell death, since H:A 85/15 and EtOAc fractions were not able to affect cell viability. This study demonstrated that *Canistrocarpus Cervicornis* exhibits *in vitro* anti-inflammatory effects related to inhibition of nitric oxide, IL 6 and IL -10 cytokines.

Key words: Immunomodulation. Nitric oxide. Cytokines. Brown seaweed

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Divisão da família Dictyotaceae.....	16
Figura 2 – Fotografia de <i>Canistrocarpus cervicornis</i>	17
Figura 3 – Esquema de obtenção das frações de <i>C. cervicornis</i>	18
Figura 4 – Isoformas da NOS.....	23
Figura 5 – Avaliação da citotoxicidade das frações, <i>in vitro</i>	26
Figura 6 – Esquema de ELISA sanduíche.....	28

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Efeito das frações na viabilidade de macrófagos peritoneais..... 30

Gráfico 2 – Efeito das frações sobre os níveis das citocinas IL-6, IL-10 e TNF- α ...
..... 31

Gráfico 3 – Efeito das frações nos níveis de NO..... 33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt	Fração obtida com acetato de etila
ANOVA	Análise de variância
CCL2	Quimiocina ligante do motivo CC 2
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
DMSO	dimetilsufóxido
ELISA	Do inglês enzyme-linked immunosorbent assay
GM-CSF	Fator estimulante de colônias de granulócitos – monócitos
H:A 85/15	Fração obtida com 85% de hexano e 15 % de acetato
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
IFN-γ	Interferon alfa
IFN- β	Interferon beta
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-18	Interleucina 18
LPS	Lipopolissacarídeo
MTT	3-metil-[4-5dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
c-NOS	Óxido nítrico sintase constitutiva
i-NOS	Óxido nítrico sintase induzível
n-NOS	Óxido nítrico sintase neuronal
e-NOS	Óxido nítrico sintase endotelial
PBS	Salina tamponada com fosfato

SFB	Soro fetal bovino
TNF	Fator de necrose tumoral
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TNF- β	Fator de necrose tumoral beta
TLRs	Receptores do tipo Toll (Toll-like)
VCAM-1	Molécula de adesão celular-vascular-1

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Algas marinhas.....	15
1.2 Inflamação.....	18
1.2.1 Células e moléculas envolvidas na inflamação.....	19
2 OBJETIVOS.....	24
2.1 Objetivo geral.....	24
2.2 Objetivos específicos.....	24
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 Animais.....	25
3.2 Frações da alga.....	25
3.3 Avaliação da citotoxicidade das frações da alga.....	25
3.3.1 Cultura de macrófagos.....	26
3.3.2 Análise da viabilidade.....	27
3.4 Dosagem de citocinas no sobrenadante da cultura.....	27
3.5 Determinação dos níveis de NO.....	28
3.6 Análise estatística.....	28
4 RESULTADOS.....	30
4.1 Avaliação da citotoxicidade das frações em diferentes concentrações.....	30
4.2 Efeito das frações sobre os níveis de citocinas.....	30
4.3 Efeito das frações na produção de NO.....	33
5 DISCUSSÃO.....	34
6 CONCLUSÃO.....	37
REFERÊNCIAS.....	38

ANEXO A – Certidão de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)/UFPB.....	48
ANEXO B – Artigo a ser submetido para publicação na revista Natural Product Communications.....	49

1 INTRODUÇÃO

1.1 Algas marinhas

Os produtos naturais de origem marinha constituem uma excelente fonte de moléculas com atividades biológicas promissoras. Isso se deve não só pela grande variedade e número de espécies presentes nos habitats naturais, mas principalmente pela grande diversidade estrutural dos compostos produzidos e pelas propriedades medicinais inexploradas (NEWMAN; CRAGG; SANDER, 2003; NIELSEN, 2002).

O Brasil é um país continental que possui uma diversificada flora marinha endêmica que oferece grande possibilidade para o estudo químico de produtos naturais em busca de novas moléculas bioativas (BIANCO; TEIXEIRA; PEREIRA, 2010; KELECOM, 1997; PEREIRA; OLIVEIRA; SUDATI, 2011).

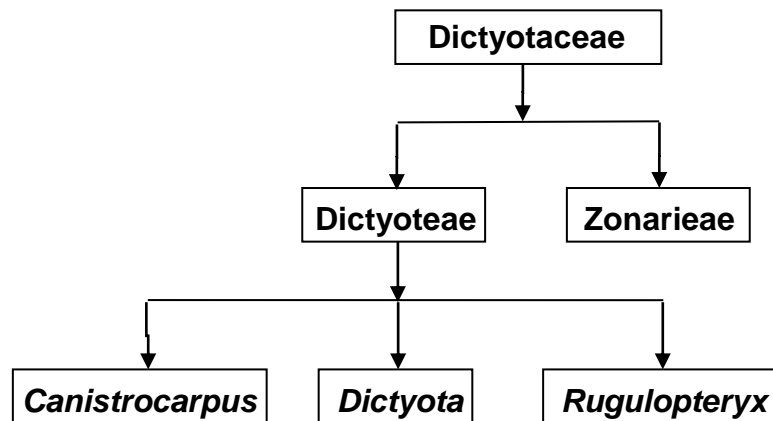
No contexto dos produtos naturais, encontram-se as algas marinhas, um grupo de organismos heterogêneos divididos em macroalgas, que ocupam a zona litoral; e microalgas, que podem habitar o litoral ou os oceanos. A classificação botânica, baseada em estrutura física, pigmentação, função e ciclo de vida, divide as macroalgas em três grandes grupos: Chlorophyta (algas verdes); Phaeophyta (algas pardas ou marrons) e Rhodophyta (algas vermelhas). As macroalgas produzem cerca de 20% de todos os produtos naturais marinhos descritos até o momento (BLUNT *et al.*, 2008; GARSON, 1989).

As algas pardas constituem o grupo mais abundante presente ao longo da costa do Brasil e estudos revelam que estas contribuem com grande parte da produção bibliográfica envolvendo substâncias produzidas por algas marinhas brasileiras (KELECOM, 1997). Até o momento, estas algas incluem uma infinidade de taxa incluindo 19 ordens, 62 famílias, 473 gêneros e cerca de 2000 espécies (GUIRY; GUIRY, 2014). Dentre as principais famílias de algas pardas, encontra-se a Dictyotaceae, que apresenta atualmente 18 gêneros (WYSOR; DE CLERCK, 2003).

Segundo De Clerck e colaboradores (2006) a família Dictyotaceae está dividida em duas tribos, a tribo Dictyoteae e a tribo Zonarieae, que são diferenciadas pelo crescimento do seu talo por uma ou várias células apicais, sendo que na tribo Dictyoteae o crescimento do talo é realizado por uma única célula apical. Ainda

baseando-se nesse estudo a Dictyoteae é composta de três únicos gêneros: *Canistrocarpus* De Paula et De Clerck, *Dictyota* Lamouroux e *Rugulopteryx* De Clerck et Coppejans (Figura 1).

Figura 1 – Divisão da família Dictyotaceae



Fonte: Autor, 2016.

A Dictyotaceae produz um número significativo de metabólitos secundários, especialmente terpenos. Estas substâncias atuam nas relações ecológicas como anti-incrustantes e como minimizadores de herbivoria. Além disso, elas possuem potencial para diversas atividades biológicas e servem como marcadores taxonômicos e biogeográficos para alguns gêneros ou famílias (BIANCO; TEIXEIRA; PEREIRA, 2010). Os diterpenos produzidos por essa família têm três tipos de esqueleto de carbono: xenicanos, dolabelanos e sesquiterpenos extendidos. Ademais, muitos membros da família produzem diterpenos cíclicos que são únicos na variedade estrutural de produtos marinhos (AMICO *et al.*, 1980; DURAN *et al.*, 1997; SUN *et al.*, 1983). Estudos fitoquímicos relatam o isolamento de mais de 300 diterpenos de aproximadamente 35 espécies desta família coletados ao redor do mundo (VALLIM *et al.*, 2005).

Dentro da família Dictyotaceae, destaca-se a espécie *Canistrocarpus cervicornis* (anteriormente classificada como *Dictyota pulchella*), que apresenta talo de cor marrom clara a ligeiramente pardo-esverdeada, podendo atingir até 11 cm de altura, ramos pouco espiralados e abertos (Figura 2) e produzem diterpenos monocíclicos, bicíclicos e tricíclicos (DE CLERCK *et al.*, 2006; TEIXEIRA *et al.*, 1986).

Figura 2 – Fotografia de *Canistrocarpus cervicornis*



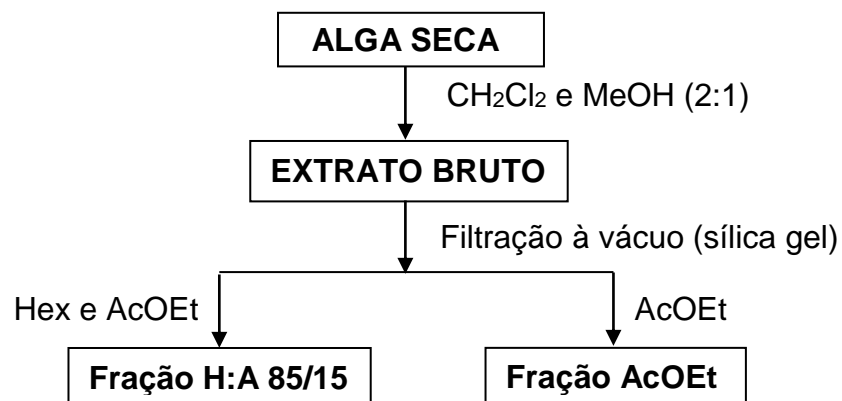
Fonte:<www.algaebase.org>

Os diterpenos e outros metabólitos secundários dessa alga apresentam várias atividades biológicas relatadas, tais como: antiviral (PEREIRA et al., 2004; KOISHI *et al*, 2012), anti-leishmania (DOS SANTOS *et al.*, 2011), anticoagulante e antiplaquetária (MOURA *et al.*, 2011), antioxidante (CAMARA *et al*, 2011), acaricida e repelente (BORN; BIANCO; CAMARA, 2012), vasorelaxante (QUEIROZ *et al.*, 2011), contra alguns dos efeitos do veneno da serpente *Bothrops jararaca*, como hemólise, proteólise e hemorragia (DOMINGOS *et al.* 2011) e atividade anticâncer (AYYAD *et al.* 2011).

Figueiredo (2013), em estudo com *C. cervicornis* obteve as frações hexano:acetato 85/15 (H:A 85/15) e acetato de etila (AcOEt). Os detalhes da metodologia de obtenção dessas frações estão disponíveis na tese intitulada “Contribuição à quimiotaxonomia e ficoquímica de *Canistrocarpus cervicornis* (kützing) De Paula & De Clerck (Dictyotaceae) coletada nos litorais paraibano e fluminense” do Programa de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos/CCS/UFPB, João Pessoa, PB. De forma resumida, após a coleta, as algas foram secas em local arejado e ao abrigo de luz, e então submetidas aos procedimentos de extração. Os materiais secos foram extraídos por maceração utilizando uma mistura de diclorometano (CH₂Cl₂) e metanol (MeOH) na proporção de 2:1 e a solução extrativa foi filtrada e concentrada com o auxílio de um evaporador, obtendo-se assim o

extrato bruto de *C. cervicornis*. O extrato bruto foi submetido à filtração à vácuo utilizando como fase estacionária sílica gel e como eluentes hexano (hex) e acetato de etila (AcOEt), puros ou em misturas binárias. A mistura de 85% de hexano com 15% de acetato de etila originou a fração H:A 85\15. Já a utilização apenas de acetato de etila originou a fração AcOEt (FIGUEIREDO, 2013) (Figura 3).

Figura 3 – Esquema de obtenção das frações de *C. cervicornis*



Fonte: Autor, 2016

1.2 Inflamação

A resposta imune é resultante de interações celulares e moleculares entre seus componentes que mantém/restabelecem a homeostasia. Essa resposta é desencadeada quando ocorre o reconhecimento de um agente lesivo, infeccioso ou não (JANEWAY; MEDZHITOV, 2002). A neutralização e a eliminação de forma satisfatória desses agentes culminam com a resolução da inflamação e restauração da homeostase dos tecidos. Dentro desse contexto, a inflamação é uma resposta fisiológica do organismo capaz de restaurar a integridade perdida (TROWBRIDGE; EMLING, 1996).

Uma resposta inflamatória excessiva ou desregulada juntamente com processos de reparo ineficientes resulta em falha da resolução da inflamação, o que é considerado como um componente crítico de muitas doenças crônicas humanas (FILEP, 2013).

Após o contato com um estímulo lesivo ocorre o desencadeamento da resposta inflamatória, observando-se uma fase inicial denominada fase aguda, que é

estereotipada e apresenta duração relativamente curta, perdurando por alguns minutos, horas ou por um ou dois dias. (ARSATI, *et. al.*, 1999). Fenômenos vasculares e celulares que ocorrem durante o desenvolvimento da fase aguda levam ao surgimento dos quatro sinais cardeais da inflamação: rubor, calor, tumor e dor, descritos por Cornelius Celsus (LUENGO, 2005). Rudolph Virchow adicionou o quinto sinal cardinal: *functio laesa* (perturbação da função) em 1858. Atualmente, está definido que os sinais clínicos da inflamação resultam da vasodilatação (calor e rubor); da estimulação dos terminais nervosos por mediadores (dor); do acúmulo de leucócitos e do aumento do fluido intersticial (tumor ou edema) e da inibição do reflexo muscular e rompimento da estrutura do tecido (perda da função) (ALLER *et al.*, 2007; SCOTT *et al.*, 2004).

A inflamação aguda, caracterizada principalmente pela vasodilatação, exsudação de líquido plasmático rico em proteínas e migração de células para o local da injúria é fisiologicamente importante tanto na defesa do hospedeiro como na reparação tecidual, porém, se esse processo é exacerbado pode levar à lesão tecidual excessiva e evoluir para um processo crônico (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

A inflamação crônica é caracterizada por apresentar maior tempo de duração e estar histologicamente associada à presença de linfócitos, de macrófagos, proliferação de vasos sanguíneos, fibrose e necrose tecidual (FUJIWARA; KOBAYASHI, 2005).

1.2.1 Células e moléculas envolvidas na inflamação

A resposta inflamatória inclui a participação de vários tipos celulares, a exemplo dos neutrófilos, monócitos, macrófagos, mastócitos, linfócitos, células dendríticas, células endoteliais, entre outras. As primeiras células a chegarem ao tecido lesado são os neutrófilos e, logo após, os macrófagos teciduais. Estas células são recrutadas ao sítio inflamatório por quimiotaxia, existindo diferentes agentes quimiotáticos para cada tipo celular (ABBAS; JANEWAY, 2000).

Os neutrófilos representam, aproximadamente, 50 a 70 % dos leucócitos no sangue periférico humano. Estas células circulam por poucas horas antes de morrerem e na presença de sinais específicos deixam de circular e migram para os

tecidos inflamados, sendo as primeiras que extravasam para os sítios inflamatórios (CHOI; SANTOSO; CHAVAKIS, 2009).

Os monócitos constituem de 5 a 10 % dos leucócitos periféricos humanos circulantes e têm origem na medula óssea. Durante uma resposta inflamatória sua produção é aumentada, ocorrendo migração dessas células para o tecido inflamado, onde se diferenciam em macrófagos, mediante a presença de estímulos (CHOI; SANTOSO; CHAVAKIS, 2009; VAN FURTH, 1985). A migração envolve aderência ao endotélio, transmigração por entre as células endoteliais e passagem através de estruturas subendoteliais, processo que depende de moléculas de adesão (TAKEMURA; WERB, 1984).

Além dos macrófagos derivados dos monócitos sanguíneos, há uma população de células residentes que recebe denominações específicas, dependendo do tipo de tecido onde são encontradas. No fígado, os macrófagos são denominados de células de Kupffer; no tecido ósseo, eles formam os osteoclastos e no sistema nervoso central, eles compreendem a micróglia (GORDON, 1995). Os que residem nos tecidos produzem baixos níveis de mediadores inflamatórios, entretanto, quando estes são expostos a sinais ativadores como Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), Interferon gama (IFN- γ), fator estimulante de colônias de granulócitos - monócitos (GM-CSF), lipopolissacarídeos bacterianos (LPS) assim como proteínas da matriz extracelular estas células tornam-se ativadas (FUJIWARA; KOBAYASHI, 2005).

Ao serem ativados, os macrófagos mudam de características, aumentando de tamanho, a quantidade de grânulos, a capacidade de aderir ao vidro, de espalhar, de produzir óxido nítrico e radicais livres e de secretar enzimas (principalmente proteases). Estas mudanças aumentam sua atividade microbicida e tumoricida e são muito bem observadas, *in vitro* e *in vivo* (MOSSER, 2003; PEREIRA *et al.*, 1994).

As principais funções dos macrófagos no processo inflamatório são: fagocitose, apresentação de antígenos e imunomodulação por meio da produção de várias citocinas e fatores de crescimento, desempenhando papéis fundamentais na iniciação, manutenção e resolução do processo inflamatório (WILLOUGHBY *et al.*, 2000).

Uma grande variedade de tipos celulares produz proteínas, denominadas citocinas, capazes de modular a função da mesma célula que a produziu (controle autócrino) ou de outros tipos celulares (controle parácrino) (CHAPLIN, 2010). A atuação dessas moléculas se inicia em receptores específicos presentes na

superfície da célula-alvo e sinais externos regulam a expressão desses receptores e a resposta das células a essas substâncias. A resposta celular, mediada por muitas citocinas, consiste em induzir mudanças na expressão gênica das células alvo, que resultam na expressão de novas funções e às vezes, na proliferação dessas células (ABBAS, *et al.*, 2000).

As citocinas produzidas durante o processo inflamatório dependem da natureza do agente causador. Assim, a presença de patógenos bacterianos ou das substâncias zimosan, carragenina e lipopolissacarídeo são detectadas por receptores celulares do sistema imune inato, como os TLRs, que são expressos em macrófagos residentes e induzem a produção de quimiocinas (por exemplo, CCL2, CXCL1) e citocinas inflamatórias (por exemplo, IL-1, IL-6 e TNF- α) (MEDZHITOV 2008; TOGBE *et al.*, 2006). As citocinas inflamatórias são sintetizadas por vários tipos celulares, majoritariamente mastócitos e macrófagos. Essas citocinas possuem diversas funções na resposta inflamatória, tais como a ativação do endotélio e de leucócitos, além da indução da resposta de fase aguda (HUME, 2006).

O fator de necrose tumoral (TNF) foi originalmente identificado como uma substância presente no soro de animais tratados com LPS bacteriano (endotoxina), que causa necrose de tumor, *in vivo* (ABBAS *et al.*, 2000). Duas proteínas homólogas representam o TNF, TNF- α e TNF- β , sendo estas primariamente derivadas de fagócitos mononucleares e linfócitos, respectivamente (BORISH; STEINKE, 2003; SIQUEIRA JÚNIOR; DANTAS, 2000).

O TNF- α é produzido por células mononucleares e polimorfonucleares e está envolvido na patogênese de diversas doenças exercendo potentes efeitos inflamatórios, como a ativação de neutrófilos e fagócitos mononucleares; aumento da permeabilidade vascular; indução da produção de fatores de crescimento para fibroblastos; angiogênese (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004) e indução da expressão de moléculas de adesão no endotélio (ICAM-1 e VCAM-1) (EL ALWANI *et al.*, 2006). A secreção de TNF- α em associação com a secreção de IL-1 β induz a produção e liberação em cascata de várias outras citocinas pró-inflamatórias secundárias, incluindo IL-6, IL-18, IL-12 (FEGHALI; WRIGHT, 1997; GOLDKIND, 2006; WITKAMP; MONSHOUWER, 2000).

A Interleucina6 (IL-6) pode ser produzida por vários tipos celulares, sendo as células B, T e monócitos suas principais fontes. Os estímulos para sua síntese são IL-1, LPS e TNF (ROTHERWELL, 1991). É uma citocina importante em respostas

inflamatórias agudas apresentando efeitos locais e sistêmicos, entre eles a indução da síntese hepática de diversos outros mediadores inflamatórios e também possui ação no hipotálamo induzindo a febre (ABBAS; LICHTMAN, 2012).

A interleucina 10 (IL-10) é uma citocina pleiotrópica (ou seja, de vários efeitos) produzida por monócitos, macrófagos e linfócitos (MOSMANN *et al.*, 1994). Destaca-se como potente imunossupressora por deprimir a ativação de células mononucleares prevenindo a produção de mediadores da inflamação (DE WAAL *et al.*, 1991; FIORENTINO *et al.*, 1991); deprimir a apresentação de antígenos (DE WAAL *et al.*, 1991) e a expressão de moléculas coestimuladoras, *in vitro* (WILLEMS *et al.*, 1994).

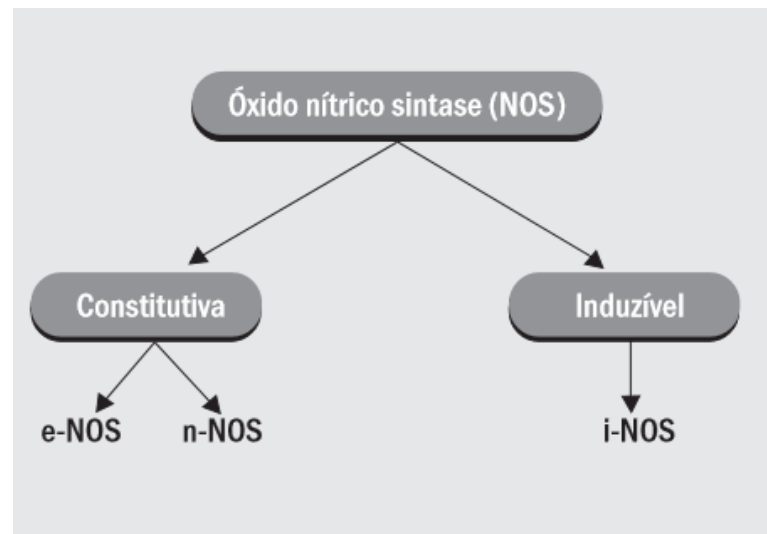
O óxido nítrico (NO) é uma das menores e mais simples moléculas biossintetizadas (MORRIS; BILLIAR, 1994). É um radical livre, gasoso, inorgânico, incolor, que possui sete elétrons do nitrogênio e oito do oxigênio, tendo um elétron desemparelhado e possuindo tempo de meia-vida curto (BECKMAN; KOPPENOL, 1996).

O NO é sintetizado em grandes quantidades durante o processo inflamatório. Segundo DUSSE, VIEIRA E CARVALHO (2003), a síntese do NO ocorre pela ação da enzima NO-sintase (NOS), que catalisa a reação de oxidação de um dos nitrogênios do aminoácido L-arginina, convertendo-o em L-citrulina. A NOS possui duas categorias que agrupam várias isoformas, a NOS constitutiva (c-NOS), dependente de íons cálcio (Ca^{++}) e de calmodulina, que está envolvida na sinalização celular, e a NOS induzível (i-NOS), produzida por macrófagos e outras células ativadas por citocinas (MARLETTA, 1994; MONCADA *et al.*, 1991).

A NOS constitutiva está presente normalmente nos neurônios, NOS neuronal (n-NOS) e no endotélio, a NOS endotelial (e-NOS), sendo que o NO produzido pelas células endoteliais tem grande importância no processo de relaxamento vascular. Acredita-se que a NOS induzível possa ser produzida por qualquer célula do organismo, desde que se tenha um estímulo apropriado (BARRETO; CORREIA; MUSCARÁ, 2005; CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002) (Figura 4).

A NOS constitutiva, em situações fisiológicas, libera NO em pequenas quantidades; Já a e-NOS pode aumentar a produção de NO se houver aumento da resistência vascular (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003).

Figura 4 – Isoformas da NOS



Fonte: Dusse, Vieira e Carvalho, 2003

A NOS induzível é expressa durante a inflamação em vários tipos celulares, incluindo macrófagos, e produz grandes quantidades de NO (DAVIS *et al.*, 2001, LOWENSTEI; PADALCO, 2004). O NO produzido por macrófagos ativados, desenvolve uma reação inflamatória por levar a um aumento na síntese de mediadores pró-inflamatórios, como citocinas e derivados do ácido araquidônico e por sua capacidade em ativar a enzima ciclo-oxigenase 2 (COX-2) (DUDHGAONKAR *et al.*, 2004).

A última fase da inflamação é a resolução, que é crítica para limitar danos colaterais ao hospedeiro (SERHAN; SAVILL, 2005). Falhas no processo de resolução da inflamação aguda podem contribuir para o desenvolvimento de inflamação crônica e disfunção tecidual (ISOBE; KATO; ARITA, 2012). Desativar a síntese de mediadores pró-inflamatórios, diminuir o acúmulo de células inflamatórias e remover detritos sem iniciar uma resposta autoimune são fatores essenciais para que ocorra a resolução do processo inflamatório. Assim, as células fagocíticas mononucleares, como os macrófagos residentes e recrutados são as células primordialmente responsáveis pela restauração da homeostase do tecido inflamado (GOMEZ-MUÑOZ *et al.*, 2013).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar o efeito imunomodulador das frações hexano:acetato (H:A 85/15) e acetato de etila (AcOEt) da alga marinha *Canistrocarpus cervicornis* em macrófagos peritoneais murinos, *in vitro*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade das frações H:A 85/15 e AcOEt em diferentes concentrações;
- Avaliar a produção das citocinas TNF- α , IL-6 e IL-10;
- Avaliar a produção do óxido nítrico (NO).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss albino* fêmeas com idade de 6-8 semanas e peso entre 25-30 g. Os animais eram mantidos sob controle alimentar com uma dieta balanceada a base de ração tipo *pellets* (Purina), com livre acesso à água, em uma sala com ventilação e temperatura (21 ± 1 °C) constantes e controladas e ciclos claro/escuro de 12h. Os animais foram fornecidos pelo biotério Prof. Thomas George do Centro de Biotecnologia (CBiotec) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Os animais eram manuseados conforme o protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Utilização Animal (CEUA) da UFPB sob o número 0301/13 (ANEXO A).

3.2 Frações da alga

As frações H:A 85/15 e AcOEt da alga *C. cervicornis* foram disponibilizadas gentilmente pela equipe dos professores doutores José Maria Barbosa-Filho e Josean Fechine Tavares do Laboratório de Fitoquímica do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM). Estas frações foram preparadas a partir da solubilização em dimetilsulfóxido (DMSO), para sua utilização nas concentrações de 10, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$. A concentração máxima de DMSO utilizada foi de 0,5%.

3.3 Avaliação da citotoxicidade das frações da alga

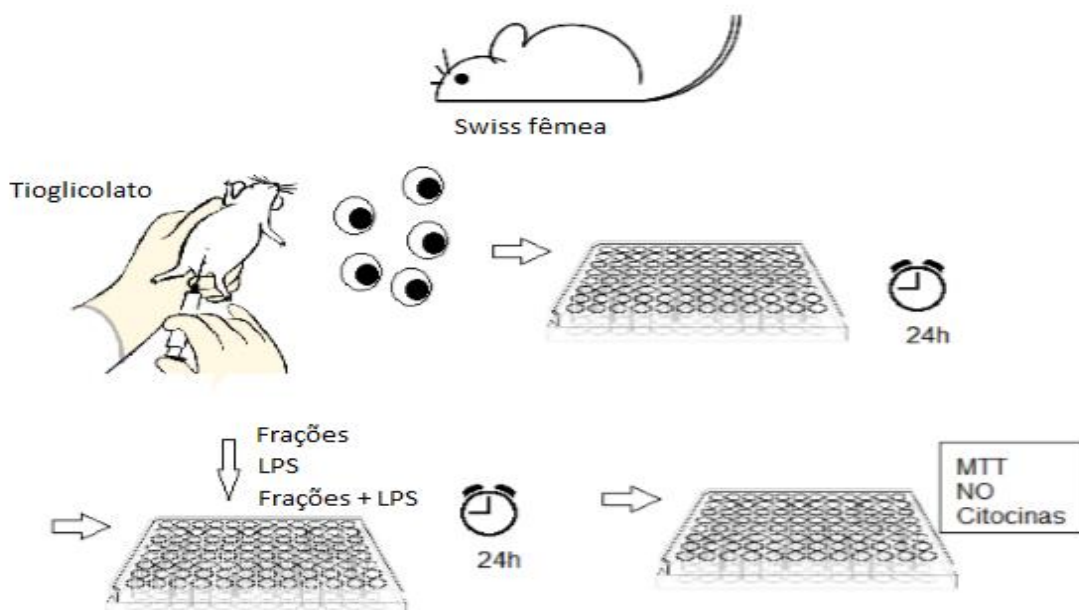
Para determinar a toxicidade das frações da alga foram utilizados macrófagos peritoneais de camundongos *Swiss albino*. Para isso, os animais foram estimulados previamente com uma injeção intraperitoneal de 2 mL de tioglicolato (Sigma-Aldrich) a 4%. Quatro dias após o procedimento, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e a cavidade peritoneal foi lavada com 8 mL de PBS (salina tamponada com fosfato) gelado. A suspensão de células obtida a partir da lavagem peritoneal foi centrifugada a 1500 rpm durante 5 minutos a 4 ° C. O sobrenadante foi rejeitado e o pellet foi ressuspensão em 1 mL de meio RPMI-1640

completo (Gibco) (estreptomicina: 10 mg / mL, penicilina: 6 mg / ml, e canamicina: 2 mg / mL), suplementado com 10% de soro fetal de bovino (SFB) (Gibco). A viabilidade celular foi determinada utilizando o corante Azul de Trypan (Merck) com o auxílio de uma câmara de Neubauer (hemocitômetro L.OptikATC-111.020).

3.3.1 Cultura de macrófagos

As células peritoneais foram semeadas em placas de 96 poços a uma concentração de 4×10^5 células/poço em um volume final de 200 μ L e incubados durante 24 h com meio de cultura suplementado com SFB em estufa de CO₂ (atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C). Em seguida, as células não aderentes foram removidas por aspiração. As células remanescentes foram ainda incubadas durante 24 h com meio RPMI completo suplementado ou não com lipopolissacarídeo (LPS de *Escherichia coli* – Sigma Aldrich) na concentração de 1 μ g/mL, na presença e ausência de diferentes concentrações das frações da alga (10, 50 e 100 μ g/mL). Após 24 horas de cultura, o sobrenadante foi recolhido para quantificar os níveis de NO e citocinas (Figura 5).

Figura 5 – Avaliação da citotoxicidade das frações, *in vitro*



Fonte: Modificado de Oliveira, 2014.

3.3.2 Análise da viabilidade

A viabilidade celular foi determinada através do método de MTT (brometo de 3-metil-[4-5dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio) descrito por Mosmann (1983). Este método se baseia na redução do MTT, um sal de coloração amarela e solúvel em água, a formazan, sal de coloração arroxeadada e insolúvel em água, pela ação de desidrogenases mitocondriais. Sendo assim, quanto maior a intensidade da coloração roxa maior será a viabilidade.

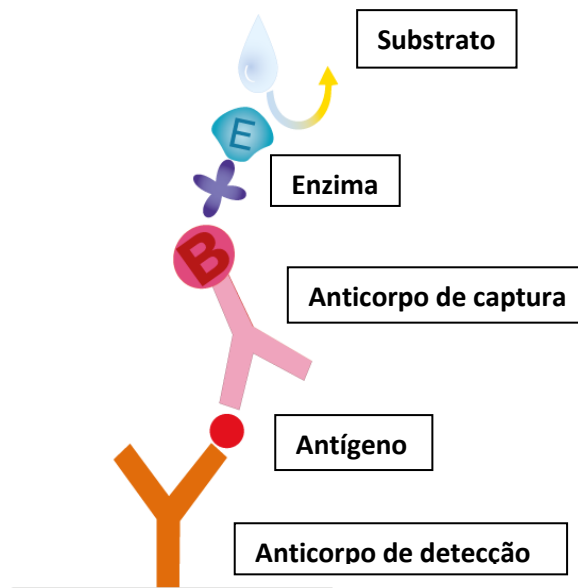
Após coleta do sobrenadante foi adicionado à placa 90 µL de meio RPMI e 10µL de MTT na concentração de 5 mg/mL e a mesma foi incubada por 4 h em estufa de CO₂. Após isso, o sobrenadante foi removido e adicionou-se 100µL de DMSO para dissolver os cristais de formazan formados. A viabilidade celular foi quantificada pela medida da densidade óptica no comprimento de onda de 570 nm, determinada por um leitor de microplacas (Spectramax 190 – Molecular Device).

3.4 Dosagem de citocinas no sobrenadante da cultura

Para quantificação das citocinas TNF- α , IL- 6 e IL-10 foi utilizado o Ensaio Imunoenzimático (ELISA). Este é um dos métodos imunológicos mais utilizados para quantificar a concentração de antígenos e anticorpos, por apresentar grande sensibilidade e especificidade (GOLDSBY; KINDT; OSBORNE, 2000).

Existem diversos tipos de ELISA, e nesse trabalho foi utilizado o ELISA sanduíche. Nesse método, o anticorpo para um antígeno específico, chamado de anticorpo de captura é, inicialmente, adsorvido no poço da placa de 96 poços. Depois, a amostra com o antígeno (sobrenadante da cultura) é adicionada e se liga a esse anticorpo. Logo após, é adicionado outro anticorpo específico para o antígeno chamado anticorpo de detecção. Após isso, é adicionada a enzima, que irá reagir com o substrato adicionado posteriormente, gerando cor (Figura 6). A intensidade da coloração é proporcional à quantidade de antígeno presente. A absorbância de 450 nm foi determinada utilizando um leitor de microplacas (Spectramax 190 – Molecular Device).

Figura 6 – Esquema de ELISA sanduíche



Fonte: <<https://mundobiomedicosp.wordpress.com/2014/10/16/teste-elisa-enzyme-linked-immunosorbent-assay/>>

3.5 Determinação dos níveis de NO

A produção de NO foi quantificada, *in vitro*, pela dosagem do seu produto de degradação mais estável, o nitrito, pelo método colorimétrico indireto conhecido como Reação de Griess (GREEN *et al.*, 1982). O reagente de Griess é constituído por 0,1% naftiletilenodiamino e 1% sulfonamina p-aminobenzeno em ácido ortofosfórico 5%. Para esse ensaio foram adicionados 50 µL de reagente de Griess a 50 µL dos sobrenadantes obtidos da cultura com macrófagos peritoneais deixando reagir durante 10 minutos à temperatura ambiente. A absorbância de 540 nm foi determinada utilizando um leitor de microplacas (Spectramax 190 – Molecular Device). Os resultados em µmoles foram determinados por comparação com a curva padrão (realizada com nitrito de sódio nas concentrações de 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 e 1,5 µM).

3.6 Análise estatística

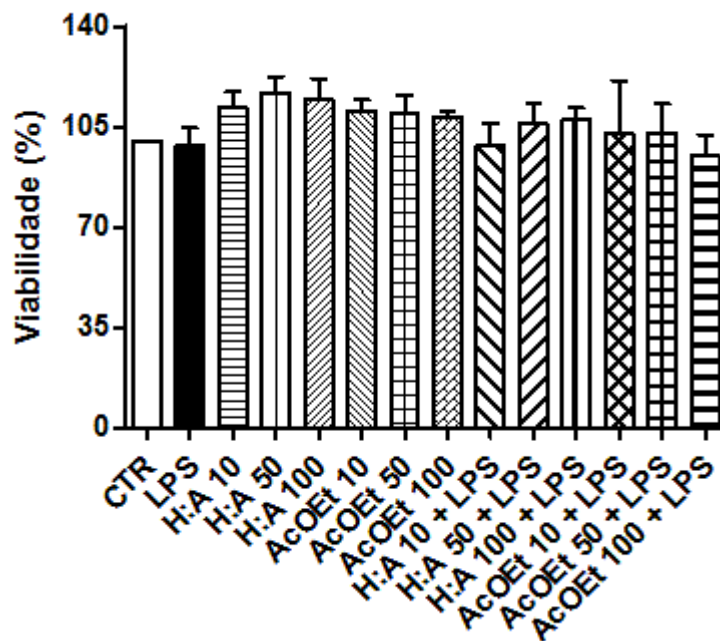
Os resultados dos ensaios foram analisados por one-way ANOVA seguido do pós-teste de Dunnett. As diferenças entre os grupos eram consideradas significativas quando os valores de $p < 0,05$. Os dados foram analisados utilizando o programa GraphPadPrism versão 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da citotoxicidade das frações em diferentes concentrações

O tratamento com as frações H:A 85/15 e AcOEt na ausência ou presença de LPS não alterou a viabilidade dos macrófagos peritoneais em nenhuma das concentrações estudadas quando em comparação ao grupo controle (meio de cultura). O resultado do ensaio de citotoxicidade está expresso no gráfico 1.

Gráfico 1: Efeito das frações na viabilidade de macrófagos peritoneais



O gráfico representa a densidade óptica de absorvância do formazan de acordo com os diferentes grupos de tratamento e é representativo de 3 experimentos em duplicata. CTR=controle; LPS=Lipopolissacarídeo; H:A 10, 50 e 100=Fração hexano:acetato 85/15 nas concentrações de 10, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente; AcOEt 10, 50 e 100=Fração acetato de etila nas concentrações de 10, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente.

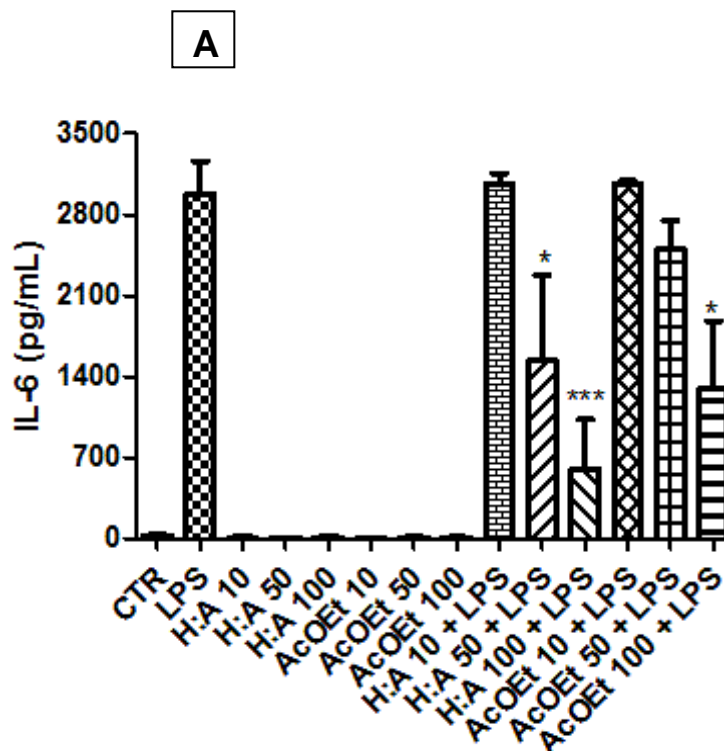
4.2 Efeito das frações sobre os níveis de citocinas

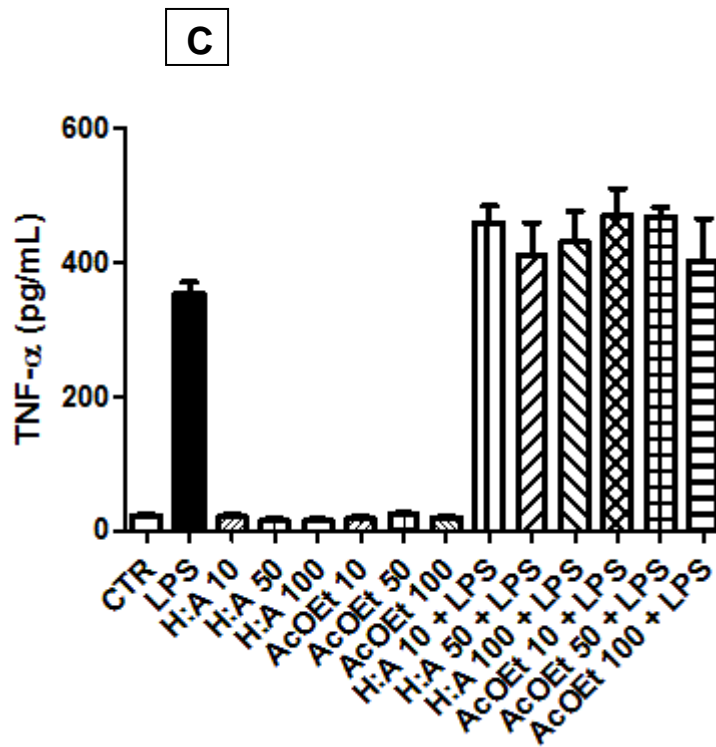
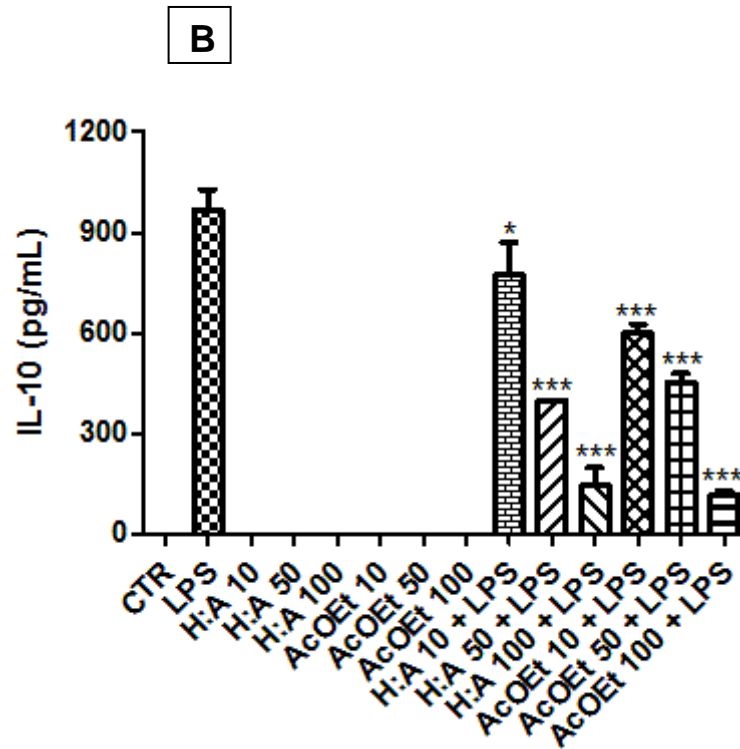
Como esperado, os macrófagos estimulados com LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) apresentaram aumento dos níveis das citocinas em estudo quando comparado ao

grupo controle (meio de cultura). O tratamento apenas com as frações H:A 85/15 e AcOEt (10, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) não alterou os níveis de produção basal das citocinas.

O tratamento com H:A 85/15 (50 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$) reduziu os níveis de IL-6 (48,5% e 79,9%) e IL-10 (58,9% e 85,2%) na presença de LPS (Gráfico 2A-2B). Além disso, esta mesma fração em sua menor concentração (10 $\mu\text{g/mL}$) inibiu em 20,1% os níveis de IL-10 (Gráfico 2B). Por outro lado, o tratamento com a fração AcOEt (10, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) reduziu os níveis de IL-10 (38,1%, 53,4% e 88,0%, respectivamente) de um modo dependente da concentração (Gráfico 2B), e níveis de IL-6 (56,8%) apenas na maior concentração (100 $\mu\text{g/mL}$) (Gráfico 2A). Além disso, o tratamento com ambas as frações não modula os níveis de TNF- α (Gráfico 2C).

Gráfico 2: Efeito das frações sobre os níveis das citocinas IL-6, IL-10 e TNF- α



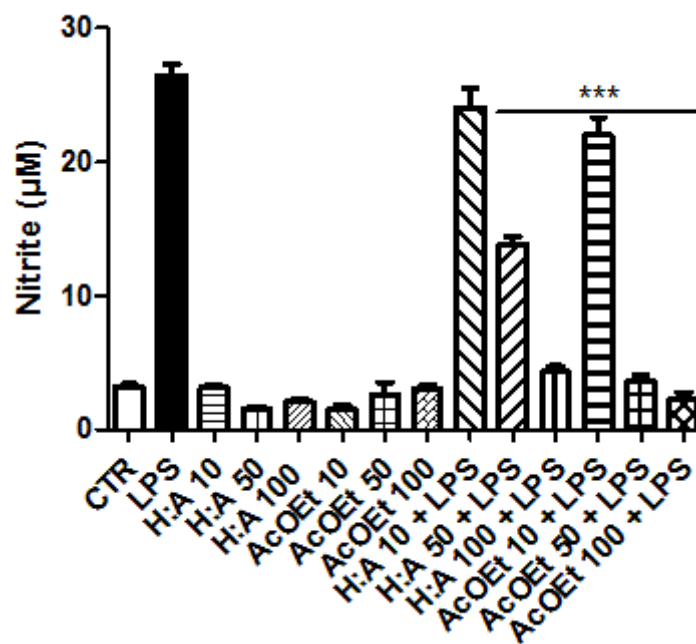


O gráfico representa as concentrações das citocinas de acordo com os grupos de tratamento. Os resultados foram expressos \pm EPM de pelo menos dois experimentos independentes em duplicata, e analisados utilizando o ANOVA seguido do pós-teste de Dunnett. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo LPS. CTR=controle; LPS=Lipopolissacarídeo; H:A 10, 50 e 100=Fração hexano:acetato 85/15 nas concentrações de 10, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente; AcOEt 10, 50 e 100=Fração acetato de etila nas concentrações de 10, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente.

4.3 Efeito das frações na produção de NO

Nos macrófagos peritoneais estimulados com LPS houve aumento da produção de NO, demonstrando que estas células foram ativadas e que o modelo é funcional. O tratamento com a fração H:A 85/15 (50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) reduziu os níveis de NO em 47.6% e 83.7 nos macrófagos estimulados com LPS. Já para a fração AcOEt (10, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a redução foi de 16.9%, 86.5%, e 91.1%, respectivamente. Além disso, o tratamento apenas com as frações não alterou os níveis de produção basal do NO (Gráfico 3).

Gráfico 3: Efeito das frações nos níveis de NO.



O gráfico representa as concentrações de nitrito de acordo com os grupos de tratamento. Os resultados foram expressos \pm EPM de pelo menos três experimentos independentes em duplicata, e analisados utilizando o ANOVA seguido do pós-teste de Dunnett. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo LPS. CTR=controle; LPS=Lipopolissacarídeo; H:A 10, 50 e 100=Fração hexano:acetato 85/15 nas concentrações de 10, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente; AcOEt 10, 50 e 100=Fração acetato de etila nas concentrações de 10, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente.

5 DISCUSSÃO

A inflamação é uma resposta fisiológica que quando desregulada está envolvida na patogênese de diversas doenças, como asma, esclerose múltipla, diabetes, disfunção metabólica, artrite, esclerose múltipla e outras (FILEP, 2013). Nesse sentido, faz-se necessário o desenvolvimento de novas drogas que interfiram de forma benéfica no processo inflamatório, uma vez que a maioria do arsenal terapêutico disponível tem diversos efeitos colaterais, como o surgimento de urticárias (SOLOMON; FURST; ROMAIN, 2007), desordens gastrintestinais como diarreias, náuseas e azia (BHATT, 2008), risco de infarto do miocárdio (GROSSER, 2006; MINUZ, 2008; WARNER, 2008), hepatotoxicidade (GOLDKIND, 2006; INSEL, 2005) entre outros.

As algas pardas se destacam por serem abundantes ao longo da costa brasileira e por constituírem um grupo amplamente estudado no Brasil em várias linhas de pesquisa, como o isolamento de novas moléculas e o estudo de suas atividades biológicas (TEIXEIRA, 2013). Nesse contexto, *Canistrocarpus cervicornis* tem se mostrado como grande produtora de metabólitos secundários, em especial os diterpenos (DOMINGOS *et al.*, 2015; DOS SANTOS *et al.* 2011; BIANCO *et al.*, 2015).

Neste estudo foi observado que as frações hexano:acetato 85/15 (H:A 85/15) e acetato de etila (AcOEt) de *C. cervicornis* apresentaram efeito imunomodulador em macrófagos peritoneais murinos, *in vitro*. Inicialmente, foi avaliado o efeito citotóxico nessas células utilizando o método de MTT, e observou-se que o tratamento com diferentes concentrações das frações não reduz a viabilidade celular. Bianco e colaboradores (2013), demonstraram que o extrato bruto de *C. cervicornis* não promove diminuição da viabilidade de macrófagos da linhagem J774.G8 na concentração avaliada de 500 µg/mL.

Uma vez que as concentrações não foram tóxicas para as células deu-se continuidade aos experimentos avaliando os efeitos das frações na produção de citocinas e óxido nítrico. Como estímulo inflamatório foi utilizado o LPS, que é um agonista dos receptores do tipo Toll-like 4 (TLR 4) presentes nas membranas de vários tipos celulares, incluindo macrófagos (CRUZ-MACHADO, 2010). A ativação de TLR 4 pode desencadear várias vias de sinalização e uma delas é a do fator de

transcrição NF- κ B. Este fator de transcrição permanece num estado inativado ligado a uma proteína inibidora, a I κ B (GHOSH *et al.* 1998). Após a transdução do sinal, o NF- κ B é libertado da I κ B e migra para o núcleo, onde promove a transcrição de diversos genes alvos, entre eles, os que promovem a expressão de muitas citocinas como IL-6, TNF- α e IL-10 (KAWAI; AKIRA, 2007; RAETZ; WHITFIELD, 2002).

A IL-6 e TNF- α são consideradas citocinas pró-inflamatórias por desencadear processos como a ativação do endotélio, promovendo um padrão temporal de exibição de moléculas de adesão para leucócitos, ativação dessas células e indução da resposta de fase aguda (MEDZHITOV, 2008). Por outro lado, a IL-10 é considerada uma citocina imunossupressora por inibir a expressão de moléculas do MHCII e moléculas coestimulatórias em monócitos e em macrófagos e, além disso, limitar a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (MOORE *et al.*, 2001).

Foi observado que o tratamento com as frações diminuiu os níveis de IL-6 e IL-10 na presença de LPS. Por outro lado, não interferiu na produção do TNF- α . Adicionalmente, o tratamento apenas com as frações não alterou os níveis de produção basal das citocinas. Na literatura, fucanos isolados de *Dictyota menstrualis*, que também pertence à família dictyotaceae, não promovem redução nos níveis de TNF- α (ALBUQUERQUE *et al.*, 2013).

O perfil de resultados observado nas citocinas sugere a inibição de fatores de transcrição que regulam a expressão de cada uma dessas moléculas, a exemplo dos STAT1/3 e das vias ERK1/2- independentes de NF- κ B. Os fatores de transcrição STAT1 e 3 (sinais transdutores e ativadores da transcrição 1 e 3) estão presentes em macrófagos e induzem a produção de IL-10 na presença do LPS (IYER; CHENG, 2012). As vias das proteínas quinases ativadas por mitógenos, MAPKs, ERK1/2- independentes de NF- κ B são vias de ativação aliadas à produção de IL-6 (REGO *et al.*, 2011).

Foi ainda avaliada a produção de óxido nítrico, um gás solúvel, que atua no processo inflamatório como potente vasodilatador aumentando a permeabilidade vascular, o edema e a produção de substâncias inflamatórias (SALVEMINI *et al.*, 1996). O LPS induz o aumento da expressão da enzima produtora de NO, a iNOS, em macrófagos. Neste trabalho, houve diminuição dos níveis de NO, o que pode estar relacionado à inibição da expressão de iNOS. Na literatura, alguns relatos

demonstram que diterpenos de *C. cervicornis* apresentam efeitos de inibição sobre a produção de NO (HUANG *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2014).

Os resultados obtidos neste trabalho evidenciam, pela primeira vez, que *C. cervicornis* possui um efeito imunomodulador que envolve a inibição da produção das citocinas IL-6 e IL-10, mas não de TNF- α . Adicionalmente, também ocorre inibição da produção de NO. Esses resultados contribuem para o conhecimento das atividades biológicas da espécie e, além disso, após estudos adicionais, fornecem a possibilidade de desenvolvimento de novas drogas derivadas de produtos de origem natural.

6 CONCLUSÕES

Na investigação do efeito imunomodulador das frações H:A 85\15 e AcOEt de *Canistrocarpus cervicornis*, pode-se concluir que:

- As frações não apresentam efeito citotóxico em macrófagos peritoneais murinos no tempo e nas concentrações avaliadas;
- As frações promovem a redução dos níveis das citocinas IL-6 e IL-10;
- As frações não interferem nos níveis de TNF- α ;
- As frações diminuem os níveis de NO.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; JANEWAY, . A. Jr. Immunology: Improving on Nature in the Twenty-First Century. **Cell**. 100: 129-138, 2000.

ABBAS, A. K. *et al.* **Cellular and molecular immunology**. 4ª edição. Pennsylvania: W. B. Saunders company. 553p, 2000.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, H. **Imunologia Celular e Molecular**. 7ª edição. Editora Elsevier, 2012.

ALBUQUERQUE I. R. L. *et al.* Evaluation of Anti-Nociceptive and Anti-Inflammatory Activities of a Heterofucan from *Dictyota menstrualis*. **Marine Drugs**. 11: 2722-2740, 2013.

ALLER, M. A. *et al.* The inflammatory response recapitulates phylogeny through trophic mechanisms to the injured tissue. **Medical Hypotheses**. 68(1):202-9, 2007.

AMICO, V. Diterpenes based on the dolabellane skeleton from *Dictyota dichotoma*. **Tetrahedron**. 36, 1409–1414, 1980.

ARSATI, F.; VEIGA, M. C. F. A. Efeito do meloxicam sobre o extravasamento plasmático induzido pelo óleo de mostarda na ATM de ratos. **Tese de mestrado**, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1999.

AYYAD S. N. *et al.* Cytotoxic and protective DNA damage of three new diterpenoids from the brown alga *Dictyota dichotoma*. **European journal of medicinal chemistry**. 46(1): 175-82, 2011.

BARRETO, R. L.; CORREIA, C. R. D.; MUSCARÁ, M. N. Óxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos. **Química Nova**. São Paulo, v. 28, n. 6, nov.- dez. 2005.

BECKMAN, J. S.; KOPPENOL, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. **American Journal of Physiology**. 271: C1424-37, 1996.

BHATT D. L. *et al.* Expert consensus document on reducing the gastrointestinal risks of antiplatelet therapy and NSAID Use: a report of the American College of Cardiology Foundation task Force on Clinical Expert Consensus Documents. **Circulation**. 2008: 118; 1894-909, 2008.

BIANCO, E. M.; TEIXEIRA, V. L.; PEREIRA, R. C. Chemical defenses of the tropical marine seaweed *Canistrocarpus cervicornis* against herbivory by seaurchin. **Brazilian Journal Oceanography**. 58,213–218, 2010.

BIANCO, E. M. *et al.* Anti-Infective Potential of Marine Invertebrates and Seaweeds from the Brazilian Coast. **Molecules**. 18, 5761-5778; SC, Brasil, 2013.

BIANCO, E. M. *et al.* 4 α -Acetoxyamijidictyol - A New Antifeeding Dolastane Diterpene from the Brazilian Brown Alga *Canistrocarpus cervicornis*. **Chemistry & Biodiversity**. 12(11):1665-77, 2015.

BLUNT, J. W. *et al.* Marine natural products. **Natural Product Reports**. 25, 35–94, 2008.

BORISH, L. C.; STEINKE, J. W. Cytokines and chemokines. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. 111(2 Suppl):S460-75, 2003.

BORN, F. S.; BIANCO, E. M.; DA CAMARA, C.A. Acaricidal and repellent activity of terpenoids from seaweeds Collected in Pernambuco, Brazil. **Natural Products Communications**. 7(4):463-6, 2012.

CAMARA, R. B. *et al.* Heterofucans from the Brown Seaweed *Canistrocarpus cervicornis* with Anticoagulant and Antioxidant Activities. **Marine Drugs**. 24;9(1):124-38, 2011.

CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido nítrico. Revisão. **Acta Cirurgica Brasileira**. São Paulo, v. 17, n. 6, 2002.

CHAPLIN, D. D. Overview of the immune response. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. 125 (2 Suppl 2):S3-23, 2010.

CHOI, E. Y.; SANTOSO, S.; CHAVAKIS, T. Mechanisms of neutrophil transendothelial migration. **Frontiers Bioscience**. v. 14, p.1596-605, 2009.

CRUZ-MACHADO, S. S. *et al.* TLR4 and CD14 receptors expressed in rat pineal gland trigger NFKB pathway. **Journal of Pineal Research**. 49(2):183-92, 2010.

DAVIS, K. L. *et al.* Novel effects of nitric oxide. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. 41, 203-36, 2001.

DE CLERCK, O. A revised classification of the Dictyoteae (Dictyotales, Phaeophyceae) based on *rbcl* and 26s ribosomal DNA sequence analyses. **Journal of Phycology**. 42(6):1271–1288, 2006.

DE WAAL, M. R. *et al.* Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 174, p. 1209, 1991.

DOMINGOS T. F. S. *et al.* Anti-snake venom effect of secodolastane diterpenes isolated from Brazilian marine brown alga *Canistrocarpus cervicornis* against *Lachesis muta* venom. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 21(2):234-238, 2011.

DOMINGOS T. F. S. *et al.* Effect of diterpenes isolated of the marine alga *Canistrocarpus cervicornis* against some toxic effects of the venom of the bothrops jararaca snake. **Marine Drugs**. 20, 3515-3526, 2015.

DOS SANTOS, A. O. *et al.* 4-Acetoxydolastane diterpene from the Brazilian brown alga *Canistrocarpus cervicornis* as antileishmanial agent. **Marine Drugs**. 9:2369-2383, 2011.

DUDHGAONKAR, S. P. *et al.* Interaction of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 inhibitors in formalin-induced nociception in mice. **European Journal of Pharmacology**. v.492, p.117-122, 2004.

DURAN, R. *et al.* New diterpenoids from the alga *Dictyota dichotoma*. **Tetrahedron**. 53, 8675–8688, 1997.

DUSSE, L. M. S; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal brasileiro de patologia e medicina laboratorial**. Rio de Janeiro, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.

EL ALWANI, M. *et al.* Bioactive sphingolipids in the modulation of the inflammatory response. **Pharmacology & Therapeutics**. 112(1):171-83, 2006.

FEGHALI, C. A.; WRIGHT, T. M. Cytokines in acute and chronic inflammation. **Frontiers in bioscience: a journal and virtual library**. v. 2, p. 12-26, 1997.

FILEP, J. G. Resolution of inflammation: leukocytes and molecular pathways as potential therapeutic targets. **Frontiers in IMMUNOLOGY**. 4: 5, 2013.

FIGUEIREDO, C. S. **Contribuição à quimiotaxonomia e ficoquímica de *Canistrocarpus cervicornis* (kützing) De Paula & De Clerck (Dictyotaceae) coletada nos litorais paraibano e fluminense**. 2013. 118f. Tese (Doutorado em produtos naturais e sintéticos bioativos)-Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.

FIORENTINO, D. F. *et al.* IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. **Journal of Immunology**. v. 147, p. 3815, 1991.

FUJIWARA, N.; KOBAYASHI, K. Macrophages in inflammation. **Current drug targets - Inflammation and allergy**. v. 4, n. 3, p. 281-286, 2005.

GARSON, J. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 6, p. 143-170, 1989.

GHOSH, S.; MAY M. J.; KOPP, E. B. NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. **Annual Review of Immunology**. 16:225–60, 1998.

GKIECHLE, F. L.; MARLINSKI, T. Nitric oxide: biochemistry, pathophysiology and detection. **American Journal of Clinical Pathology**. 100: 56775, 1993.

GOLDKIND, L.; LAINE, L. A systematic review of NSAIDs withdrawn from the market due to hepatotoxicity: lessons learned from the bromfenac experience. **Pharmacoepidemiology and Drug Safety**. 15(4):213-20, 2006.

GOLDSBY R. A.; KINDT, T. J.; OSBORNE B. A. **Kuby Immunology**. 4 ed. W. H. Freeman and Company. 2000.

GOMEZ-MUÑOZ, A. et al. New insights on the role of ceramide 1-phosphate in inflammation. **Biochimica and Biophysica Acta**. 1831(6):1060-6, 2013.

GORDON, S. The macrophage. **Bioessays**. v. 17, n. 11, p. 977-86, 1995.

GREEN, L. C. *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**. 126(1):131-8, 1982.

GROSSER, T. Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities. **The Journal of Clinical Investigation**. 2006; 116: 4-15.

GUIRY, M. D, GUIRY, G. M. **Algae Base. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway**. 2014. Disponível em: <<http://www.algaebase.org>> Acesso em: 12 Abril 2016.

HUANG, Z. *et al.* Anti-inflammatory Labdane Diterpenoids from Leonurus macranthus. **Journal Natural Products**. 25;78(9):2276-85, 2015.

HUME, D. A. The mononuclear phagocyte system. **Current Opinion in Immunology**. 18, 49-53, 2006.

INSEL, P. A. Analgesic-antipyretic and anti-inflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. En: HARDMAN, J. G. et al. **The pharmacological basis of therapeutics**. 11 ed. New York: McGraw-Hill; p. 2021, 2005.

ISOBE, Y.; KATO, T.; ARITA, M. Emerging roles of eosinophils and eosinophil-derived lipid mediators in the resolution of inflammation. **Frontiers Immunology**. 3:270, 2012.

IYER, S. S.; CHENG, G. Role of Interleukin 10 Transcriptional Regulation in Inflammation and Autoimmune Disease. **Critical Reviews in Immunology**. 32(1):23-63, 2012.

JANEWAY, C. A. Jr.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annual Review of Immunology**. 20: 197-216, 2002.

KELECOM, A. Marine natural products in Brazil. Part1. Isolation and structural determination. **Ciência e Cultura - Journal of the Brazilian Association for the advancement of science**, v.49 (5/6), p.321-330, 1997.

KAWAI, T.; AKIRA, S. TLR signaling. **Seminars in Immunology**. 19(1):24-32, 2007.

KOISHI, A. C. *et al.* Screening of Dengue Virus Antiviral Activity of Marine Seaweeds by an In Situ Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **PLoS One**. 7(12):e51089. 2012.

LIU, Z. G. *et al.* Anti-inflammatory diterpenoids from the roots of *Euphorbia ebracteolata*. **Journal Natural Products**. 25;77(4):792-9, 2014.

LOWENSTEIN, C. J.; PADALCO, E. iNOS (NOS2) at a glance. **Journal of Cell Science**, 117, 2865-7, 2004.

LUENGO, M. B. A. historical revision of the main immunological events and pharmacology in these arch of the understanding and treatment of inflammatory diseases. **Revista Eletrônica de Farmácia**; Vol 2 (2), p.64-72, 2005.

MARLETTA, M.A. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. **Cell**, 78: 927-30, 1994.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428-435, 2008.

MINUZ, P. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cardiovascular risk: is prostacyclin inhibition the key event? **Journal of the American College of Cardiology**. 52: 1637-9, 2008.

MONCADA, S. *et al.* Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, 43(2): 109-42, 1991.

MOORE, K. W. *et al.* Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annual Review of Immunology**. 19: 683-765, 2001.

MORRIS, S.M.; BILLIAR, T.R. New insights into regulation of inducible nitric oxide synthesis. **American Journal of Physiology.**, 266: E829-39, 1994.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods.** 65(1-2):55-63, 1983.

MOSMANN, T. R. Properties and functions of interleukin-10. **Advances in Immunology.**, v. 56, p. 1, 1994.

MOSSER, D. M. The many faces of macrophage activation. **Journal of Leukocyte Biology**, vol. 73, p. 209-212, Feb. 2003.

MOURA, L. A. *et al.* Anticoagulation and antiplatelet effects of a dolastane diterpene isolated from the marine brown alga *Canistrocarpus cervicornis*. **Journal of thrombosis and thrombolysis.** 31(2):235-240, 2011.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SANDER M. K. Natural products as sources over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, V. 66, p. 1022-1037, 2003.

NIELSEN, J. Combinatorial synthesis of natural products. **Current Opinion in Chemical Biology**, V. 6, p. 297-305, 2002.

OLIVEIRA, M. T. P. **Efeito anti-inflamatório do MHTP, um alcalóide do tipo tetraidroisoquinólico.** 2014. 113f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular)-Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2014., il.

PEREIRA, F. E. L.; BOGLIOLO, L. Inflamações. **Bogliolo Patologia.** 5ª edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A., c. 7, p. 111-143, 1994.

PEREIRA, H. S. *et al.* Antiviral activity of diterpenes isolated from the Brazilian marine alga *Dictyotamenstrualis* against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). **Antiviral Research.** 64(1):69-76, 2004.

PEREIRA, R. C.; OLIVEIRA, A. S.; SUDATTI, D. B. Ecologia química marinha: origem, evolução e perspectivas no Brasil. **Oecologia Australis.** 15, 412-435, 2011.

QUEIROZ, T. M. *et al.* Vasorelaxation, Induced by *Dictyota pulchella* (Dictyotaceae), a Brown Alga, Is Mediated via Inhibition of Calcium Influx in Rats. **Marine Drugs**. 9:2075-2088, 2011.

RAETZ, C. R.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide endotoxins. **Annual Review of Biochemistry**. 71: 635-700, 2002.

REGO, D. *et al.* IL-6 Production Is Positively Regulated by Two Distinct Src Homology Domain 2-Containing Tyrosine Phosphatase-1 (SHP-1)-Dependent CCAAT/Enhancer - Binding Protein and NF- κ B Pathways and an SHP-1-Independent NF- κ B pathway in Lipopolysaccharide-Stimulated Bone Marrow-Derived Macrophages. **The Journal of Immunology**. 186:5443-5456, 2011.

ROTHERWELL, N. J. Functions and mechanisms of interleukin 1 in the brain. **Trends in Pharmacological Sciences**. 12:430-436, 1991.

SALVEMINI, D. *et al.* Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. **British Journal of Pharmacology**. 118:829-38, 1996.

SCOTT, A. *et al.* What is "inflammation"? Are we ready to move beyond Celsus? **British Journal of Sports Medicine**. 38(3): 248-249., 2004.

SERHAN, C. N.; SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nature Immunology**. 6:1191-97, 2005.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**., v. 18, p. 385-405, 2004.

SIQUEIRA JÚNIOR, J. F.; DANTAS, C. J. S. **Mecanismos celulares e moleculares da inflamação**. 1ª Edição. Rio de Janeiro: Editora médica científica Ltda, 238p, 2000.

SOLOMON, D. H.; FURST, D. E.; ROMAIN, P. L. **NSAIDs: Overview of adverse effects**. 2007. Disponível em: <<http://www.uptodate.com/contents/nonselective-nsaids-overview-of-adverse-effects>>. Acesso em: 12 maio 2016.

SUN, H. H. *et al.* Acetoxycrenulide, a new bicyclic cyclopropane-containing diterpenoid from the brown seaweed *Dictyota crenulata*. **Journal of Organic Chemistry**. 48, 1903–1906, 1983.

TAKEMURA, R.; WERB, Z. Secretory products of macrophages and their physiological functions. **American Journal of Physiology**, v. 246, p. 1-9, 1984.

TEIXEIRA, V. L. Dolastane and secodolastane diterpenes from the marine brown algae *Dictyota cervicornis*. **Journal of Natural Products**, 49, 570-575, 1986.

TEIXEIRA, V. L. Produtos naturais de algas marinhas bentônicas. **Revista virtual de Química**. 5, 3, 343-362, 2013.

TOGBE, D. *et al.* TLR4 gene dosage contributes to endotoxin-induced acute respiratory inflammation. **Journal of leukocyte biology**, v. 80, n. 3, p. 451-457, 2006.

TROWBRIDGE, H. O.; EMLING R. C. **Inflamação – Uma revisão do Processo**. 6ed. São Paulo: Quintessence Editora Ltda, 172p.,1996.

VALLIM, M. A. *et al.* The diterpenes from Dictyotacea marine brown algae in the Tropical Atlantic American region. **Biochemical Systematics and ecology**. 33, 1-16, 2005.

VAN FURTH, R. Monocyte production during inflammation. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 8, n. 2, p. 205-211, 1985.

WARNER, T. D.; MITCHELL, J. A. COX-2 selectivity alone does not define the cardiovascular risks associated with non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Lancet**. 371: 270-3, 2008

WILLEMS, F. *et al.* Interleukin-10 inhibits B7 and intercellular adhesion molecule-1 expression on human monocytes. **European Journal of Immunology**., v. 24, p. 1007, 1994.

WILLOUGHBY, D. A. *et al.* Resolution of inflammation. **Int J Immunopharmacol**, v. 22, p.1131-5, 2000.

WITKAMP, R.; MONSHOUWER, M. Signal transduction in inflammatory processes, current and future therapeutic targets: a mini review. **The Veterinary quarterly**, v. 22, n. 1, p. 11-16, 2000.

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

ANEXO A - Certidão de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)/UFPB



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIDÃO



João Pessoa, 24 de julho de 2014
CEUA N° 0301/13

Ilmo(a). Prof(a) Dr(a) Sandra Rodrigues Mascarenhas
Departamento Biologia Celular e Molecular - CBiotec - UFPB

Orientando(a): Éssia de Almeida Lima, (Iniciação Científica)

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba em sua reunião ordinária de **18/03/2013** analisou e **APROVOU** a execução do projeto **Investigação do efeito imunomodulador do gênero Dictyota em modelos de inflamação aguda.**

Com previsão de empregar - **ANIMAIS PROVÉM DO BIOTÉRIO Prof. Thomas George.**

Para serem utilizados no período de **01/08/2014 a 30/07/2015**

Atenciosamente,


Prof. Dr. Luis Cezar Rodrigues
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animal do CBiotec/UFPB

ANEXO B – ARTIGO A SER SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA NATURAL PRODUCT COMMUNICATIONS

Immunomodulatory effect of *Canistrocarpus cervicornis* in vitro

Éssia de Almeida Lima¹, Anne Kaliery de Abreu Alves¹, Luiz Henrique Agra Cavalcanti-Silva², Camila Silva de Figueiredo², José Maria Barbosa-Filho², Josean Fechine Tavares², Sandra Rodrigues-Mascarenhas^{1,2}

¹Centro de Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba

²Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba

Abstract

In this study, it was evaluated immunomodulatory effect of *Canistrocarpus cervicornis*, a marine brown alga, in lipopolysaccharide (LPS)-induced macrophages model *in vitro*. Firstly, it was observed that *C. cervicornis* H:A 85/15 and EtOAc fractions (10, 50 and 100 µg/mL) did not alter macrophage viability on MTT test. Additionally, both phases reduced the NO production in LPS-induced macrophages. This inhibitory effect was also observed on cytokines IL-6, IL-12 and IL-10 levels. However, *C. cervicornis* H:A 85/15 and EtOAc fractions did not interfere in TNF-α levels. Besides, treatment with *C. cervicornis* phases did not enhance none inflammatory mediators basal levels. These data indicate an immunomodulatory effect of *C.cervicornis*.