

Renata Fuga Antunes Cardoso

**Modulação da expressão de moléculas de superfície
em macrófagos tratados com compostos isolados de
microrganismos marinhos**

Araraquara

2012

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para obtenção do grau de Farmacêutica-Bioquímica.

Aluna: Renata Fuga Antunes Cardoso

**Modulação da expressão de moléculas de superfície
em macrófagos tratados com compostos isolados de
microrganismos marinhos**

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Alexandra Ivo de Medeiros

Araraquara

2012

Dedicatória

Este trabalho é dedicado a minha família, a Valéria Mallavolta, a todos os alunos de iniciação científica, pós-graduação e agregados do Laboratório de Imunologia do Departamento de Ciências Biológicas da Unesp Araraquara e, especialmente, a orientadora, professora e amiga Alexandra Ivo de Medeiros .

Agradecimentos

Aos órgãos de fomento FAPESP 2010/50190-2, PPP/PROPE e CNPq/302097/2010-4 pelo suporte financeiro. A Valéria Mallavolta pela assistência técnica e a todos que participaram direta e indiretamente do desenvolvimento deste trabalho.

Sumário

RESUMO	6
Lista de ilustrações e tabelas	7
Lista de abreviaturas e siglas.....	7
1. Introdução	9
2. Objetivo.....	14
2.1 Objetivos Específicos.....	14
Delineamento Experimental.....	15
3. Metodologia	16
3.1. Coleta de amostras para o isolamento de micro-organismos	16
3.2. Manutenção de linhagens celulares.....	17
3.3. Atividade Citotóxica	17
3.4. Quantificação de Nitrito (NO ₂).....	17
3.5. Citometria de Fluxo.....	18
3.6. Análise estatística.....	18
4. Resultados	19
5. Discussão.....	28
6. Conclusões	30
7. Referências Bibliográficas	32

RESUMO

Atualmente são conhecidas aproximadamente 10.000 substâncias do metabolismo secundário de invertebrados e microorganismos marinhos. Dentre os organismos marinhos estudados do ponto de vista químico e farmacológico, destacam-se, as esponjas, as ascídias, os briozoários e os octocorais. No entanto, pouco se sabe quanto ao potencial imunomodulador de compostos isolados de microorganismos marinhos, em especial daqueles isolados da costa brasileira.

A propriedade anti-inflamatória de diferentes extratos brutos foi inicialmente avaliada pelo potencial destes compostos quanto à inibição da produção de óxido nítrico (NO) em linhagem de macrófagos, RAW 264.7. Posteriormente as amostras que se mostraram promissoras foram também avaliadas em relação ao potencial imunomodulador quanto a expressão de moléculas de superfície relacionadas migração (Mac-1 ou CD11b) e ativação celular (CD80 e CD86) em linhagens de macrófagos estimulados com LPS. Nossos resultados mostram que dentre as 289 amostras testadas apenas o extrato DLM33 e as substâncias Ma(M3%)J-MeOH e Dr(M3%)6-MeOH/H₂O foram inicialmente considerados promissores quanto capacidade de inibir a síntese de NO por macrófagos. O extrato DLM33 foi capaz de modular apenas a porcentagem de macrófagos positivos para CD80 na presença de LPS. No entanto, a substância Dr(M3%)6-MeOH/H₂O não se mostrou eficiente quanto a modulação da expressão de moléculas de superfície Mac-1, CD80 e CD86. Surpreendentemente, a substância Ma(M3%)J-MeOH apresentou um potencial imunoestimulador quanto a expressão de Mac-1⁺/CD80⁺, mas não de CD86, em macrófagos sugerindo um possível efeito adjuvante desta substância. O efeito imunoestimulador da substância Ma(M3%)J-MeOH será futuramente investigado utilizando diferentes abordagens *in vitro* e *in vivo* para validar os resultados obtidos, assim como determinar os mecanismos pelos quais essa substância exerce o efeito adjuvante em células da resposta imune inata. Palavras-chave: Microorganismos marinhos, Óxido nítrico, Moléculas de superfície, Anti-inflamatório, Macrófagos.

Lista de ilustrações e tabelas

Delineamento experimental.....	16
Figura 1. Viabilidade celular em células Raw 264.7 tratadas com compostos marinhos...	23
Figura 2. Quantificação da produção de NO em células RAW 264.7 estimuladas com LPS.....	24
Figura 3. Potencial imunomodulador de Ma(M3%)J-MeOH na modulação da expressão de Mac-1 e CD80 em linhagem de macrófagos.....	28
Figura 4. Potencial imunomodulador de Ma(M3%)J-MeOH na modulação da expressão de Mac-1 e CD86 em linhagem de macrófagos.....	29
Tabela 1. Estudos referentes aos compostos ou substâncias puras isolados de organismos marinhos e suas atividades.....	11
Tabela 2. “Screening” de extratos e substâncias puras oriundos de microorganismos marinhos com potencial imunomodulador.....	21
Tabela 3. Expressão de moléculas de superfície Mac-1, CD80 e CD86 em macrófagos tratados com compostos isolados de microorganismos marinhos.....	27

Lista de abreviaturas e siglas

CD – grupamento de diferenciação

COX-2 – ciclo-oxigenase 2

DP – duplo positivo

DMSO – dimetilsulfóxido

IL – interleucinas

LBP – proteína de ligação ao lipopolissacarídeo

LPS – lipopolissacarídeo

MHC – molécula de histocompatibilidade

MTT - 3-(4,5-Dimetil tiazol 2-il) 2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium

NO – óxido nítrico

OVA – ovalbumina

PAMPS – padrões moleculares associados a patógenos

PBS – solução salina tamponada

TLRs: receptores do tipo “toll”

RRP – receptores de reconhecimento padrão

SBF – soro bovino fetal

TCR – receptores de célula T

TLR – receptores do tipo *toll*

TNF – fator de necrose tumoral

1. Introdução

Potencial anti-inflamatório de substâncias isoladas de organismos marinhos

Atualmente estima-se que a diversidade biológica de ecossistemas marinhos seja superior aos organismos das florestas tropicais e apenas uma pequena porcentagem da microfauna e microflora dos oceanos foi cultivado ou identificado. No entanto, acredita-se que a diversidade de metabólitos secundários sintetizada por estes microrganismos seja uma das mais ricas dentro desse ecossistema [1]. Esses metabólitos secundários biologicamente ativos exercem um papel chave nos mecanismos de defesa contra os agentes agressores do habitat marinho [1, 2]. No entanto, estes mesmos metabólitos são hoje descritos como uma rica fonte de drogas com diferentes potenciais farmacológicos oriundos desta imensa e desconhecida microfauna e microflora marinha.

São conhecidos mais de 22.000 produtos naturais de origem marinha e, somente no ano de 2010, foram isolados 1003 novos compostos com diversas atividades biológicas [3]. Na tabela 1 abaixo, nós podemos observar vários compostos de origem marinha com diferentes efeitos anti-inflamatórios, como inibição da síntese de óxido nítrico (NO), da expressão da enzima COX-2 (ciclo-oxigenase 2), de síntese de citocinas inflamatórias (TNF- α e IL-1) e de fatores de transcrição como AP-1 e NF κ B [4].

Tabela 1. As linhas pontilhadas em vermelho realçam os estudos referentes aos compostos ou substâncias puras isolados de organismos marinhos que mostram-se promissoras quanto ao potencial anti-inflamatório ou imunestimulador em células do sistema imune.

202

A.M.S. Mayer et al. / Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 153 (2011) 191–222

Drug class	Compound/organism ^a	Chemistry	Pharmacological activity	IC ₅₀	MMOA ^b	Country ^d	References
Anti-inflammatory	Crossmolides A and C (77, 78)/soft coral	Terpenoid ^d	Inhibition <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> of LPS-activated murine macrophage cell line	<10 µM	Inducible NOS and COX-2 inhibition	TAW	(Chao et al., 2008)
Anti-inflammatory	Durumolides A–C (79, 80, 81)/soft coral	Terpenoid ^d	Modulation of LPS-activated murine macrophage cell line	<10 µM	Inducible NOS and COX-2 inhibition	TAW	(Cheng et al., 2008)
Anti-inflammatory	Frajinolides B and C (82, 83)/coral	Terpenoid ^d	Human neutrophil free radical inhibition <i>in vitro</i>	>10 µg/mL ^e	Superoxide anion and elastase inhibition	TAW	(Shen et al., 2007)
Anti-inflammatory	Gracilaria verrucosa fatty acids (84, 85)/alga	Polyketide ^d	Modulation of LPS-activated murine macrophages <i>in vitro</i>	<20 µg/mL ^e	NO, IL-6 and TNF-α inhibition	S. KOR	(Dang et al., 2008)
Anti-inflammatory	<i>Hypnea cervicornis</i> lectin (86)/alga	Peptide ^d	Anticoagulant and anti-inflammatory effects <i>in vivo</i>	0.1–1 mg/kg ^e	Carbohydrate-binding site interaction	BRA	(Bittencourt Fda.S. et al., 2008)
Anti-inflammatory	Manzamine (MZA) (87), (–)-8-hydroxy MZA (88), hexahydro-8-hydroxy MZA (89)/sponge	Alkaloid ^d	Modulation of LPS-activated brain microglia <i>in vitro</i>	0.25–1.97 µM	TXB ₂ inhibition	USA	(El Sayed et al., 2008)
Anti-inflammatory	ω-3 PUFA (90, 91, 92, 93)/mussel	Polyketide ^d	Human neutrophil lipoxygenase inhibition <i>in vitro</i>	ND	LTB ₄ and 5-HETE inhibition	AUS	(Treschow et al., 2007)
Anti-inflammatory	<i>Perithalia capillaris</i> quinone (94)/alga	Shikimate	Human neutrophil free radical release inhibition <i>in vitro</i>	2.1 µM	Superoxide anion inhibition	NZL	(Sansom et al., 2007)
Anti-inflammatory	PFF-B (95)/alga	Polyketide ^d	Rat basophilic leukemia cell histamine release inhibition	7.8 µM	Inhibition of β-hexosaminidase release	JPN	(Sugitara et al., 2007)
Anti-inflammatory	Plakortide P (54)/sponge	Polyketide ^d	Modulation of LPS-activated brain microglia <i>in vitro</i>	0.93 µM	TXB ₂ inhibition	BRA	(Kossuga et al., 2008)
Anti-inflammatory	Rubrolide O (96)/ascidian	Polyketide ^d	Human neutrophil free radical release inhibition <i>in vitro</i>	35 µM	Superoxide anion inhibition	NZL	(Pearce et al., 2007b)
Anti-inflammatory	Stearidonic (97)/alga	Polyketide ^d	Inhibition of mouse ear inflammation	160–314 µg/ear	Inhibition of edema, erythema and blood flow	S. KOR, JPN	(Khan et al., 2007)
Anti-inflammatory	Cartersamine A (98)/sponge	Alkaloid ^d	Neutrophil chemotaxis inhibition	5 µM	Undetermined	JPN	(Kobayashi et al., 2007a)
Anti-inflammatory	Lingbystratin 5–7 (99, 100, 101)/bacterium	Peptide ^d	Elasease inhibition	3–10 nM	Undetermined	USA	(Taori et al., 2007)
Anti-inflammatory	Salimiprone A (102)/bacterium	Polyketide ^d	Mouse splenocyte interleukin-5 inhibition	10 µg/mL	Undetermined	USA	(Oh et al., 2008)
Immune system	Cycloprodiginin hydrochloride (103)/bacterium	Alkaloid ^d	Interleukin-8 inhibition	1 µM	AP-1 transcription factor inhibition	JPN	(Kawauchi et al., 2007)
Immune system	Floridoside (104)/alga	Sugar ^d	Activation of classical complement pathway	5.9–9.3 µg/mL ^e	IgM mediated-effect	FRA	(Courtois et al., 2008)
Immune system	Ianthrans (105, 106)/sponge	Polyketide ^d	Activation of Ca ²⁺ -mobilization	0.48–1.3 µM	Ionotropic P2Y ₁ receptor activation	DEU, USA	(Greve et al., 2007)
Immune system	Prodiginin (107)/bacterium	Alkaloid ^d	Macrophage iNOS inhibition	0.1 µg/mL ^e	NF-κB transcription factor inhibition	S. KOR	(Huh et al., 2007)
Immune system	ASP (108)/clam	Poly-saccharide ^b	Splenocyte proliferation increase	<100 µg/mL ^e	Undetermined	CHN	(He et al., 2007)
Immune system	Frondoside A (109)/sea cucumber	Terpenoid glycoside	Lysosomal activity, phagocytosis and ROS activation	0.1–0.001 µg/mL	Undetermined	RUS, USA	(Aminin et al., 2008)
Immune system	<i>Hippospongia</i> sp. quinones (110, 111, 112)/sponge	Terpenoid ^d	Enhancement of IL-8 release	>1 µg/mL ^e	Undetermined	JPN	(Oda et al., 2007)
Immune system	Macropholide M (113)/fungus	Polyketide ^d	Cell adhesion inhibition	33.2 µM	Undetermined	JPN	(Yamada et al., 2007)
Immune system	Peribysin J (114)/fungus	Terpenoid ^d	Cell adhesion inhibition	11.8 µM	Undetermined	JPN	(Yamada et al., 2007)
Immune system	Quercetrolimide C (115)/soft coral	Terpenoid ^d	Macrophage iNOS and COX-2 inhibition	<10 µM ^e	Undetermined	TAW	(Lu et al., 2008)
Immune system	<i>Spongia</i> sp. diterpenoids (116, 117)/sponge	Terpenoid ^d	Murine spleen cell lysosome activation	>100 µg/mL ^e	Undetermined	RUS	(Ponomarenko et al., 2007)
Immune system	Thalassopimaride B (118)/bacterium	Peptide ^d	Interleukin 5 inhibition	5 µM	Undetermined	USA	(Oh et al., 2007)
Nervous system	Lincolosides M-Q (121, 122, 123, 124, 125)/sea star	Triterpene ^d	Induction of neurite outgrowth	<10 µM ^e	Dependent on xylose on side chain	JPN	(Han et al., 2007)
Nervous system	Phaeophytin A (126)/alga	Alkaloid/terpenoid	Induction of neurite outgrowth	<3.9 µM ^e	MAP kinase activation	JPN	(Ina et al., 2007)
Nervous system	<i>Conus</i> leparidus conotoxin Lp1.1 (127)/snail	Peptide ^d	Seizure and paralysis in goldfish	<10 µM ^e	Slow block of α6β3/2 and α3/2 nicotinic receptor	CHN, USA	(Peng et al., 2008)
Nervous system	Damipipicolin (128) and damituricin (129)/sponge	Alkaloid ^d	Inhibition of serotonin receptor binding	1 µg/mL ^e	Ca ²⁺ influx inhibition	ITA, DEU	(Aielo et al., 2007)
Nervous system	4-Acetoxy-plaknamin B (130)/sponge	Triterpenoid alkaloid ^d	Acetylcholinesterase inhibition	3.75 µM	Mixed-competitive inhibition	THAI	(Langae et al., 2007)
Nervous system	Sargachinonic acid (131) and sargachromenol (132)/alga	Terpenoid ^d	Butyrylcholinesterase inhibition	26 nM	Undetermined	S. KOR	(Choi et al., 2007)
Nervous system	SPMG (74)/alga	Poly-saccharide ^b	Neuronal Ca ²⁺ -apoptosis inhibition		Increase in caspase-3 activity	CHN	(Hui et al., 2008)

^aOrganism: Kingdom Animalia; coral (Phylum Cnidaria); ascidian (Phylum Chordata); sea star, cucumber (Phylum Echinodermata); clam, mussel, snail (Phylum Mollusca); sponge (Phylum Porifera); Kingdom Fungi; fungus; Kingdom Plantae; alga; Kingdom Monera; bacterium (Phylum Cyanobacteria); ^bIC₅₀: concentration of a compound required for 50% inhibition; ^c: apparent IC₅₀; not determined; ^dMMOA: molecular mechanism of action; NO: nitric oxide; ^eCountry: AUS: Australia; BRA: Brazil; CHN: China; DEU: Germany; FRA: France; ITA: Italy; JPN: Japan; NZL: New Zealand; RUS: Russia; S. KOR: South Korea; TAW: Taiwan; THAI: Thailand; Chemistry: ^fpolyketide; ^gterpene; ^hnitrogen-containing compound; ⁱpoly-saccharide, modified as in the text.

No Brasil, apesar da investigação do ambiente marinho como fonte de produtos naturais ser ainda incipiente, alguns grupos de pesquisa buscam na biodiversidade brasileira a descoberta de novos produtos de origem nacional que poderão ser utilizados no tratamento de tumores, processos inflamatórios, atividades microbicidas entre mecanismos de ação. O grupo do Prof. Roberto G. Berlinck, colaborador principal deste projeto, é um dos pioneiros quanto ao estudo de química de microrganismos marinhos. Menezes *et al.*, 2009, colaboradora do projeto coordenado pelo Prof. Roberto G. Berlinck, investigou a presença de bactérias e fungos isolados a partir de invertebrados marinhos obtidos do litoral norte do estado de São Paulo. Dentre os compostos com aplicação farmacológica isoladas de membros do grupo actinomicetos (em geral do gênero *Streptomyces*) destacam-se potentes drogas antitumorais com ação anti-neoplásica, como antraciclinas, bleomicina, actinomicina D, ácido aureólico e pentostatina, entre outras [5, 6]. No entanto, pouco se tem descrito sobre o potencial imunomodulador (anti-inflamatório e imunestimulador) de compostos isolados de actinomicetos e outros microrganismos marinhos. Strangman *et al.*, 2009 recentemente descreveram um estudo no qual foram avaliados 2.500 extratos microbianos marinhos isolados de *Streptomyces sp* quanto a capacidade de modular a síntese de citocinas associadas a um padrão de resposta TH2, diretamente envolvidas na patologia da asma. Neste estudo foram isolados dez novos “9-membered bis-lactones”, “splenocins”, com potente atividade supressora quanto à síntese IL-5, IL-13, TNF- α e IL-1 β por células do baço estimuladas com OVA. Os resultados obtidos demonstram que estes compostos são tão eficientes quanto dexametasona quanto a capacidade de inibição da síntese de mediadores inflamatórios [7].

Moléculas de superfície e ativação de macrófagos

Os macrófagos são células residentes distribuídas por diferentes tecidos, são consideradas as primeiras células de defesa contra agentes agressores e desempenham um papel fundamental no desenvolvimento do processo inflamatório. Esses fagócitos possuem uma diversidade de receptores de superfície celular que permitem a interação de patógenos e ou seus componentes. Dentre estes receptores os denominados receptores de reconhecimento de padrões (RRP), tais como os TLRs (do inglês *Toll like receptor*), interagem com componentes derivados de patógenos denominados PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) presentes em bactérias, vírus, parasitas e fungos e desempenham um papel chave na ativação destas células. Lipopolissacarídeos (LPS) presentes em bactérias Gram-negativas interagem com TLRs através do complexo CD14/LBP/TLR4 resultando na ativação de uma complexa cascata bioquímica. Essa interação promove o recrutamento de proteínas kinases como MyD88 e IRAK que culmina da ativação NF κ B e AP-1 levando a síntese de diferentes mediadores solúveis como citocinas, quimiocinas, metabólitos do ácido araquidônico (AA) e expressão de moléculas de superfície envolvidas na ativação e recrutamento celular [8-13]. Além disso, as cascatas bioquímicas desencadeadas através da interação com LPS podem resultar no aumento da expressão de moléculas de superfície, como Mac-1 (CD11b/CD18), moléculas de histocompatibilidade (MHC I e II), CD80 e CD86 que possuem um papel de moléculas co-estimuladoras e, portanto desempenham um importante papel na ativação de macrófagos e de linfócitos T. [14, 15].

Mac-1 é classificada como uma β 2 integrina da superfamília das imunoglobulinas, sendo um receptor heterodimérico, possui um a cadeia α (CD11b) e uma cadeia β (CD18) e expressa na superfície de macrófagos e outros leucócitos entre outros tipos celulares [16, 17]. A expressão desta molécula na superfície celular permite a fagocitose de partículas

opsonizadas com componentes do sistema complemento e interação com seus respectivos ligantes, colaborando no recrutamento de células para o local afetado. Além disso, na presença de LPS ocorre o aumento da expressão e a ativação de Mac-1 assim como a expressão de genes que codificam as proteínas COX-2, IL-12 p35, e IL-12 p40 em linhagem celular de macrófagos [18, 19].

Durante o processo de ativação de linfócitos T, além do primeiro sinal, TCR-MHC-II, macrófagos e células dendríticas necessitam de um segundo sinal oriundo de moléculas co-estimuladoras como, CD80 (B7.1) e CD86 (B7.2) [20]. Alguns patógenos possuem a capacidade de regular negativamente a expressão de MHC II, com a finalidade de fugir da vigilância imunológica do hospedeiro [21, 22]. Liu *et al.*, 2011 demonstraram que a deficiência de MHC II atenua a produção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos e células dendríticas estimulados com LPS através dos receptores TLR4, TLR3 ou TLR9 [23]. A interação moléculas co-estimuladoras como CD80 associado ao terceiro sinal mediado por citocinas, como IFN- γ e IL-12 é imprescindível para o direcionamento de um padrão de resposta do tipo Th1, resultado na produção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e IL-2. A molécula co-estimuladora CD86 parece estar associada à produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-4, IL-10 e TGF- β relacionadas a um padrão de resposta Th2 [24]. Como macrófagos expressam CD80 constitutivamente e CD86 é expressa num estado de ativação celular, pode-se dizer que CD80 está envolvida no estado inicial da inflamação, enquanto CD86 esta mais associada com modulação da resposta infamatória [25]. Suas funções podem ser antagônicas de acordo com o receptor associado nos linfócitos T. A interação de CD80/CD86 a CD28 promove a ativação de células T; contudo, se ligados a CTLA-4/CD152, podem regular negativamente a ativação destes linfócitos [26].

Mac-1, CD80 e CD86 são apenas alguns exemplos de moléculas presentes na superfície de macrófagos envolvidas na ativação celular durante o processo inflamatório.

Portanto, o nosso modelo de estudo visa a avaliação da modulação da expressão destas moléculas em macrófagos ativados na presença de um estímulo inflamatório assim como as vias de ativação intracelular, garantindo uma visão mais completa do processo inflamatório, além de serem possíveis alvos de fármacos com potenciais imunomodulador.

2. Objetivo

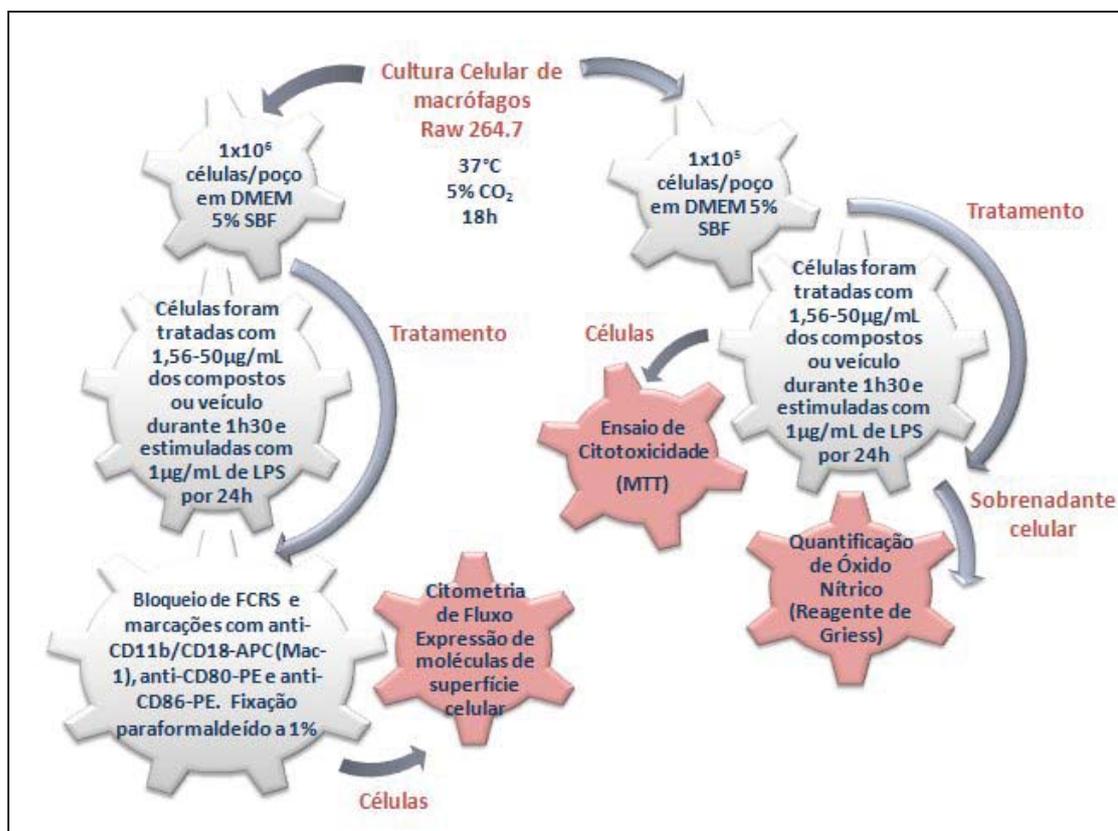
Determinar o potencial imunomodulador de extratos, substâncias puras e compostos isolados de microrganismos marinhos em linhagens de macrófagos Raw 264.7.

2.1 Objetivos Específicos

Para avaliar o potencial imunomodulador de amostras oriundas de microrganismos marinhos, utilizaremos as seguintes estratégias experimentais:

1. “Screening” de extratos com potencial anti-inflamatório a partir de quantificação de nitrito;
2. Avaliação da modulação da expressão de moléculas na superfície de macrófagos (Mac-1, MHC II, CD80 e CD86) em substâncias e compostos que mostraram-se promissores quanto ao efeito anti-inflamatório;

Delineamento Experimental



Descrição do delineamento experimental

Estratégia experimental 1. Avaliação da citotoxicidade e quantificação de nitrito.

As amostras foram diluídas em DMSO e posteriormente foi feita uma diluição seriada em meio DMEM incompleto (DMEM-I). Os compostos foram ressuspensos em DMEM-I, nas concentrações entre 50µg/mL e 1,56µg/mL com diluição em base dois e, em seguida, os mesmos foram adicionados à cultura de macrófagos por 90 min. Após esse período de incubação, foi adicionado LPS (1µg/mL) à cultura e a mesma, incubada por um período de 24h. O sobrenadante de cultura foi coletado e armazenado à -20°C até o momento da quantificação de nitrito como descrito em material e métodos. Vale ressaltar que após a

remoção do sobrenadante de cultura foi realizado o ensaio de citotoxicidade para eliminar possíveis resultados “falsos positivos” resultante da estimulação pelo LPS e tratamento com os respectivos compostos e substâncias puras. Todas as amostras que apresentaram citotoxicidade superior a 95% foram descartadas nos experimentos de expressão de moléculas de superfície (dados não mostrados). Para avaliar a atividade citotóxica dos respectivos compostos foi utilizado o método colorimétrico de citotoxicidade pelo 3-(4,5-Dimetil tiazol 2-il) 2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium-MTT como descrito previamente por Mosmann (1983) [27].

Estratégia experimental 2. Avaliação da modulação da expressão de moléculas na superfície de macrófagos (Mac-1, CD80 e CD86).

1×10^6 células foram distribuídas em placas de cultura de seis poços e as mesmas submetidas ao protocolo descrito previamente. Após os períodos de incubação, as células foram coletadas, transferidas para tubos de citometria para realização do protocolo de marcação das células com anticorpos específicos para moléculas de superfície como Mac-1, além das moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86. A descrição da metodologia de citometria de fluxo foi realizada conforme descrito em material e métodos.

3. Metodologia

3.1. Coleta de amostras para o isolamento de microrganismos

Todo o processo de produção dos extratos brutos, isolamento das frações e purificação dos compostos isolados foi realizado no Instituto de Química de São Carlos (IQSC) sobre a coordenação do Prof. Dr. Roberto G. S. Berlinck e enviadas para realização dos respectivos testes *in vitro* para o Laboratório de Imunologia FCFAR sob coordenação da Prof^a Dr^a Alexandra Ivo de Medeiros.

3.2. Manutenção de linhagens celulares

A linhagem celular de macrófagos, RAW 264.7, derivada de camundongos Balb/c, foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (oriunda da Coleção Americana de Cultura de Células (ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA). As células foram armazenadas em nitrogênio líquido em solução de congelamento. As células foram descongeladas e expandidas em frascos de cultura celular em 7,0 mL de meio DMEM contendo 10% SBF (soro bovino fetal) e gentamicina (1:1000) em estufa incubadora (95% umidade, 5% CO₂, à 37°C). Depois de formada a monocamada celular, a mesma foi removida por raspagem com suportes plásticos (rodos) apropriados e expandida em frascos com 20,0 mL do meio descrito acima para obter o número de células necessário para os ensaios de citotoxicidade e atividade imunomoduladora.

3.3. Atividade Citotóxica

Para avaliar a atividade citotóxica dos respectivos compostos foi utilizado o método colorimétrico de citotoxicidade pelo 3-(4,5-Dimetil tiazol 2-il) 2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium-MTT conforme descrito previamente [27]. Os compostos que apresentaram atividade citotóxica superior a 5% não foram testados nos subseqüentes bioensaios.

3.4. Quantificação de Nitrito (NO₂)

A quantificação de óxido nítrico foi indiretamente avaliada através do acúmulo de nitrito. Para a dosagem de nitrito, 100 µL do reagente de Greiss (solução estoque de NEED a 0,1% (Sigma, St. Louis, MO) e sulfanilamida a 1% em H₃PO₄ 5%) foram adicionados a 100 µL de sobrenadante de cultura. Para análise quantitativa dos compostos foram adicionadas soluções contendo nitrito em concentrações entre 3 a 200 µM de nitrito de sódio, conforme descrito previamente [28]. A densidade óptica foi medida em leitor de microplacas com

absorbância de 540 nm (Epoch, Biotek). A quantidade de nitrito dos compostos foi correlacionada aos valores de absorbância obtidos na curva padrão.

3.5. Citometria de Fluxo

A modulação da expressão de moléculas na superfície de macrófagos como Mac-1, CD80 e CD86, tratados ou não com diferentes concentrações dos compostos com resultados mais promissores foi feita através do protocolo descrito previamente por Medeiros et al. [29]. Brevemente, a suspensão celular obtida foi ajustada para 1×10^6 células/mL e 100 μ l de cada amostra foi adicionada em tubos apropriados para citometria de fluxo. Em seguida, foi adicionado anticorpo anti- CD16/CD32 para o bloqueio de ligações inespecíficas da porção Fc do anticorpo. Após a incubação de 40 minutos à 4°C foram adicionados anticorpos específicos para as moléculas de interesse e assim como tubos contendo anticorpos com seus respectivos isotipos controles. Após 30 minutos de incubação à 4°C as células foram lavadas com 2mL de solução salina tamponada (PBS) acrescido 2 % de soro bovino fetal (SBF) e em seguida fixadas com PBS contendo 1% de formaldeído.

Todas as amostras foram adquiridas utilizando o citômetro de fluxo FACSCanto (Becton and Dickinson, San Jose, CA) e as análises foram realizadas utilizando o programa FACS DIVA.

3.6. Análise estatística

Os resultados foram apresentados como a média \pm EPM a partir de 3 ou mais diferentes experimentos, e foram analisados no programa GraphPad Prism- InStat 4. Diferenças estatísticas em todos os experimentos foram determinadas pelo uso do teste ANOVA seguido de Bonferroni. Diferenças estatísticas foram indicadas para $P < 0,05$ ou menor.

4. Resultados

Screening *in vitro* de amostras isoladas de microrganismos marinhos com potencial anti-inflamatório e determinação da viabilidade celular.

Durante a primeira fase de desenvolvimento deste projeto foi realizado o “screening” *in vitro* de extratos que apresentaram um potencial anti-inflamatório através da quantificação de nitrito no sobrenadante de cultura de macrófagos tratados ou não com diferentes extratos na presença de LPS, como descrito na Tabela 2. Dentre os 298 compostos avaliados somente três amostras apresentaram-se promissoras quanto ao potencial anti-inflamatório, o extrato DLM33 e as substâncias Ma(M3%)J-MeOH e Dr(M3%)6-MeOH/H₂O. As concentrações que apresentaram uma viabilidade celular inferior a 95% foram descartadas em nossas análises (Figura 1). Os resultados foram apresentados na forma de tabela com seus respectivos códigos. As amostras que apresentaram potencial anti-inflamatório foram realçadas em amarelo e a curva dose-resposta da quantificação de nitrito e viabilidade celular devidamente representada em forma de gráficos (Figura 1 e 2).

Nossos resultados demonstram que a incubação de células RAW 264.7 na presença de LPS (1 µg/mL) resultou em um aumento estatisticamente significativo nos níveis de nitrito quando comparado a células incubadas apenas com meio. Além disso, o tratamento das células com o extrato DLM33 e com as substâncias Ma(M3%)J-MeOH e Dr(M3%)6-MeOH/H₂O foi capaz de inibir de maneira concentração-dependente a produção de NO₂ por macrófagos estimulados com LPS, como se segue nos gráficos da Figura 2.

Tabela 2. “Screening” de extratos e substâncias puras oriundos de microorganismos marinhos com potencial imunomodulador.

Ma-2(M3%)-H2O/MeOH	Ma-E(GPY)-ExMeOH	Ma-1a(Tub)-ExMeOH
Ma-3(M3%)-H2O/MeOH	Ma-F(GPY)-ExMeOH	Ma-A(Tub)-ExMeOH
Ma-5(M3%)-H2O/MeOH	Ma-G(GPY)-ExMeOH	Ma-A1(Tub)-ExMeOH
Ma-6(M3%)-H2O/MeOH	Ma-H(GPY)-ExMeOH	Ma-B(Tub)-ExMeOH
Ma-7(M3%)-H2O/MeOH	Ma-I(GPY)-ExMeOH	Ma-C(Tub)-ExMeOH
Ma-8(M3%)-H2O/MeOH	Ma-J(GPY)-ExMeOH	Ma-D(Tub)-ExMeOH
Ma-9(M3%)-H2O/MeOH	Ma-K(GPY)-ExMeOH	Ma-E(Tub)-ExMeOH
Ma-10(M3%)-H2O/MeOH	Ma-1(GPY)-H2O/MeOH	Ma-F(Tub)-ExMeOH
Ma-A(M3%)-H2O/MeOH	Ma-2(GPY)-H2O/MeOH	Ma-F1(Tub)-ExMeOH
Ma-A1(M3%)-H2O/MeOH	Ma-3(GPY)-H2O/MeOH	Ma-G(Tub)-ExMeOH
Ma-A3(M3%)-H2O/MeOH	Ma-3a(GPY)-H2O/MeOH	Ma-H(Tub)-ExMeOH
Ma-A4(M3%)-H2O/MeOH	Ma-C(GPY)-H2O/MeOH	Ma-H1(Tub)-ExMeOH
Ma-A6(M3%)-H2O/MeOH	Ma-D(GPY)-H2O/MeOH	Ma-I(Tub)-ExMeOH
Ma-A7(M3%)-H2O/MeOH	Ma-E(GPY)-H2O/MeOH	Ma-I2(Tub)-ExMeOH
Ma-A8(M3%)-H2O/MeOH	Ma-F(GPY)-H2O/MeOH	Ma-J(Tub)-ExMeOH
Ma-B(M3%)-H2O/MeOH	Ma-H(GPY)-H2O/MeOH	Ma-J1(Tub)-ExMeOH
Ma-C(M3%)-H2O/MeOH	Ma-I(GPY)-H2O/MeOH	Ma-J2(Tub)-ExMeOH
Ma-C1(M3%)-H2O/MeOH	Ma-K(GPY)-H2O/MeOH	Ma-J3(Tub)-ExMeOH
Ma-E(M3%)-H2O/MeOH	Ma-1(M2%)-ExMeOH	Ma-K(Tub)-ExMeOH
Ma-F(M3%)-H2O/MeOH	Ma-3(M2%)-ExMeOH	Ma-K1(Tub)-ExMeOH
Ma-G(M3%)-H2O/MeOH	Ma-4(M2%)-ExMeOH	Ma-L(Tub)-ExMeOH
Ma-G1(M3%)-H2O/MeOH	Ma-4a(M2%)-ExMeOH	Ma-A1(Tub)-H2O/MeOH
Ma-H(M3%)-H2O/MeOH	Ma-A(M2%)-ExMeOH	Ma-B(Tub)-H2O/MeOH
Ma-I(M3%)-H2O/MeOH	Ma-B(M2%)-ExMeOH	Ma-C(Tub)-H2O/MeOH
Ma-I1(M3%)-H2O/MeOH	Ma-C(M2%)-ExMeOH	Ma-D(Tub)-H2O/MeOH
Ma-J(M3%)-H2O/MeOH	Ma-D(M2%)-ExMeOH	Ma-E(Tub)-H2O/MeOH
Ma-K(M3%)-H2O/MeOH	Ma-E(M2%)-ExMeOH	Ma-F(Tub)-H2O/MeOH
Ma-L(M3%)-H2O/MeOH	Ma-F(M2%)-ExMeOH	Ma-F1(Tub)-H2O/MeOH
Ma-M(M3%)-H2O/MeOH	Ma-G(M2%)-ExMeOH	Ma-G(Tub)-H2O/MeOH
Ma-N(M3%)-H2O/MeOH	Ma-H(M2%)-ExMeOH	Ma-H(Tub)-H2O/MeOH
Ma-O(M3%)-H2O/MeOH	Ma-I(M2%)-ExMeOH	Ma-H1(Tub)-H2O/MeOH
Ma-P(M3%)-H2O/MeOH	Ma-J(M2%)-ExMeOH	Ma-I(Tub)-H2O/MeOH
Ma-Q(M3%)-H2O/MeOH	Ma-K1(M2%)-ExMeOH	Ma-I2(Tub)-H2O/MeOH
Ma-R(M3%)-H2O/MeOH	Ma-1(M2%)-H2O/MeOH	Ma-J(Tub)-H2O/MeOH
Ma-T(M3%)-H2O/MeOH	Ma-3(M2%)-H2O/MeOH	Ma-J1(Tub)-H2O/MeOH
Ma-U(M3%)-H2O/MeOH	Ma-4(M2%)-H2O/MeOH	Ma-J3(Tub)-H2O/MeOH
Ma-V(M3%)-H2O/MeOH	Ma-4a(M2%)-H2O/MeOH	Ma-K(Tub)-H2O/MeOH
Ma-X(M3%)-H2O/MeOH	Ma-A(M2%)-H2O/MeOH	Ma-K1(Tub)-H2O/MeOH
Ma-1(GPY)-ExMeOH	Ma-B(M2%)-H2O/MeOH	Ma-L(Tub)-H2O/MeOH
Ma-2(GPY)-ExMeOH	Ma-C(M2%)-H2O/MeOH	Ma-H(Tub)-MeOH
Ma-3(GPY)-ExMeOH	Ma-D(M2%)-H2O/MeOH	MA-K1(M2%)-ExMeOH-3
Ma-3a(GPY)-ExMeOH	Ma-F(M2%)-H2O/MeOH	MA-K1(M2%)-H2O/MeOH-3
Ma-A(GPY)-ExMeOH	Ma-G(M2%)-H2O/MeOH	MA-K1(Tub)-ExMeOH-3
Ma-B(GPY)-ExMeOH	Ma-H(M2%)-H2O/MeOH	MA-K1(Tub)-H2O/MeOH-3
Ma-C(GPY)-ExMeOH	Ma-I(M2%)-H2O/MeOH	MA-L(M3%)-H2O/MeOH-3
Ma-D(GPY)-ExMeOH	Ma-J(M2%)-H2O/MeOH	MA-L(Tub)-ExMeOH-3
Ma-D1(GPY)-ExMeOH	Ma-K1(M2%)-H2O/MeOH	MA-L(Tub)-H2O/MeOH-3
Ma-M(M3%)-H2O/MeOH-3	Ma-N(M3%)-H2O/MeOH-3	Ma-O(M3%)-H2O/MeOH-3
Ma-P(M3%)-H2O/MeOH-3	Ma-Q(M3%)-H2O/MeOH-3	Ma-R(M3%)-H2O/MeOH-3
Ma-T(M3%)-H2O/MeOH-3	Ma-U(M3%)-H2O/MeOH-3	Ma-V(M3%)-H2O/MeOH-3
Ma-X(M3%)-H2O/MeOH-3	Ma-1(GPY)-ExMeOH-3	Ma-1(GPY)-H2O/MeOH-3
Ma-1(M2%)-ExMeOH-3	Ma-1(M2%)-H2O/MeOH-3	Ma-1A(Tub)-ExMeOH-3
Ma-2(GPY)-ExMeOH-3	Ma-2(GPY)-ExMeOH-3	Ma-2(M3%)-H2O/MeOH-3
Ma-3(GPY)-ExMeOH-3	Ma-3(GPY)-H2O/MeOH-3	Ma-3(M2%)-ExMeOH-3

Ma-3a(GPY)-ExMeOH-3	Ma-4(M2%)-ExMeOH-3	Ma-4(M2%)-H2O/MeOH-3
Ma-4a(M2%)-ExMeOH-3	Ma-4a(M2%)-H2O/MeOH-3	Ma-5(M3%)-H2O/MeOH-3
Ma-5(M3%)-H2O/MeOH-3	Ma-7(M3%)-H2O/MeOH-3	Ma-8(M3%)-H2O/MeOH-3
Ma-9(M3%)-H2O/MeOH-3	Ma-10(M3%)-H2O/MeOH-3	DLM33
Db(A)1	DCe1a(BC)	DR(F)2
Db(A)2	DCe2(BC)	DR(F)5R
Db(A)4	DCe2a(BC)	DR(F)6R
Db(A)5b	DCe3(BC)	DR(M2)4R
Db(A)5v	DCe3a(BC)	DR(M2)10
Db(A)5y	DCe4(BC)	DR(M3)1
Db(c/b)1	DCe6(BC)	DR(M3)1R
Db(c/b)2	DCe7(BC)	DR(M3)6R
Db(c/b)3	DCe3(Fub)	DCe4(ASW)
Db(c/b)4	DCe6(Fub)	Db(M2)3
Db(c/b)5	DCe7(Fub)	Db(M2)4
Db(c/b)7	DCe7a(Fub)	Db(M2)6
Db(c/b)8	DCe8(Fub)	Db(M2)7
Db(c/b)9	DCe9(Fub)	Db(M3)1
Db(c/b)11	DLM2%2B	Db(M3)2 ^a
Db(c/b)12	DLM2%4B	Db(M3)3
Db(c/b)13	DLM2%6B	Db(M3)6
Db(c/b)15	DLM2%8B	Db(M3)7
Db(c/b)17	DLM2%11B	DCe1(ASW)
Db(c/b)18	DLM2%13B	DCe2(ASW)
Db(c/b)19	DLM2%14B	DCe3(ASW)
Db(c/b)20	DLM2%15B	DCe8(ASW)
Db(c/b)22	DLM2%16B	DCe1(BC)
Db(F)1	DLM2%17B	DLM3%8B
Db(F)2	DLM2%18B	DLM3%9 A
Db(F)4	DLM3%1B	DLM3%9B
Db(F)6	DLM3%2B	DLM3%10B
Db(M2)1b	DLM3%3B	DLM3%11B
Db(M2)1c	DLM3%6B	DLM3%12B
Db(M2)2v	DLM3%7B	DLM3%13B
DLM3%14B	DR(A)8	DR(A)4R
DLM3%15 A	DR(F)1	DR(A)6
DLM3%15B	DR(M3)14B	DR(A)8
DR(A)4R	DLM3%15 A	DR(F)1
DR(A)6	DLM3%15B	Ma(Tub) J-MeOH/H2O
DR(M3%) 6 -MeOH	DR(M3%) 6-MeOH/H2O	DR(A) 6- Ac. Etila
Ma(M3%) J-MeOH	Ma(M3%) J-MeOH/H2O	Ma(Tub) J-MeOH

Figura 1. Viabilidade celular em células Raw 264.7 tratadas com compostos marinhos. Células Raw 264.7 foram tratadas com 1,56 a 50µg/ml de (A) DLM33 (B) Dr(M3%)6-MeOH/H₂O e (C) Ma(M3%)J-MeOH durante 1h30 e estimulados com LPS por 24 h. Avaliação da citotoxicidade pelo métodos do MTT. Os dados estão expressos como média (± SEM) de testes quadruplicados. * P <0,05 vs controle (média) e # p <0,05 versus LPS foram considerados estatisticamente significativos. Experimento representativo de 5 experimentos independentes realizados em quadruplicatas.

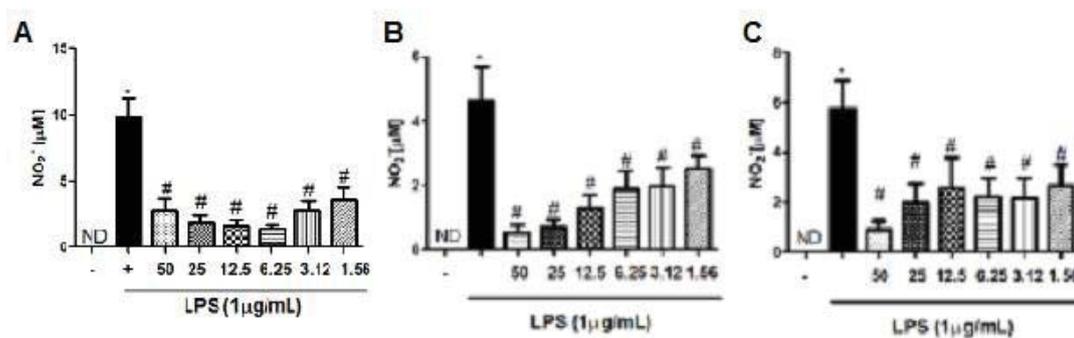


Figura 1. Quantificação da produção de NO em células RAW 264.7 estimuladas com LPS. . Células Raw 264.7 tratadas com 1,56 a 50 µg/ml de (A) DLM33 (B) Dr(M3%)6-MeOH/H₂O e (C) Ma(M3%)J-MeOH durante 1h30 e estimulados com LPS por 24 h. A quantificação de NO foi feita utilizando reagente de Griess. Os dados estão expressos como média (± SEM) de testes quadruplicados. * P < 0,05 vs controle (média) e # p < 0,05 versus LPS foram considerados estatisticamente significativos.

Efeito imunomodulador DLM33, Ma(M3%)J-MeOH e Dr(M3%)6-MeOH/H2O quanto a expressão de moléculas de superfície envolvidas no processo inflamatório

O próximo passo durante o desenvolvimento deste projeto foi avaliar a modulação da expressão de moléculas como Mac-1, CD80 e CD86 em macrófagos da linhagem Raw 264.7 estimuladas com LPS e tratadas com os compostos considerados promissores.

Nossos resultados demonstram que apesar do potente efeito anti-inflamatório observado quanto a inibição da produção de nitrito pela substância Dr(M3%)6-MeOH/H2O, a mesma não se mostrou eficiente quanto a modulação da expressão destas moléculas de adesão e co-estimulação em Raw 264.7 estimuladas com LPS (Tabela 3). O pré-tratamento de macrófagos com Dr(M3%)6-MeOH/H2O promoveu apenas uma modesta inibição tanto na porcentagem de células positivas quanto no número de moléculas (mediana) de Mac-1 e CD80 expressos na superfície de macrófagos estimulados com LPS.

Por outro lado, exceto na concentração de 50 µg/ml, o pré-tratamento de macrófagos com extrato DLM33 foi capaz de inibir a porcentagem de células positivas para CD80 quando comparado com células estimuladas com LPS. No entanto, o pré-tratamento de macrófagos com o extrato DLM33 não foi capaz de inibir a mediana (MIF) das moléculas Mac-1 e CD80 quando comparado com LPS.

Além disso, surpreendentemente, o pré-tratamento dos macrófagos com a substância Ma(M3%)J-MeOH, seguido da estimulação com LPS, resultou no aumento da porcentagem de células duplo positivas (DP), Mac-1+/CD80+, quanto comparado com as células apenas estimuladas com LPS (Figura 3). Estes resultados sugerem que apesar desta substância ter sido eficiente quanto a supressão de nitrito em macrófagos estimuladas com LPS, o mesmo composto parece ter um efeito imunoestimulador.

No entanto, o pré-tratamento de macrófagos com Ma(M3%)J-MeOH não foi capaz de aumentar a porcentagem de células duplo positivas para Mac-1+/CD86+ na presença de LPS (Figura 4).

Tabela 3. Expressão de moléculas de superfície Mac-1, CD80 e CD86 em macrófagos tratados com compostos isolados de microrganismos marinhos.

DLM33	MEIO	LPS	50 µg/mL	25 µg/mL	12,5µg/mL	6,25µg/mL
Mac-1 %	91,1%	74,7%	↓71,8%	↓67,0%	↓71,9%	↓70,2%
MIF Mac-1	1,556	1,105	↓1,057	↓1,047	↓1,086	↓975
CD80 %	80,6%	85,2%	↓82,5%	↓29,9%	↓33,2%	↓21,4%
MIF CD80	1,781	1,220	↑1,188	↑1,846	↑2,056	↑1,687

Dr(M3%)6-MeOH/H ₂ O	MEIO	LPS	50 µg/mL	25 µg/mL	12,5µg/mL	6,25µg/mL
Mac-1 %	91,1%	98,8%	↓89,9%	↓82,2%	↓93,1%	↓93,1%
MIF Mac-1	1,556	1,913	↓1,765	↓1,584	↓1,797	↓1,243
CD80 %	80,6%	80,4%	↑89,8%	↑91,9%	↑85,1%	↓68,1%
MIF CD80	1,781	2,230	↓1,896	↓1,672	↓1,984	↓1,642

Células RAW 264-7 foram tratadas com DLM33 ou Dr(M3%)6-MeOH/H₂O, em diferentes concentrações (6,25 a 50µg/ml) e estimuladas com LPS (1µg/mL) por 18h. Após esse período as células foram avaliadas quanto à expressão de moléculas de superfície como Mac-1/CD80. Os valores foram expressos em porcentagem de células positivas e mediana da intensidade de fluorescência (MIF). As flechas indicam o efeito de DLM33 ou Dr(M3%)6-MeOH/H₂O quanto a modulação negativa ou positiva da porcentagem ou MIF da expressão de Mac-1 e CD80 em macrófagos quando comparado aos valores obtidos pelo tratamento apenas com LPS. Todas as amostras foram adquiridas utilizando a citometria de fluxo (FACSCanto) e as análises foram realizadas utilizando o programa BD FACSDiva™ software.

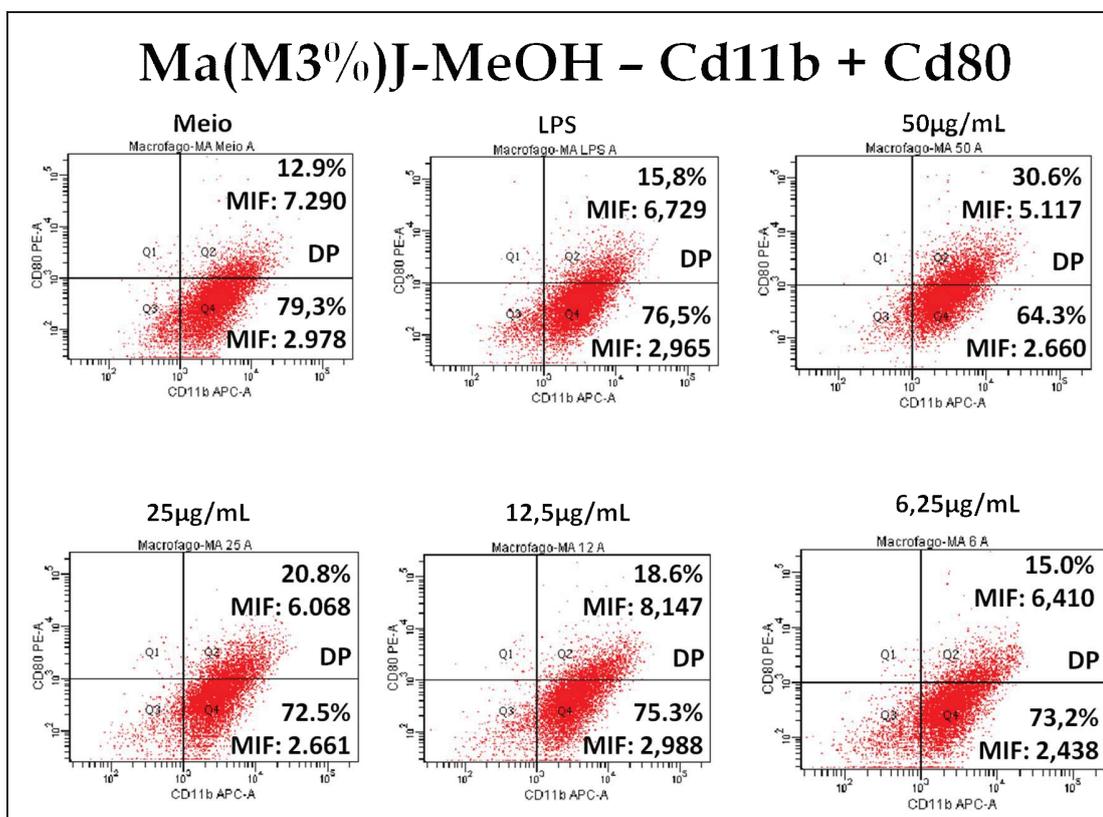


Figura 3. Potencial imunomodulador de Ma(M3%)J-MeOH na modulação da expressão de Mac-1 e CD80 em linhagem de macrófagos. Células RAW 264-7 foram tratadas com Ma(M3%)J-MeOH, em diferentes concentrações (6,25 a 50µg/ml) e estimuladas com LPS (1 µg/mL) por 18h. Após esse período as células foram avaliadas quanto à expressão de moléculas de superfície como Mac-1 e CD80. Os resultados foram expressos como porcentagem de células simples ou duplo positivas e mediana da intensidade da fluorescência (MIF), como demonstrado nos quadrantes acima. Todas as amostras foram adquiridas utilizando o citometria de fluxo (FACSCanto) e as análises foram realizadas utilizando o programa BD FACSDiva™ software. DP: duplo positivas – CD11b+/CD80+.

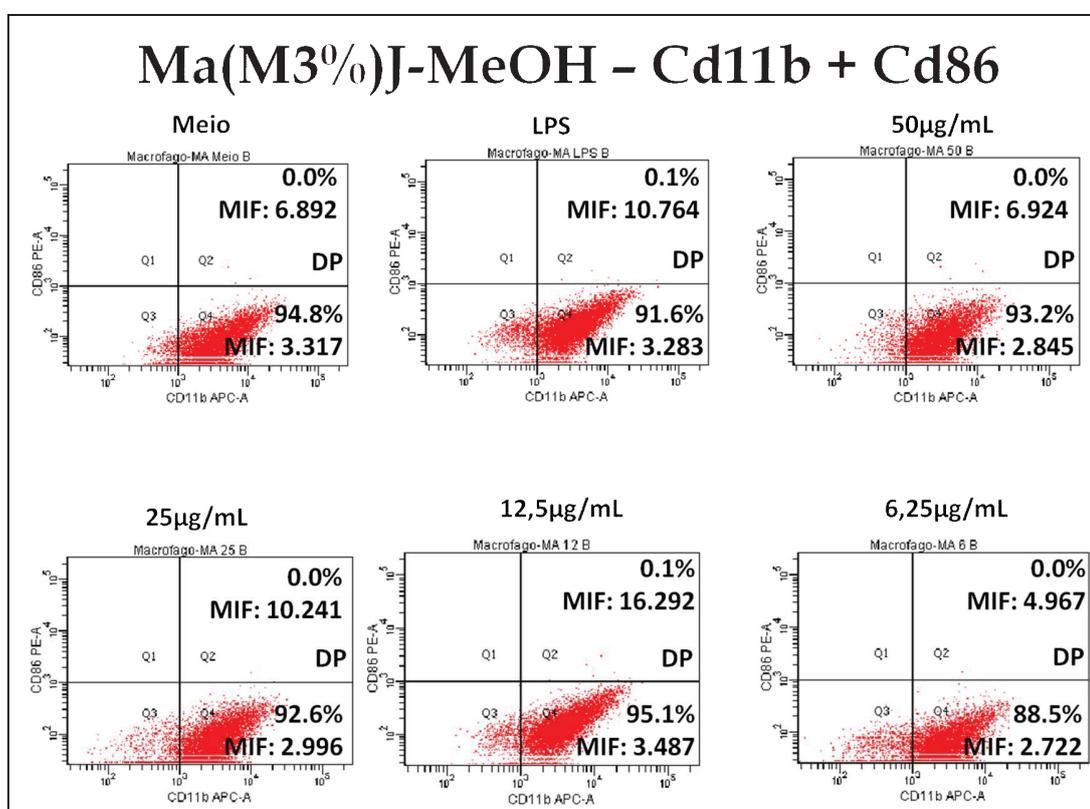


Figura 4. Potencial imunomodulador de Ma(M3%)J-MeOH na modulação da expressão de Mac-1 e CD86 em linhagem de macrófagos. Células RAW 264-7 foram pré-incubadas com Ma(M3%)J-MeOH, em diferentes concentrações (6,25 a 50 µg/ml) e estimuladas com LPS (1 µg/mL) por 18h. Após esse período as células foram avaliadas quanto à expressão de moléculas de superfície como Mac-1 e CD86. Os resultados foram expressos em porcentagem de células simples ou duplo positivas e mediana da intensidade da fluorescência (MIF) como demonstrado nos quadrantes acima. Todas as amostras foram adquiridas utilizando o citometria de fluxo FACSCanto e as análises foram realizadas utilizando o programa BD FACSDiva™ software. DP: duplo positivas CD11b+/CD86+

5. Discussão

O potencial imunomodulador dos compostos avaliados neste projeto foi determinado utilizando ensaio *in vitro* através da quantificação de nitrito no sobrenadante de cultura celular e expressão de moléculas de superfície em linhagem de macrófagos, RAW 264-7. Nossos resultados demonstram que o extrato DLM33 e as substâncias Ma(M3%)J-MeOH e Dr(M3%)6-MeOH/H₂O foram capazes de inibir de maneira concentração-dependente a produção de NO₂ por macrófagos estimulados com LPS. No entanto, quanto a modulação da expressão de moléculas de superfície, DLM33 foi capaz de inibir a porcentagem de células positivas para CD80 e Ma(M3%)J-MeOH promoveu o aumento da porcentagem de células duplo positivas, Mac-1+/CD80+, conferindo a essas substâncias um relevante potencial imunoestimulador em macrófagos.

O recrutamento de células inflamatórias para os locais da inflamação é mediado por moléculas de adesão e quimioatraentes, tais como integrinas como CD11b, selectinas e quimiocinas [30]. A presença de mediadores inflamatórios no microambiente promove o recrutamento de monócitos para o local da inflamação, que diferenciam-se em macrófagos capazes de exercer diversas funções efetoras na presença de um agente agressor, dentre elas fagocitose, destruição de microrganismos e produção de mediadores pró-inflamatórios, anti-inflamatórios/pró-angiogênico. Macrófagos pró-inflamatórios, através da liberação de citocinas, quimiocinas e expressão de moléculas de superfície, promovem o recrutamento e ativação tanto de células da imunidade inata, como neutrófilos, células dendríticas e NK, como de células da reposta imune adaptativa, como linfócitos T e B. Estes mediadores influenciam na expressão de moléculas coestimuladoras em macrófagos e células dendríticas,

como CD80 e CD86, que são imprescindíveis na ativação de células T. Por sua vez, a expressão de CD11b em macrófagos é importante não apenas no recrutamento e ativação celular, mas também na fagocitose de microrganismos. Desta forma, utilizamos como estratégia experimental a análise da expressão de moléculas de superfícies que estão envolvidas tanto em processos de ativação (CD80, CD86) e recrutamento celular (Mac-1), para determinar o potencial imunomodulador das amostras DLM33, Ma(M3%)J-MeOH e Dr(M3%)6-MeOH/H₂O que previamente apresentaram potencial anti-inflamatório quanto a produção de nitrito em macrófagos.

Os resultados apresentados demonstram que a substância pura Dr(M3%)6-MeOH/H₂O não foi capaz modular nem a porcentagem de células positivas tão pouco o número de moléculas (mediana) de Mac-1 e CD80 expressos na superfície de macrófagos estimulados com LPS. As modestas inibições observadas *in vitro*, em que se têm variáveis controladas, podem não ser reproduzidas em modelos *in vivo*. Assim, a substância pura Dr(M3%)6-MeOH/H₂O parece não exercer um efeito biológico relevantes quanto ao potencial anti-inflamatório desta substância.

Por outro lado, o tratamento com o extrato DLM33 foi capaz de inibir a porcentagem de células positivas para CD80 quando comparado com células estimuladas com LPS. Desta forma, podemos sugerir que a inibição da expressão de CD80 pelo tratamento com DLM33 poderia inibir a ativação e subsequente diferenciação de linfócitos T refletindo diretamente na produção de citocinas inflamatórias envolvidas nos processos inflamatórios crônicos. No entanto, esse mesmo tratamento não foi capaz de inibir a mediana (MIF) das moléculas Mac-1 e CD80 quando comparado com LPS. Novos experimentos serão futuramente conduzidos para o entendimento do efeito deste composto na inibição de citocinas, PGE₂ e vias de sinalização em macrófagos.

Seguindo o mesmo protocolo experimental, o tratamento da cultura celular com a substância pura Ma(M3%)J-MeOH demonstrou, de forma inesperada, um efeito

imunoestimulador apesar desta substância ter sido eficiente quanto a supressão de nitrito em macrófagos estimuladas com LPS. Foi observado um aumento na porcentagem de células duplo positivas (DP), Mac-1+/CD80+, quando comparado com as células apenas estimuladas com LPS. Porém, o mesmo não foi observado para células duplo positivas para Mac-1+/CD86+ na presença de LPS. A busca de novos compostos com potencial imunoestimulador é uma área de grande interesse nas empresas farmacêuticas devido ao escasso número moléculas com potencial adjuvante para vacinas. Após 80 anos da descoberta do Alumen este ainda é o adjuvante utilizado na grande maioria das vacinas disponíveis no mercado[32]. Novos experimentos serão conduzidos utilizando diferentes abordagens metodológicas para validar o potencial imunoestimulador de Ma(M3%)J-MeOH em macrófagos estimulados ou não com LPS.

6. Conclusões

Nossos resultados demonstram que na presença de LPS, o extrato DLM33 e as substâncias Ma(M3%)J-MeOH e Dr(M3%)6-MeOH/H₂O foram capazes de inibir a síntese de nitrito por macrófagos. Quanto à modulação de moléculas de superfície, o extrato DLM33 foi capaz de inibir a porcentagem macrófagos positivos para CD80, mas não de Mac-1, na presença de LPS. Estes dados sugerem um efeito anti-inflamatório promissor deste extrato e o mesmo será fracionado para identificação de compostos e substâncias responsáveis pelos efeitos inflamatórios observados. Por outro lado, a substância Dr(M3%)6-MeOH/H₂O não foi capaz de inibir a expressão de moléculas de superfície em macrófagos estimulados com LPS de maneira estatisticamente significativa.

Surpreendentemente, a substância Ma(M3%)J-MeOH apresentou um potencial imunoestimulador quanto a expressão de Mac-1+/CD80+, mas não de CD86, em macrófagos

estimulados com LPS. Esses dados sugerem que a substância Ma(M3%)J-MeOH na presença de um agente ativado, LPS, pode potencializar a ativação de macrófagos quanto ao aumento de CD80 e Mac-1 que sabidamente possuem um papel imprescindível na ativação de linfócitos T e recrutamento celular, respectivamente. O efeito imunoestimulador da substância Ma(M3%)J-MeOH será validado utilizando um outro tipo celular, como células dendríticas, assim como diferentes abordagens metodológicas, como quantificação de citocinas e proliferação de linfócitos, para investigar o potencial adjuvante desta nova substância isolada de microrganismo marinho.

7. Referências Bibliográficas

1. König, G.M., et al., *Natural products from marine organisms and their associated microbes*. *Chembiochem*, 2006. **7**(2): p. 229-38.
2. Paul, V.J., et al., *Chemical defenses: from compounds to communities*. *Biol Bull*, 2007. **213**(3): p. 226-51.
3. Blunt, J.W., et al., *Marine natural products*. *Nat Prod Rep*, 2012. **29**(2): p. 144-222.
4. Mayer, A.M.S., et al., *Marine pharmacology in 2007–8: Marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous system, and other miscellaneous mechanisms of action*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2011. **153**(2): p. 191-222.
5. Menezes, C.B., et al., *Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of Sao Paulo state, Brazil*. *Microbiol Res*, 2009.
6. Newman, D.J. and G.M. Cragg, *Microbial antitumor drugs: natural products of microbial origin as anticancer agents*. *Curr Opin Investig Drugs*, 2009. **10**(12): p. 1280-96.
7. Strangman, W.K., et al., *Potent inhibitors of pro-inflammatory cytokine production produced by a marine-derived bacterium*. *J Med Chem*, 2009. **52**(8): p. 2317-27.
8. Medzhitov, R., *Recognition of microorganisms and activation of the immune response*. *Nature*, 2007. **449**(7164): p. 819-26.
9. Beutler, B.A., *TLRs and innate immunity*. *Blood*, 2009. **113**(7): p. 1399-407.
10. Park, B.S., et al., *The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex*. *Nature*, 2009. **458**(7242): p. 1191-5.
11. Akira, S. and S. Sato, *Toll-like receptors and their signaling mechanisms*. *Scand J Infect Dis*, 2003. **35**(9): p. 555-62.
12. Kumar, H., T. Kawai, and S. Akira, *Toll-like receptors and innate immunity*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009. **388**(4): p. 621-5.
13. Brock, T.G., et al., *Prolonged lipopolysaccharide inhibits leukotriene synthesis in peritoneal macrophages: mediation by nitric oxide and prostaglandins*. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2003. **71**(3-4): p. 131-45.

14. Ghosh, S. and R.K. Saxena, *Early effect of Mycobacterium tuberculosis infection on Mac-1 and ICAM-1 expression on mouse peritoneal macrophages*. *Exp Mol Med*, 2004. **36**(5): p. 387-95.
15. Lee, J.Y., M.H. Rhee, and J.Y. Cho, *Novel modulatory effects of SDZ 62-434 on inflammatory events in activated macrophage-like and monocytic cells*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2008. **377**(2): p. 111-24.
16. Ehlers, M.R., *CR3: a general purpose adhesion-recognition receptor essential for innate immunity*. *Microbes Infect*, 2000. **2**(3): p. 289-94.
17. Schafer, P.H., S.K. Pierce, and T.S. Jardetzky, *The structure of MHC class II: a role for dimer of dimers*. *Semin Immunol*, 1995. **7**(6): p. 389-98.
18. Li, Z., *The alphaMbeta2 integrin and its role in neutrophil function*. *Cell Res*, 1999. **9**(3): p. 171-8.
19. Perera, P.Y., et al., *CD11b/CD18 acts in concert with CD14 and Toll-like receptor (TLR) 4 to elicit full lipopolysaccharide and taxol-inducible gene expression*. *J Immunol*, 2001. **166**(1): p. 574-81.
20. Van Gool, S.W., et al., *CD80, CD86 and CD40 provide accessory signals in a multiple-step T-cell activation model*. *Immunol Rev*, 1996. **153**: p. 47-83.
21. Neumann, J., A.M. Eis-Hubinger, and N. Koch, *Herpes simplex virus type 1 targets the MHC class II processing pathway for immune evasion*. *J Immunol*, 2003. **171**(6): p. 3075-83.
22. Lapaque, N., et al., *Salmonella regulates polyubiquitination and surface expression of MHC class II antigens*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(33): p. 14052-7.
23. Liu, X., et al., *Intracellular MHC class II molecules promote TLR-triggered innate immune responses by maintaining activation of the kinase Btk*. *Nat Immunol*, 2011. **12**(5): p. 416-24.
24. Kuchroo, V.K., et al., *B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy*. *Cell*, 1995. **80**(5): p. 707-18.
25. Lu, P., Y.L. Wang, and P.S. Linsley, *Regulation of self-tolerance by CD80/CD86 interactions*. *Curr Opin Immunol*, 1997. **9**(6): p. 858-62.
26. Bour-Jordan, H., et al., *Intrinsic and extrinsic control of peripheral T-cell tolerance by costimulatory molecules of the CD28/□B7 family*. *Immunological Reviews*, 2011. **241**(1): p. 180-205.
27. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. *J Immunol Methods*, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
28. Lane, T.E., B.A. Wu-Hsieh, and D.H. Howard, *Gamma interferon cooperates with lipopolysaccharide to activate mouse splenic macrophages to an antihistoplasma state*. *Infect Immun*, 1993. **61**(4): p. 1468-73.

29. Medeiros, A.I., et al., *Leukotrienes are potent adjuvant during fungal infection: effects on memory T cells*. J Immunol, 2008. **181**(12): p. 8544-51.
30. Dutra, R.C., et al., *Preventive and therapeutic euphol treatment attenuates experimental colitis in mice*. PLoS One, 2011. **6**(11): p. e27122.
31. van der Plas, M.J., J.T. van Dissel, and P.H. Nibbering, *Maggot secretions skew monocyte-macrophage differentiation away from a pro-inflammatory to a pro-angiogenic type*. PLoS One, 2009. **4**(11): p. e8071.
32. Ulmer, J.B., U. Valley, and R. Rappuoli, *Vaccine manufacturing: challenges and solutions*. Nat Biotechnol, 2006. **24**(11): p. 1377-83.