UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação do potencial imunomodulador sobre o sistema complemento humano de
frações da alga marinha *Bostrychia tenella* e de extratos de micro-organismos
endofíticos associados

Juliana Campos Pereira

Ribeirão Preto
2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação do potencial imunomodulador sobre o sistema Complemento humano de frações da alga marinha *Bostrychia tenella* e de extratos de micro-organismos endofíticos associados

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientada: Juliana Campos Pereira

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Luciana Simon Pereira Crott

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia em 19/10/2012. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E
PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Pereira, Juliana Campos

Avaliação do potencial imunomodulador sobre o Sistema Complemento humano de frações da alga marinha *Bostrychia tenella* e de extratos de micro-organismos endofíticos associados. Ribeirão Preto, 2012.

120p .il; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Pereira-Crott, Luciana Simon

1. Imunomodulação; 2. Sistema Complemento; 3. Algas;
4. Micro-organismos endofíticos; 5. Produtos naturais;
6. *Bostrychia tenella*

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autora: Juliana Campos Pereira

Título do trabalho: Avaliação do potencial imunomodulador sobre o sistema complemento humano de frações da alga marinha *Bostrychia tenella* e de extratos de micro-organismos endofíticos associados

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biociências
Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à
Farmácia

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho, primeiramente, à minha família: meus pais, Marco e Márcia, minha irmã Paula, minha tia Angela e meu namorado Felipe, pois foram eles que me deram todo apoio e força necessários para seguir em frente e nunca desistir.

À minha orientadora, que mais que professora foi minha mãe e amiga, pois compartilhou comigo não só seus conhecimentos, mas um pouco de sua vida. Assim como dedico a todos os colegas de laboratório, que sempre me ajudaram e permitiram que tudo isso fosse possível.

À Cíntia, nossa aluna de iniciação científica, que foi muito mais que uma colega de trabalho. Além de ter se tornado uma grande amiga, tornou-se meu braço direito e foi a grande responsável por eu ter chegado até o fim.

A todos que, de alguma forma, fizeram parte desse trabalho e desse período de minha vida. E, especialmente a Deus, pela força, coragem e por ter sido meu companheiro de todas as horas.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Luciana Simon Pereira Crott, pela confiança, apoio e compreensão.

Aos meus pais, minha irmã e meu namorado, que sempre me incentivaram e estiveram ao meu lado, mesmo com a distância, em todos os momentos, bons e ruins.

À equipe do laboratório de Imunomodulação e Imunologia Clínica, as alunas Andrea, Álex, Cíntia e Lorena, e os funcionários, Tânia e Rubinho, por todo suporte e companheirismo.

Às minhas amigas, Karina e Danielle, cuja amizade ultrapassou a faculdade e permaneceu, assim como aos novos amigos que fiz durante esse período, que trouxeram alegria à minha vida por sua companhia diária.

Aos grandes amigos do laboratório de análises clínicas, José Luis e Carmen, que foram como verdadeiros pais para mim durante todo o tempo em que morei e estudei aqui.

À Prof^a. Dr^a. Hosana Maria Debonsi e seu aluno de doutorado, Rafael de Felício, que doaram suas amostras, seu trabalho e conhecimento para a minha pesquisa.

À Prof^a. Dr^a. Fabíola Attié de Castro, por ter permitido que eu utilizasse seu laboratório para concluir meu trabalho.

Às funcionárias Aninha, do laboratório de Bioquímica, e Luciana, do laboratório de Hematologia, por estarem sempre dispostas a ensinar e ajudar em tudo que fosse preciso.

Aos funcionários do Biotério Central e Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas por terem me ajudado sempre que necessário.

À CAPES pelo apoio financeiro.

E a todos os que colaboraram de alguma maneira para meu trabalho e que fizeram parte de minha vida.

Obrigada!!!

Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos.

Fernando Pessoa

RESUMO

PEREIRA, J.C. **Avaliação do potencial imunomodulador sobre o sistema complemento humano de frações da alga marinha *Bostrychia tenella* e de extratos de micro-organismos endofíticos associados.** 2012. 120f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

A natureza sempre constituiu uma fonte extremamente rica de compostos e substâncias utilizados pelo homem para diferentes fins, principalmente na área médica, pois os produtos naturais abrangem uma variedade de agentes terapêuticos para diversas doenças, como moléstias infecciosas, câncer, desordens lipídicas e imunológicas. Com a necessidade de se encontrar novos fármacos, tanto para doenças bem definidas, quanto para novas doenças, a pesquisa de substâncias com atividades biológicas torna-se fundamental. Fontes exóticas como o ambiente marinho e, recentemente o universo dos micro-organismos, ganharam grande interesse no meio científico devido ao fato de terem sido pouco conhecidas e exploradas. Nesse contexto, o objetivo desse estudo foi avaliar se diferentes frações da macroalga marinha *Bostrychia tenella* e extratos de micro-organismos endofíticos isolados dessa mesma espécie possuíam atividade imunomoduladora sobre o sistema complemento (SC) humano, que é reconhecido como um dos maiores efetores do processo inflamatório. Iniciado por três vias distintas (clássica, alternativa e das lectinas), ele leva à formação de produtos de clivagem e complexos de ativação que exercem diferentes funções biológicas importantes, como quimiotaxia, ativação de fagócitos, desgranulação de mastócitos, citólise, ativação celular e apoptose. Sendo assim, este sistema desempenha papel importante em várias reações inflamatórias, bem como em diferentes mecanismos patogênicos de dano tecidual. Através do ensaio de atividade hemolítica, 10 das 20 amostras iniciais foram selecionadas por modularem esta atividade do SC no pool de soro humano normal (SHN). As 10 amostras (dentre frações, subfrações e extratos de *B. tenella* e seus micro-organismos endofíticos) foram capazes de induzir a geração de fragmentos de C3, componente central do SC, observados tanto em técnicas imunoeletroforéticas, quanto em Western blotting. Também, observou-se a formação do complexo de ataque à membrana (MAC) em ensaio imunoenzimático, indicando que houve ativação total do SC. Através dos resultados obtidos no Western blotting para fragmentos de C4 e Fator B foi possível identificar quais vias do SC são ativadas, quando correlacionados com os resultados dos ensaios hemolíticos para via clássica/das lectinas (VC/VL) e via alternativa (VA). Desse modo, foi possível concluir que as 10 amostras selecionadas possuem efeito imunomodulador sobre o SC humano por serem capazes de ativá-lo, seja pela VC/VL ou pela VA. Conclui-se, também, que o ensaio hemolítico cinético constitui uma importante ferramenta de triagem, assim como o Western blotting do SHN para detecção de fragmentos do SC.

Palavras-chave: imunomodulação, sistema complemento, algas, micro-organismos endofíticos, produtos naturais, *Bostrychia tenella*.

ABSTRACT

PEREIRA, J.C. **Evaluation of the immunomodulatory potential of marine algae *Bostrychia tenella* fractions and extracts from associated endophytic micro-organisms on the human complement system.** 2012. 120f. Master. Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto – University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Nature has always provided an extremely rich source of compounds and substances used by man for various purposes, mainly in the medical field because natural products include a variety of therapeutic agents for various diseases such as infectious diseases, cancer, lipid and immune disorders. With the need to find new drugs for either well defined diseases as for new ones, the search for substances with biological activities becomes essential. Exotic sources such as marine environment, and recently the world of micro-organisms have gained great interest in the scientific community due to the fact that they were little known and explored. In this context, the objective of this study was to assess whether different fractions of marine macroalgae *Bostrychia tenella* and extracts of endophytic micro-organisms isolated from this species possess immunomodulatory activity on the human complement system (CS), which is recognized as one of the major effectors of the inflammatory process. Started by three distinct pathways (classical, alternative and lectin), it leads to the formation of cleavage products and activation complexes which have various important biological functions such as chemotaxis, activation of phagocytes, mast cell degranulation, cytolysis, cellular activation and apoptosis. Thereby, this system plays an important role in various inflammatory reactions, as well as various pathogenic mechanisms of tissue damage. Through the hemolytic activity assays, 10 of the initial 20 samples were selected because they were able to modulate this activity of the CS in the pool of normal human serum (NHS). The 10 samples (among fractions, subfractions and extracts of *B. tenella* and its endophytic micro-organisms) were able to induce the generation of fragments from C3, a central component of the CS, which was observed both in immuno electrophoresis technique and Western blotting. Also, we observed the formation of the membrane attack complex (MAC) in enzyme immunoassay, indicating that there was total activation of the CS. By the results obtained in Western blotting for fragments of C4 and Factor B was possible to identify which pathways are activated in CS, when correlated with the results of hemolytic assays for the classical/lectin (VC/VL) and alternative pathway (VA). Thus, we conclude that the 10 selected samples have immunomodulatory effects in human CS because they were able to activate it either by VC/VL or VA. It follows also that the hemolytic assay by the kinetic method is an important tool for screening, as well as Western blotting of NHS to detect fragments of the CS.

Keywords: immunomodulation, complement system, seaweed, endophytic micro-organisms, natural products, *Bostrychia tenella*.

RESUMEN

PEREIRA, J.C. **Evaluación del potencial inmunomodulador de fracciones de la alga marina *Bostrychia tenella* y extractos de microorganismos endófitos asociados en el sistema del complemento humano.** 2012. 120f. Disertación. Facultad de Ciencias Farmacéuticas de Ribeirão Preto – Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

La naturaleza siempre ha sido una fuente muy rica de compuestos y sustancias utilizadas por el hombre para diversos fines, principalmente en el campo de la medicina ya que los productos naturales comprenden una variedad de agentes terapéuticos para diversas enfermedades como las enfermedades infecciosas, cáncer, trastornos de los lípidos y inmunológicas. Con la necesidad de buscar nuevos medicamentos, tanto para enfermedades bien definidas, como para nuevas enfermedades, la investigación de sustancias con actividad biológica se convierte en esencial. Fuentes exóticas como el ambiente marino, y recientemente el universo de los microorganismos han adquirido gran interés en la comunidad científica debido al hecho de que eran poco conocidos y explorados. En este contexto, el objetivo del presente estudio fue evaluar si las diferentes fracciones de macroalga marina *Bostrychia tenella* y extractos endófitos de microorganismos aislados de esta misma especie posee actividad inmunomoduladora del sistema del complemento (SC) humano, que es reconocido como uno de los mayores efectores del proceso inflamatorio. Empezando por tres vías distintas (clásica, alternativa y lectina), el SC conduce a la formación de productos de escisión y complejos de activación ejerciendo diferentes funciones biológicas importantes, tales como quimiotaxis, activación de fagocitos, desgranulación de mastocitos, citolisis, activación celular y apoptosis. Por lo tanto, este sistema desempeña un papel importante en varias reacciones inflamatorias, así como en diferentes mecanismos patogénicos de daño tisular. A través de la actividad hemolítica, 10 de las 20 muestras iniciales fueron seleccionadas por modular la actividad del SC en el pool de suero humano normal (SHN). Las 10 muestras (entre fracciones y subfracciones y extractos de *B. tenella* y sus microorganismos endofíticos) fueron capaces de inducir la generación de fragmentos de C3, un componente central del SC, observados tanto en técnicas inmunoelctroforéticas cuanto en Western blotting. Además, se observó la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC) en inmunoensayo enzimático, indicando que ocurrió activación total de SC. A través de los resultados de Western blotting para fragmentos de C4 y Factor B fue posible identificar que vías activan el SC, cuando se correlaciona con los resultados de los ensayos hemolíticos de las vías clásica / de las lectinas (VC / VL) y alternativa (VA). Por lo tanto, es posible concluir que las 10 muestras seleccionadas tienen potencial inmunomodulador sobre el SC humano, por tener la capacidad de activarlo, sea por VC/VL o VA. Así, se concluye también que el ensayo hemolítico cinético es una herramienta importante para la selección de muestras, tanto como el Western blotting do SHN para detectar fragmentos del SC.

Palabras clave: inmunomodulación, sistema del complemento, algas, microorganismos endofíticos, productos naturales, *Bostrychia tenella*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo das vias de ativação do Sistema Complemento ...	4
Figura 2. Efeitos celulares do complexo de ataque à membrana (MAC)..	5
Figura 3. Esquema representativo das três vias de ativação do sistema complemento e de suas proteínas regulatórias.....	7
Figura 4. Distribuição mundial da espécie de macroalga <i>Bostrychia tenella</i>	13
Figura 5. Espécie de macroalga <i>Bostrychia tenella</i>	14
Figura 6. Desenho experimental do estudo proposto para avaliar a atividade imunomoduladora no SC humano das frações e subfrações da macroalga <i>Bostrychia tenella</i> e extratos de micro-organismos endofíticos associados.....	22
Figura 7. Fracionamento do extrato metanólico de <i>Bostrychia tenella</i>	27
Figura 8. Gráfico representativo da cinética de lise das hemácias através do sistema complemento.	35
Figura 9. Fórmula utilizada para calcular a porcentagem de inibição das amostras através dos valores de t1/2 do SHN	35
Figura 10. Esquema da metodologia de imunoeletroforese bidimensional para análise da geração de fragmentos de C3.....	37
Figura 11. Perfis obtidos para os controles negativo e positivo na imunoeletroforese bidimensional para análise da geração do fragmento C3b.....	38
Figura 12. Valores médios de t1/2 no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações da fração BT-Aq de <i>B. tenella</i> na VC/VL.....	45
Figura 13. Valores médios de t1/2 no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações da fração BT-B de <i>B. tenella</i> na VC/VL.....	45
Figura 14. Valores médios de t1/2 no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações da fração BT-H de <i>B. tenella</i> na VC/VL.....	46
Figura 15. Valores médios de t1/2 no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações da fração BT-M de <i>B. tenella</i> na VC/VL	46
Figura 16. Valores médios de t1/2 no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações da subfração BTH-A de <i>B. tenella</i> na VC/VL	47
Figura 17. Valores médios de t1/2 no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações da subfração BTH-AM de <i>B. tenella</i> na VC/VL.....	47
Figura 18. Valores médios de t1/2 no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações da subfração BTH-D de <i>B. tenella</i> na VC/VL	48

Figura 19. Valores médios de t1/2 no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações da subfração BTH-H de <i>B. tenella</i> na VC/VL	48
Figura 20. Valores médios de t1/2 no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações da subfração BTH-HD de <i>B. tenella</i> na VC/VL.....	49
Figura 21. Valores médios de t1/2 no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações da subfração BTH-M de <i>B. tenella</i> na VC/VL.....	49
Figura 22. Valores médios de t1/2 no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações do extrato T06 de micro-organismos endofíticos isolados da macroalga <i>B. tenella</i> na VC/VL	50
Figura 23. Valores médios de t1/2 no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações do extrato T65 de micro-organismos endofíticos isolados da macroalga <i>B. tenella</i> na VC/VL	50
Figura 24. Valores médios de t1/2 no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações do extrato T66 de micro-organismos endofíticos isolados da macroalga <i>B. tenella</i> na VC/VL	51
Figura 25. Valores médios de t1/2 no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações do extrato T67 de micro-organismos endofíticos isolados da macroalga <i>B. tenella</i> na VC/VL	51
Figura 26. Valores médios de t1/2 no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações do extrato T68 de micro-organismos endofíticos isolados da macroalga <i>B. tenella</i> na VC/VL	52
Figura 27. Valores médios de t1/2 no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações do extrato T69 de micro-organismos endofíticos isolados da macroalga <i>B. tenella</i> na VC/VL	52
Figura 28. Valores médios de t1/2 no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações do extrato T70 de micro-organismos endofíticos isolados da macroalga <i>B. tenella</i> na VC/VL	53
Figura 29. Valores médios de t1/2 no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações do extrato T71 de micro-organismos endofíticos isolados da macroalga <i>B. tenella</i> na VC/VL	53
Figura 30. Valores médios de t1/2 no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações do extrato T72 de micro-organismos endofíticos isolados da macroalga <i>B. tenella</i> na VC/VL	54
Figura 31. Valores médios de t1/2 no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações do extrato T73 de micro-organismos endofíticos isolados da macroalga <i>B. tenella</i> na VC/VL	54
Figura 32. Gráfico da porcentagem de inibição <i>versus</i> a concentração da amostra (µg/mL) que permite calcular o valor da IC50.	56

Figura 33. Valores médios de $t_{1/2}$ no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações da fração BT-Aq de <i>B. tenella</i> na VA.	58
Figura 34. Valores médios de $t_{1/2}$ no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações da fração BT-B de <i>B. tenella</i> na VA.	58
Figura 35. Valores médios de $t_{1/2}$ no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações da fração BT-H de <i>B. tenella</i> na VA.	59
Figura 36. Valores médios de $t_{1/2}$ no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações da fração BT-M de <i>B. tenella</i> na VA.	59
Figura 37. Valores médios de $t_{1/2}$ no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações da subfração BTH-A de <i>B. tenella</i> na VA.	60
Figura 38. Valores médios de $t_{1/2}$ no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações da subfração BTH-AM de <i>B. tenella</i> na VA.	60
Figura 39. Valores médios de $t_{1/2}$ no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações da subfração BTH-D de <i>B. tenella</i> na VA.	61
Figura 40. Valores médios de $t_{1/2}$ no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações da subfração BTH-H de <i>B. tenella</i> na VA.	61
Figura 41. Valores médios de $t_{1/2}$ no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações da subfração BTH-HD de <i>B. tenella</i> na VA.	62
Figura 42. Valores médios de $t_{1/2}$ no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações da subfração BTH-M de <i>B. tenella</i> na VA.	62
Figura 43. Valores médios de $t_{1/2}$ no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações do extrato T06 de micro-organismos endofíticos isolados da macroalga <i>B. tenella</i> na VA.	63
Figura 44. Valores médios de $t_{1/2}$ no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações do extrato T65 de micro-organismos endofíticos isolados da macroalga <i>B. tenella</i> na VA.	63
Figura 45. Valores médios de $t_{1/2}$ no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações do extrato T66 de micro-organismos endofíticos isolados da macroalga <i>B. tenella</i> na VA.	64
Figura 46. Valores médios de $t_{1/2}$ no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações do extrato T67 de micro-organismos endofíticos isolados da macroalga <i>B. tenella</i> na VA.	64
Figura 47. Valores médios de $t_{1/2}$ no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações do extrato T68 de micro-organismos endofíticos isolados da macroalga <i>B. tenella</i> na VA.	65

Figura 48. Valores médios de t1/2 no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações do extrato T69 de micro-organismos endofíticos isolados da macroalga <i>B. tenella</i> na VA.....	65
Figura 49. Valores médios de t1/2 no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações do extrato T70 de micro-organismos endofíticos isolados da macroalga <i>B. tenella</i> na VA.....	66
Figura 50. Valores médios de t1/2 no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações do extrato T71 de micro-organismos endofíticos isolados da macroalga <i>B. tenella</i> na VA.....	66
Figura 51. Valores médios de t1/2 no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações do extrato T72 de micro-organismos endofíticos isolados da macroalga <i>B. tenella</i> na VA.....	67
Figura 52. Valores médios de t1/2 no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações do extrato T73 de micro-organismos endofíticos isolados da macroalga <i>B. tenella</i> na VA.....	67
Figura 53. Perfis obtidos na IEFbi para C3 e seu fragmento C3b no SHN tratado com as amostras BT-Aq e T72, juntamente com seus controles negativo e positivo.....	73
Figura 54. Perfis obtidos na IEFbi para C3 e seu fragmento C3b no SHN tratado com as amostras BT-H e BTH-AM, juntamente com seus controles positivo e negativo.....	73
Figura 55. Perfis obtidos na IEFbi para C3 e seu fragmento C3b no SHN tratado com as amostras BTH-M e T65, juntamente com seus controles positivo e negativo.....	73
Figura 56. Perfis obtidos na IEFbi para C3 e seu fragmento C3b no SHN tratado com as amostras BTH-D e BTH-A, juntamente com seus controles positivo e negativo.....	74
Figura 57. Perfis obtidos na IEFbi para C3 e seu fragmento C3b no SHN tratado com as amostras T68 e T73.....	74
Figura 58. Perfis obtidos na IEFbi para C3 e seu fragmento C3b no SHN tratado com o dobro da IC50 das amostras T68 e T73.....	75
Figura 59. Análise por Western blotting da proteína C3 e seus fragmentos	77
Figura 60. Ilustração esquemática da proteína de C3 e seus produtos de clivagem.	78
Figura 61. Análise por Western blotting da proteína C4 e seus fragmentos.	80
Figura 62. Análise por Western blotting da proteína Fator B e seus fragmentos	82

Figura 63. Análise da geração e quantificação dos complexos SC5b-9 através de ensaio imunoenzimático	84
Figura 64. Ensaio hemolítico da VC/VL para análise do DMSO 1% no SHN.	114
Figura 65. Ensaio hemolítico da VA para análise do DMSO 1% no SHN.	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Subfrações obtidas a partir do fracionamento de BT-H - fração hexânica de <i>Bostrychia tenella</i>	28
Tabela 2. Identificação das linhagens dos micro-organismos endofíticos selecionados	29
Tabela 3. Frações, subfrações e extratos de <i>Bostrychia tenella</i> e micro-organismos endofíticos associados.....	31
Tabela 4. Média dos valores de IC50 ($\mu\text{g/mL}$) das amostras que apresentaram mais de 50% de inibição do SC através da VC/VL.....	56
Tabela 5. Valores de IC50 ($\mu\text{g/mL}$) das amostras que apresentaram mais de 50% de inibição do SC através da VA.....	69
Tabela 6. Seleção das amostras após a triagem realizada pelos ensaios de atividade hemolítica (método cinético) na VC/VL e na VA.	70
Tabela 7. Quantificação das bandas de interesse obtidas na membrana de Western blotting para análise dos fragmentos de C3.....	77
Tabela 8. Quantificação das bandas de interesse obtidas na membrana de Western blotting para análise dos fragmentos de C4.	80
Tabela 9. Quantificação das bandas de interesse obtidas na membrana de Western blotting para análise dos fragmentos de Fator B no SHN tratado com as frações, subfrações e extratos.	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AHUS	do inglês “ <i>Atypical haemolytic uraemic syndrome</i> ” ou Síndrome Urêmica Hemolítica Atípica
DAB	do inglês “ <i>diaminobenzidine tetrahydrochloride-dihydrate</i> ” ou diaminobenzidina tetrahidroclorido diidratado
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetraacético
EGTA	Ácido etilenoglicol tetracético
ELISA	do inglês “ <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> ” ou enzimaímunoensaio
IEFbi	Imunoeleetroforese bidimensional
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
LPS	Lipopolissacarídeos
MAC	do inglês “ <i>membrane attack complex</i> ” ou complexo de ataque à membrana
MASP	do inglês “ <i>MBL-associated serineproteases</i> ” ou serinoproteases associadas à MBL
MBL	do inglês “ <i>mannose binding lectin</i> ” ou lectina/proteína ligante de manose
PBS	Tampão fosfato-salina
PVDF	do inglês “ <i>polyvinylidene difluoride</i> ”
ROS	do inglês “ <i>reactive oxygen species</i> ” ou espécies reativas do oxigênio
SC	Sistema complemento
SHN	Soro humano normal
TEA	Trietanolamina
VA	Via Alternativa
VC	Via Clássica
VL	Via das Lectinas
WB	Western blotting
ZY	Zymosan

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
RESUMEN	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	x
1. INTRODUÇÃO	2
1.1 Sistema Complemento	2
1.2 Produtos naturais	8
1.3 Algas marinhas.....	10
1.4 Gênero <i>Bostrychia</i>	12
1.5. Micro-organismos endofíticos.....	14
1.6 Algas marinhas, micro-organismos endofíticos e o sistema complemento	16
2. OBJETIVOS.....	20
2.1. Geral.....	20
2.2. Específicos	20
3. DESENHO EXPERIMENTAL.....	22
4. CASUÍSTICA	24
5. MATERIAIS E MÉTODOS	26
5.1. Macroalga <i>Bostrychia tenella</i>	26
5.1.1. Coleta, obtenção e fracionamento dos extratos	26
5.1.2. Subfracionamento da fração BT-H	28
5.2. Micro-organismos endofíticos.....	28
5.2.1. Coleta e obtenção dos extratos	28
5.3. Preparo das amostras	30
5.4. Animais.....	32
5.5. Avaliação da atividade imunomoduladora das frações e subfrações da macroalga <i>Bostrychia tenella</i> e extratos de micro-organismos endofíticos associados sobre o sistema complemento humano	32

5.5.1. Via Clássica/Via das Lectinas	32
5.5.2. Via Alternativa	33
5.5.3. Ensaios de atividade hemolítica (Método Cinético)	33
5.5.4. Imunoeletroforese bidimensional para análise da geração do fragmento C3b a partir do componente C3	35
5.5.5. Western blotting para determinação da formação de fragmentos de C3, C4 e Fator B	38
5.5.6. Análise da capacidade de geração de complexos terminais SC5b-9	39
5.6. Análise Estatística	40
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
6.1. Ensaios de atividade hemolítica	42
6.1.1. Via Clássica/Via das Lectinas	44
6.1.2. Via Alternativa	57
6.2. Imunoeletroforese bidimensional para geração de fragmento C3b	72
6.3. Western blotting para análise dos fragmentos de C3, C4 e Fator B	76
6.3.1. Análise de C3	77
6.3.2. Análise de C4	80
6.3.3. Análise de fator B	82
6.4. Ensaio imunoenzimático para análise do complexo SC5b-9	84
7. CONCLUSÃO	91
REFERÊNCIAS	944
APÊNDICES	108
APÊNDICE A – Soluções e tampões	108
APÊNDICE B – Padronização do solvente DMSO 1% PBS	113
ANEXOS	117
ANEXO A – Certificado CEP/FCFRP	117
ANEXO B – Certificado CEUA	118
ANEXO C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	119

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Sistema Complemento

O sistema complemento (SC) é composto por aproximadamente 30 proteínas séricas e de superfície celular, que interagem entre si e com outras moléculas do sistema imunológico de uma maneira altamente regulada, para gerar produtos que eliminem os micro-organismos (ABBAS et al., 2008; WAGNER; FRANK, 2010; WALPORT, 2001).

Normalmente, as proteínas estão inativas, mas são ativadas sob condições particulares para executar várias funções efetoras do complemento. A sua ativação pode ocorrer por três vias distintas, dependendo do estímulo inicial que desencadeia essa resposta. São elas: via clássica (VC), alternativa (VA) e das lectinas (VL).

A VC é ativada quando o complexo C1q, composto por uma molécula de C1q, duas de C1r e duas de C1s, liga-se a uma molécula de anticorpo complexada com um antígeno (imunocomplexo) (CERIBELLI et al., 2009), ou a estruturas como lipopolissacarídeos (LPS) e proteína C reativa (PARALARASAH et al., 2011), provocando-lhe modificações estruturais que causarão a clivagem das moléculas de C2 e C4 nos seguintes fragmentos: C2a, C2b, C4a e C4b, respectivamente.

O fragmento C4b da molécula de C4 liga-se ao fragmento C2a, formando o complexo enzimático C4b2a, chamado de C3 convertase da VC. Esse complexo é responsável pela clivagem das moléculas de C3, componente central das três vias do SC. A partir da clivagem de C3 são formados os fragmentos C3a e C3b.

A VA depende, fundamentalmente, da presença do fragmento C3b gerado pela VC, ou por hidrólise espontânea do próprio C3, para ser ativada (PARALARASAH et al., 2011). Ela se inicia com a ligação covalente de moléculas de C3b a grupos hidroxila de carboidratos e proteínas presentes na superfície das células.

O C3b neoformado é protegido da ação de fatores inativadores pela sua ligação ao Fator B, uma proteína análoga de C2. Após ligar-se ao C3b, o Fator B é clivado pelo Fator D, formando a enzima C3bBb (C3 convertase da VA), capaz de clivar moléculas de C3 e amplificar a resposta (CERIBELLI et al., 2009).

A enzima C3 convertase da VA (C3bBb) recém-formada é bastante instável, possuindo meia-vida de cerca de 2 a 3 minutos. Por esse motivo, ela associa-se à properdina, uma proteína cuja ação é estabilizar e retardar a dissociação do complexo C3bBb e estimula a atividade da VA do SC (CARROL, 2004; CARROL; SIM, 2011).

A VL foi a última a ser descoberta, e inicia-se através do reconhecimento de carboidratos presentes na superfície de micro-organismos pela proteína plasmática ligante de manose (MBL - *mannose binding lectin*), juntamente com as serinoproteases associadas à MBL, MASP 1 e 2 (*MBL-associated serine proteases*) (CERIBELLI et al., 2009). A MBL é estruturalmente semelhante à molécula de C1q e, por esse motivo, a VL é semelhante à VC, envolvendo também as moléculas de C2 e C4, com posterior formação do complexo C3 convertase (C4b2a), sendo difícil avaliá-las separadamente nos ensaios (CARROLL, 2004; TURNER, 1996).

A MASP-1 cliva C3 diretamente, resultando na ativação da VA, enquanto a MASP-2 cliva moléculas de C4 e C2 para formar a C3 convertase C4b2b, ponto em que converge com a VC. É por esse motivo que é difícil diferenciar a VC da VL nos ensaios cujo objetivo é determinar a atividade dessas vias. Já as funções da MASP-3 permanecem, ainda, desconhecidas (CARROL, 2004; CARROL; SIM, 2011; TURNER, 1996).

A partir da formação do complexo C3 convertase, as três vias tornam-se iguais, seguindo uma via comum na qual ocorre a clivagem de mais moléculas de C3 e a formação de um novo complexo: C5 convertase (C4a2a3b na VC e VL, e C3bBb3b na VA). Esse novo complexo vai clivar moléculas de C5 dando origem aos fragmentos C5a e C5b, que possui uma conformação capaz de ligar as últimas proteínas do SC (C6, C7, C8 e C9), resultando na formação do complexo de ataque à membrana (MAC - *Membrane Attack Complex*) (ABBAS et al., 2008).

As proteínas C6, C7, C8 e C9 são relacionadas estruturalmente e não possuem atividade enzimática. O C7 é hidrofóbico e se insere na membrana lipídica, tornando-se um receptor de alta afinidade para o C8. O último a se ligar é o C9 que tem a propriedade de se polimerizar ao se ligar às outras proteínas. Até a ligação do C8, a capacidade de lise do complexo é limitada. A partir da junção do C9, o MAC é capaz de formar verdadeiros poros na membrana à qual está inserido, permitindo a livre passagem de água e íons, provocando edema osmótico e ruptura das células (CARROL; SIM, 2011).

Portanto, como se pode observar, a ativação do SC envolve uma proteólise sequencial, isto é, uma cascata enzimática capaz de gerar mais complexos enzimáticos proteolíticos numa resposta rápida e extremamente amplificada. O resultado é a formação de produtos com atividades biológicas, como anafilaxia, quimiotaxia, opsonização, remoção de imunocomplexos e modulação da resposta imune (WALPORT, 2001).

A Figura 1 resume as vias de ativação, componentes e propriedades biológicas do SC e a Figura 2 exemplifica outros efeitos do MAC além da lise osmótica:

Figura 1 – Esquema representativo das vias de ativação do SC, adaptado de JANEWAY et al., 2002.

Figura 2 – Efeitos celulares do complexo de ataque à membrana (MAC), adaptado de COLE; MORGAN, 2003.

A ativação do SC por qualquer uma das três vias leva à formação de produtos de clivagem que são importantes na quimiotaxia e ativação de fagócitos, na opsonização de micro-organismos invasores, na resposta inflamatória contra patógenos e na remoção de imunocomplexos.

As anafilatoxinas C3a, C4a e C5a são mediadores pró-inflamatórios em processos inflamatórios locais (HAAS; STRIP, 2007), induzindo a quimiotaxia de leucócitos, desgranulação de fagócitos, mastócitos e basófilos, contração do músculo liso e aumento da permeabilidade vascular. A resposta inflamatória é amplificada, ainda, pela geração subsequente de radicais de oxigênio (ROS), e indução da síntese e liberação de metabólitos do ácido araquidônico e citocinas (MASTELLOS et al., 2005).

Na opsonização, fragmentos de C3b e C4b ligam-se covalentemente à superfície dos micro-organismos, auxiliando o processo de fagocitose e eliminação dos patógenos, já que os fagócitos possuem receptores para as opsoninas e, assim, encontram mais rapidamente seu alvo. Outro evento importante é a clivagem

adicional de C3b que produz os fragmentos C3d e C3dg, envolvidos na modulação da resposta imune inata e adaptativa (DUNKELBERGER; SONG, 2010).

Desse modo, é notável que o SC possui papel importante em várias reações inflamatórias, agudas e crônicas, sendo essencial na imunidade inata do indivíduo. Recentemente, foi reconhecido como forte atuante em várias condições patológicas, e o interesse em encontrar substâncias capazes de modular esse sistema, foi renovado, já que poucos foram aprovados para uso clínico (WAGNER; FRANK, 2010).

A ativação excessiva do complemento está relacionada com diferentes estados patológicos, incluindo desordens renais, vasculares, neurológicas, alérgicas e infecciosas. Nessas condições, o SC é ativado por anticorpos anormais que reagem contra antígenos próprios, formando imunocomplexos que se ligam ao componente C1q da VC. Um exemplo bem estudado desse tipo de situação é o lúpus eritematoso sistêmico (LES), no qual anticorpos reagem contra diferentes componentes intra e extracelulares do próprio organismo, ativando o sistema complemento e causando danos teciduais nos rins, pele ou outros órgãos (ALEGRETTI et al., 2012; ORNSTEIN; ATKINSON; DENSEN, 2012; WAGNER; FRANK, 2010; WALPORT, 2001).

Em outras situações, podem ocorrer doenças relacionadas com a ativação do SC devido à ausência, ou defeitos, nas proteínas diversas proteínas que compõem seu sistema regulatório, como por exemplo, Fator I, Fator H, MCP, DAF, *Serping 1*, entre outras (ALEGRETTI et al., 2012; MAYILYAN, 2012; PIDDE-QUEIROZ et al., 2010; THURMAN; RENNER, 2011) (Figura 3). É o caso da Síndrome Urêmica Hemolítica Atípica (AHUS), na qual ocorre ativação desregulada do complemento nos rins, causada por defeitos na proteína regulatória Fator I (ALEGRETTI et al., 2012; LOIRAT; FRÉMEAUX-BACCHI, 2011; WAGNER; FRANK, 2010).

Nessas condições, o SC passa a atuar em diferentes mecanismos de dano tecidual associado a doenças autoimunes, isquêmicas e intervenções terapêuticas (KIRSCHFINK, 2001; MORGAN; HARRIS, 2003), podendo ser o principal contribuinte na iniciação, amplificação ou perpetuação do dano tissular (MORGAN; HARRIS, 2003; MASTELLOS et al., 2005).

Figura 3 – Esquema representativo das três vias de ativação do sistema complemento e de suas proteínas regulatórias. Fonte: WAGNER; FRANK, 2010.

Outro aspecto a ser considerado na importância de modular o SC está no fato dele participar de forma eficiente na imunidade inata do organismo, através da eliminação de patógenos. Deficiências relacionadas aos componentes do SC, embora sejam raras, são a causa de infecções bacterianas recorrentes, especialmente aquelas envolvendo micro-organismos encapsulados (KOZLOV et al., 2011; MAYILYAN, 2012; WAGNER; FRANK, 2010, WALPORT, 2001).

Portanto, é por considerar todos os papéis que o SC desempenha que existe um grande interesse no meio científico e na área médica de encontrar substâncias ou compostos capazes de modular esse sistema, de acordo com a condição patológica na qual ele atua.

1.2 Produtos naturais

Considerando a busca pelo tratamento de determinadas doenças, bem como a necessidade de encontrar fármacos mais eficientes, ou com menores efeitos colaterais, o meio científico está sempre investigando novos agentes terapêuticos.

Nesse cenário, a natureza sempre apareceu como uma fonte extremamente rica de substâncias, pois os produtos naturais abrangem uma grande variedade de agentes terapêuticos para doenças infecciosas, câncer, distúrbios lipídicos, imunomodulação, entre outras (BAKER et al., 2007; BARREIRO; FRAGA, 2008; BUTLER, 2008; CLARDY; WALSH, 2004; NEWMAN, 2008; NEWMAN; CRAGG, 2010).

São denominados produtos naturais os metabólitos secundários de micro-organismos, plantas ou animais que possuem uma ou mais atividades biológicas (BAKER et al., 2007). Eles têm sido explorados há milhares de anos pela humanidade, sendo as plantas a maior fonte de compostos para a área médica (STROBEL et al., 2004).

Desde a descoberta da morfina, oriunda da planta *Papaver somniferum* (ópio), a grande maioria dos fármacos disponíveis foi criada a partir de produtos naturais, ou são compostos derivados deles. São exemplos os antibióticos (penicilina, eritromicina), antiparasitários (ivermectina), antimaláricos (quinina), controladores lipídicos (lovastatina e seus análogos), imunossupressores (ciclosporina, rapamicina) e anticancerígenos (taxol e doxorubicina) (LI; VEDERAS, 2009).

Entretanto, no início dos anos 2000, houve um declínio na busca de novas substâncias naturais, devido à evolução da química combinatória que atraiu interesse das indústrias farmacêuticas, embora poucas substâncias criadas a partir dessa técnica foram aprovadas para uso. Esse desinteresse ocorreu em função de algumas dificuldades inerentes à pesquisa e obtenção de produtos naturais, como por exemplo, o tempo investido na pesquisa básica, bem como o isolamento e identificação de compostos com os efeitos desejáveis, já que, normalmente, os extratos são compostos por misturas complexas contendo várias substâncias (BAKER et al., 2007; NEWMAN, 2008).

Outra dificuldade está relacionada com fatores ambientais que podem alterar a composição dos extratos, assim como as características dos metabólitos secundários, o que dificulta ainda mais a identificação e a produção em maior escala (LI; VEDERAS, 2009).

Porém, o avanço de técnicas como a espectrometria de massas e a cromatografia, facilitou o processo de identificação e isolamento de substâncias e compostos a partir de extratos e frações de plantas e micro-organismos. O advento da biotecnologia também ajudou a resolver problemas como a produção em maior escala, pois, através de técnicas de modificação genética, organismos simples e de alta replicação, como bactérias e leveduras, são capazes de produzir grande quantidade de substâncias desejadas (STROBEL et al., 2004, THAKUR et al., 2008).

Por esses motivos, a pesquisa envolvendo produtos naturais ainda acrescenta importantes descobertas para o mercado farmacêutico. Devido à vastidão dos oceanos e sua enorme biodiversidade, os produtos naturais marinhos têm despertado grande interesse nos pesquisadores, fazendo com que a farmacologia marinha surtisse com grande potencial para novos agentes terapêuticos (BARREIRO; FRAGA, 2008; BHAKUNI; RAWAT, 2010; COSTA-LOTUFO et al., 2009; GLASER; MAYER, 2009).

Desde 1970, mais de 15.000 produtos naturais com estruturas e atividades biológicas diversas foram descobertos a partir de micro-organismos, algas e animais invertebrados marinhos (SALOMON et al., 2004; WEBSTER et al., 2001). Na terapêutica atual, podemos citar dois exemplos de fármacos que estão sendo utilizados e que são oriundos de produtos naturais marinhos: o ziconotídeo e a trabectedina.

Isolado do molusco *Conus magnus*, o ziconotídeo é um peptídeo com ação analgésica, muito mais potente do que a morfina. Já a trabectedina é um alcalóide isolado da ascídia *Ecteinascidia turbinat*, utilizado no tratamento de sarcomas (BINGHAM; MITSUNAGA; BERGERON, 2010; CHRISTINAT; LEYVRAZ; 2009; McGIVERN, 2007).

O contignasterol e xestobergsterol também fazem parte da grande quantidade de produtos naturais marinhos que se tornaram fármacos. Ambos são esteróides com propriedades antialérgicas, isolados das esponjas marinhas *Petrosia contignata* e *Xestospongia bergquisti*, respectivamente (D'ORAZIO et al., 2012).

Em comparação com outros organismos marinhos, as algas foram pouco estudadas no que se refere a aplicações oncológicas e imunológicas, sendo que essas duas propriedades já foram demonstradas em 140 espécies de algas, mas somente moléculas de três espécies de algas vermelhas entrarem em fase pré-clínica (COURTOIS et al., 2008).

Com isso, acredita-se que a descoberta, isolamento e caracterização de novas moléculas marinhas bioativas, oriundas de diferentes espécies de algas, devem gerar muitos estudos produtivos em termos de propriedades biológicas potencialmente úteis (COURTOIS et al., 2008).

1.3 Algas marinhas

O termo “alga” foi proposto oficialmente como uma categoria taxonômica em 1753, por Lineu, no clássico *Species plantarum*. Após seu nascimento pouco preciso, o termo foi usado para denominar uma enorme variedade de organismos, e sua interpretação tem sido muito discutida, de forma que não se pode atribuir-lhe um significado muito bem definido (FRANCESCHINI et al., 2010; REVIERS, 2006).

De fato, encontram-se incluídos entre as algas desde organismos morfológicamente mais simples, unicelulares, até gigantescas formas que já apresentam talos multicelulares, com formação de tecidos e distribuição funcional elaborada.

Por este motivo, as diferentes espécies de algas estão taxonomicamente distribuídas em três Reinos: Monera, Protista e Plantae. No Reino Monera estão incluídas as cianobactérias, ou algas azuis, que são seres unicelulares, procariontes e autótrofos. Entre os Protistas estão inclusos seres unicelulares, autótrofos ou heterótrofos, mas eucariontes, isto é, que possuem envoltório nuclear. Já no reino Plantae estão os organismos pluricelulares, autótrofos e eucariontes (FRANCESCHINI et al., 2010; VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

As algas possuem cloroplastos e sua principal via de produção de alimento é a fotossíntese, biossintetizando metabólitos essenciais a partir de substâncias químicas relativamente simples, como o dióxido de carbono, e de energia luminosa, embora não possuam raízes, caules e folhas verdadeiros (SCHAEFFER; KRYLOV,

2000). É por esse motivo que existem divergências entre os autores quanto à classificação taxonômica das algas.

Uma característica importante de seu metabolismo é sua notável flexibilidade, tanto na variedade de substratos que podem ser assimilados, quanto na variação das porcentagens dos diferentes produtos do metabolismo acumulados em seu interior (NEWMAN; CRAGG, 2010).

Dentre seus metabólitos primários encontram-se diferentes classes de estruturas químicas, como ácidos graxos, polissacarídeos, aminoácidos, peptídeos e proteínas. Fazem parte dos metabólitos secundários os terpenóides, fenóis halogenados, compostos heterocíclicos oxigenados e nitrogenados, e policetídeos, sendo que algumas dessas substâncias possuem aplicação em vários segmentos industriais, bem como certas atividades biológicas (BHAKUNI; RAWAT, 2010; CARDOZO et al., 2007; MAYER; GUSTAFSON, 2006, 2008; MAYER et al., 2009, 2010; McCLINTOCK; BAKER, 2001).

Os polissacarídeos são o principal constituinte da parede celular das algas, e estão envolvidos, também, com o reconhecimento celular através de moléculas presentes na superfície. Muitos deles já foram descritos por apresentarem propriedades antioxidantes, antivirais, antitumorais, anticoagulantes e imunomoduladoras. Das algas vermelhas e pardas são extraídos os mais utilizados na indústria alimentícia e cosmética: ágar, carrageninas e alginatos (CARDOZO et al., 2007; MAYER; LEHMANN, 2001; MAYER; HAMANN, 2005).

Algumas proteínas como as lectinas, ou hemaglutininas, ganharam destaque por possuírem diferentes aplicações na pesquisa científica e na área médica. Encontradas em diversos tipos de organismos, são utilizadas rotineiramente na tipagem sanguínea e identificação de marcadores tumorais, devido a sua capacidade de se ligarem a carboidratos na superfície celular (RUDIGER; GABIUS, 2001).

Ainda no meio farmacêutico, as lectinas têm sido usadas para direcionar agentes terapêuticos, aumentar a penetração de fármacos e, também, como bioadesivos capazes de aderir às mucosas e liberar, por exemplo, vacinas (CHOWDARY; RAO, 2004; JEPSON et al., 2004).

Os compostos halogenados fazem parte de diversos metabólitos primários e secundários produzidos naturalmente pelas algas marinhas pardas e, especialmente, pelas vermelhas (FAULKNER, 2001; WRIGHT et al., 2003). Neles

estão incluídos fenóis, ácidos graxos e terpenos, por exemplo, (BUTLER; CARTER-FRANKLIN, 2004; DEMBITSKY; SREBNIK, 2002) sendo que alguns deles já foram descritos com propriedades antitumorais e antibacterianas (VAIRAPPAN et al., 2008).

Alguns monoterpenos halogenados extraídos de algas vermelhas do gênero *Plocamium*, *Chondrococcus* e *Ochtodes* apresentaram diferentes atividades farmacológicas, incluindo propriedades antimicrobianas, antituberculose e anticancerígenas (BLUNT et al., 2009, 2010; CARVALHO; ROQUE, 2000; REVIERS, 2006; VIDOTTI, ROLLEMBERG, 2004).

1.4 Gênero *Bostrychia*

Dentre os diversos tipos de algas, aqueles que possuem maior complexidade estrutural e certa diferenciação tecidual são chamados de macroalgas. Elas estão divididas em três grupos: Rhodophyta (algas vermelhas), Chlorophyta (algas verdes) e Phaeophyta (algas pardas) (McCLINTOCK; BAKER, 2001).

As algas vermelhas, ou rodofíceas, recebem esse nome devido à presença de ficoeritrina, pigmento que confere coloração vermelha. Elas se destacam por apresentarem uma grande diversidade química, principalmente na síntese de compostos halogenados, que possuem grande potencial biológico (McCLINTOCK; BAKER, 2001; BHAKUNI, RAWAT, 2010; CARVALHO; ROQUE, 2000; PEREIRA, SOARES-GOMES, 2002).

As rodofíceas são algas predominantemente marinhas, com 5.000 a 5.500 espécies, aproximadamente. Em geral, são quase todas multicelulares, filamentosas e bentônicas, vivendo fixas sobre rochas (McCLINTOCK; BAKER, 2001; REVIERS, 2006).

Entre os seus gêneros, o *Bostrychia* Montagne pertence à família das Rhodomelaceae, umas das mais importantes do filo Rhodophyta. Amplamente distribuído pelas regiões de clima tropical e temperado, a ocorrência desse gênero está relacionada com estuários associados a manguezais e regiões pantanosas (WEST et al., 2006) que pode ser observado na Figura 4.

Figura 4 – Distribuição mundial da espécie de macroalga *Bostrychia tenella*.
Fonte: AlgaeBASE (<http://www.algaebase.org>)

Nesse gênero são encontrados carboidratos como o manitol e sorbitol e, também, polissacarídeos sulfatados (KARSTEN et al., 2007). Alguns desses polissacarídeos presentes na espécie *Bostrychia montagnei* despertaram grande interesse no meio científico por apresentarem atividade contra o vírus Herpes simplex (HSV-1) (DUARTE et al., 2001; 2002).

Utilizando o sistema de classificação proposto por Frank E. Round, em 1965, também faz parte desse gênero a espécie *Bostrychia tenella* (J.V. Lamouroux) J. Agardh, usada em nossos estudos (Figura 5). No Brasil, ela ocorre em quase todos os estados da costa, confirmando sua alta incidência em estuários climáticos diversos (ALGAE MARIS BRASILIS, 2010a).

Seus estudos químicos constam do isolamento de compostos glicosilados (DUARTE et al., 2001), substâncias aromáticas (de FELICIO; DEBONSI; YOKOYA, 2008) e, ainda, compostos voláteis com atividade antiparasitária e antifúngica (OLIVEIRA et al., 2009; de FELICIO et al., 2010).

Figura 5 – Espécie de macroalga *Bostrychia tenella* (J.V. Lamouroux) J. Agardh. Fonte: AlgaeBASE (<http://www.algaebase.org>)

1.5 Micro-organismos endofíticos

Ainda inseridos no cenário dos produtos naturais, outra área surge com um enorme potencial para obtenção de novos agentes terapêuticos: os micro-organismos (DEMAIN, 1992, 2005, 2009; GUNATILAKA, 2006; HERTWECK, 2009; LAM, 2007; LI; VEDERAS, 2009; WALSH; FISCHBACH, 2010). Esse interesse surge em função da sua capacidade de produzir uma variedade de metabólitos, tanto primários, quanto secundários, incluindo: enzimas, aminoácidos, vitaminas, antibióticos, pigmentos, agentes moduladores de respostas imunológicas, toxinas, agentes antitumorais, fatores de crescimento de plantas, anti-helmínticos e antimicóticos (BACH; KIMATI, 1999; DEMAIN, 1992, 2005, 2009; LI; VEDERAS, 2009; RODRIGUES et al., 2000; STROBEL et al., 2004; WANG et al., 2000).

Devido ao fato de serem encontrados nos mais diversos ambientes e habitats, acredita-se que uma parcela muito pequena das bactérias (menos de 1%) e dos fungos (menos de 5%) é conhecida (GUNATILAKA, 2006; LAM, 2007) o que sugere a diversidade de novas substâncias e compostos ainda desconhecidos. Além disso,

os micro-organismos possuem alta capacidade biossintética e maior controle na sua manipulação, o que atrai ainda mais o interesse nessa área, inclusive das indústrias farmacêuticas (GLASER; MAYER, 2009).

Dentre os compostos microbianos e seus derivados, 67 deles foram testados clinicamente, abrangendo diversas propriedades, como antifúngicos, antiparasitários, antibacterianos, anticancerígenos e anti-inflamatórios (LAM, 2007).

Entre os anos de 1970 e 2006, 19 produtos naturais de origem microbiana tornaram-se fármacos (GANESAN, 2008), sendo que, na última década, 17 compostos provenientes de micro-organismos com propriedades antitumorais foram testados clinicamente (BUTTLER, 2008).

Considerando o pouco explorado ambiente marinho e a sua grande quantidade de micro-organismos, a fonte de substâncias novas e desconhecidas torna-se ainda mais rica. Sua microbiota é composta, principalmente, pelas cianobactérias, actinobactérias e fungos filamentosos. Estudos anteriores evidenciaram o potencial da microbiota marinha, já que novas substâncias ativas têm sido isoladas, frequentemente, a partir de cianobactérias e actinomicetos (BERDY, 2005; BHAKUNI; RAWAT, 2010; JENSEN et al., 2005; LAM, 2007).

Uma parte dos micro-organismos, principalmente, bactérias e fungos, pode ser encontrada em células e/ou tecidos vegetais. São chamados endófitos, ou endofíticos, aqueles que colonizam tecidos saudáveis das plantas, em algum tempo do seu ciclo de vida, numa relação que varia de fitopatogenia a simbiose (STROBEL et al., 2004; TAN ZOU, 2001).

Nas interações simbióticas os micro-organismos produzem, ou induzem a produção, de metabólitos primários e secundários que podem ser de grande interesse científico. Eles representam uma fonte rica de metabólitos bioativos que apresentam uma gama de aplicações: agroquímicos, antibióticos, imunossuppressores, antiparasitários e agentes anticâncer (GUNATILAKA, 2006).

A hipótese de que existe uma relação simbiótica entre micro-organismos e seus hospedeiros é sustentada por diferentes estudos, que mostram que muitas das são produtos de origem microbiana (GLASER; MAYER, 2009; SIMMONS et al., 2008). Um exemplo disso é o taxol, utilizado com anticancerígeno. Produzido por vegetais do gênero *Taxus* também foi isolado do endófito *Taxomyces adreanae* (GUO et al., 2008).

Segundo SIMMONS et al. (2008), 20 moléculas provenientes ou derivadas do ambiente marinho estavam em fase final de testes para serem aprovadas como novos agentes anticancerígenos, sendo que 16 delas possuem sua biossíntese diretamente relacionada aos micro-organismos.

Esse fato desperta ainda mais o interesse da comunidade científica pelos micro-organismos endofíticos, especialmente quanto ao seu potencial na produção de metabólitos de interesse econômico, incluindo os relacionados às plantas hospedeiras (SOUZA et al., 2004).

1.6 Algas marinhas, micro-organismos endofíticos e o sistema complemento

Avaliando todo o potencial farmacológico que a natureza oferece e considerando a grande competitividade existente no ambiente marinho, é possível explicar porque muitos dos metabólitos produzidos pelas algas e micro-organismos são substâncias e compostos que possuem características antifúngicas, anti-helmínticas, antibacterianas, antitumorais, algicidas, citotóxicas e inseticidas.

Por esse motivo, os produtos naturais provenientes desses organismos tornam-se alvo de grande interesse para a farmacologia, devido a sua alta capacidade de produzir diversos metabólitos para sua sobrevivência, e que podem dar origem a novas moléculas bioativas com propriedades biológicas potencialmente úteis (COURTOIS et al., 2008).

As macroalgas possuem polissacarídeos característicos, como por exemplo, as carragenanas e agaranas, que são galactanas sulfatadas comuns nas algas vermelhas. Nas algas pardas são encontrados os alginatos, as laminaranas e as fucanas sulfatadas, enquanto que, nas algas verdes, encontram-se as ramnanas sulfatadas (ZVYAGINTSEVA et. al., 1999).

As galactanas sulfatadas (carragenanas e agaranas) fazem parte da matriz extracelular das algas vermelhas (rodofíceas). Estudos com galactanas sulfatadas extraídas de espécies do gênero *Bostrychia* Montagnei apresentaram propriedades antivirais significativas (DUARTE et al., 2002). A partir das carragenanas obtêm-se as carrageninas, cuja capacidade de ativar o SC é bem conhecida (NAZAROVA et

al., 1998). Seu potencial é tão grande que é usada como agente inflamatório em modelos experimentais.

Dentre os polissacarídeos das algas vermelhas, uma nova substância capaz de atuar no SC chamada floridosídeo foi descoberta. Essa molécula representa um importante marco no desenvolvimento de um novo e potente agente modulador desse sistema, já que resultados mostraram sua eficiência em bloquear o SC (COURTOIS et al., 2008).

As fucanas (ou fucoïdanas), assim como as laminaranas, são solúveis em água e possuem um amplo espectro de ações biológicas. Possuem atividade anticoagulante, demonstrada em diferentes ensaios, sendo potentes inibidores da antitrombina III e do co-fator II da heparina (CHURCH et al., 1989; NAGUMO; NISHINO, 1996). São, também, inibidores de infecções retrovirais, como o HIV e o vírus da Herpes (McCLURE et al., 1992). Possuem, ainda, atividade antitumoral (ZHUANG et al., 1995) e anticomplementar (BLONDIN et al., 1994, 1996). Portanto, muitos estudos envolvendo as fucanas têm sido desenvolvidos.

BLONDIN et al., (1994), mostram que as fucanas inibem fortemente a ativação *in vitro* do SC humano, inibindo a lise de eritrócitos mediada por complemento no soro, tanto na VC, quanto na VA. Inibem, também, a ligação do fator B à molécula de C3, diminuindo a quantidade de C3b viável para dar continuidade à cascata enzimática do SC.

Por outro lado, existem diversos estudos que demonstram que alguns produtos naturais são capazes de atuar estimulando o sistema imune de animais e plantas, aumentando a imunidade e resistência a patógenos (CHENG et al., 2005). Um exemplo são as laminaranas, que possuem ação estimuladora sobre a imunidade de peixes, e atuam de forma semelhante a algumas fucanas, ativando a VA do SC (ADACHI et al., 1990; BLONDIN et al., 1994, 1996). Também, já foi demonstrado que alginatos de sódio extraídos de algas marinhas produzem os mesmos efeitos imunoestimulatórios em peixes (CHENG et al., 2005; HARIKRISHNAN et al., 2010, 2011a e 2011b).

Sendo assim, as funções dos polissacarídeos sulfatados extraídos de algas marinhas em sistemas biológicos têm atraído à atenção dos pesquisadores nas últimas décadas, uma vez que constituem uma fonte de compostos com potenciais aplicações na área médica (NARDELLA et al., 1996).

Somente nas últimas décadas, através do estudo de animais e plantas marinhos, é que foi revelado o universo dos micro-organismos escondido, especialmente, dentro das algas. Muitos metabólitos secundários bioativos vêm sendo isolados e caracterizados por possuírem grande potencial na medicina, agricultura e indústria, de modo particular, fungos e bactérias associados às esponjas, corais e algas, que são excelentes produtores de substâncias com propriedade importantes como antitumorais (IMHOFF; LABES; WIESE, 2011).

Novos antibióticos, antimicóticos, imunossupressores e compostos anticâncer são exemplos do que se pode encontrar depois de se isolar e cultivar endofíticos individualmente, seguido de purificação e caracterização de alguns de seus produtos naturais (STROBEL et al., 2004).

Considerando todos esses fatos, investigações a respeito de possíveis efeitos imunomoduladores de extratos de algas marinhas e fungos endofíticos no SC, adquirem um caráter promissor na descoberta de novos agentes e ferramentas terapêuticas.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

O objetivo deste estudo é investigar a presença de substâncias com ação imunomoduladora sobre o SC humano nas frações e subfrações da macroalga marinha *Bostrychia tenella* e extratos de micro-organismos endofíticos associados.

Esta investigação visa fornecer subsídios para a possível utilização dessas substâncias com fins terapêuticos, e como ferramentas para a elucidação dos mecanismos envolvidos nos processos patológicos de caráter inflamatório, nos quais o SC tem papel preponderante.

2.2. Específicos

- Avaliação dos efeitos das frações, subfrações e extratos sobre a atividade lítica da VC/VL e da VA por meio de microensaio cinético de atividade hemolítica;
- Avaliação do consumo de complemento induzido pelas frações, subfrações e extratos usando a pesquisa de fragmentos dos componentes C3, C4 e Fator B, por meio de técnicas imunoeletroforéticas e/ou de Western blotting;
- Avaliação da capacidade das frações, subfrações e extratos de induzir a formação de complexos SC5b-9, por meio de imunoensaio enzimático (ELISA), indicando ativação completa do sistema.

DESENHO EXPERIMENTAL

3. DESENHO EXPERIMENTAL

Figura 6 – Desenho experimental do estudo proposto para avaliar a atividade imunomoduladora no SC humano das frações e subfrações da macroalga *Bostrychia tenella* e extratos de micro-organismos endofíticos associados.

CASUÍSTICA

4. CASUÍSTICA

Para todos os ensaios realizados foi utilizado um *pool* de soro humano normal (SHN) como fonte de complemento. Para este fim, foram coletadas amostras de sangue (10mL) de 20 voluntários adultos de ambos os sexos, na faixa etária de 20 a 50 anos, pertencentes à comunidade da FCFRP (alunos, funcionários e docentes), conforme o protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP (Protocolo CEP/FCFRP nº 175 – ANEXO A).

Os voluntários foram selecionados para participar do projeto somente após avaliação dos seguintes critérios de exclusão: histórico de doenças infecciosas recentes; doenças autoimunes e outras doenças inflamatórias crônicas; uso de medicamentos que possam interferir nos resultados da pesquisa, em especial anti-inflamatórios.

O sangue foi colhido assepticamente, por punção venosa na veia cubital do braço, em tubos para coleta a vácuo, após jejum de 8 horas. Os riscos deste procedimento para os doadores foram mínimos, sendo que todo material utilizado era descartável, eliminando qualquer risco de contaminação.

O sangue de cada doador foi coletado separadamente e deixado, à temperatura ambiente, por aproximadamente 1 hora e 30 minutos, para coagular. Os soros foram separados por centrifugação (500xg), por 10 minutos, a 4°C. Posteriormente, foram reunidos, aliquotados e congelados a -70°C, sendo descongelados somente para uso imediato.

MATERIAIS E MÉTODOS

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Macroalga *Bostrychia tenella*

5.1.1. Coleta, obtenção e fracionamento dos extratos

Os processos de coleta das algas e obtenção e fracionamento dos extratos foram realizados pela Prof^a. Dr^a. Hosana Maria Deboni do Laboratório de Química Orgânica do Ambiente Marinho, pertencente ao Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP) – USP, juntamente com sua equipe, em especial, seu aluno de doutorado Rafael de Felício.

Amostras da macroalga vermelha *Bostrychia tenella* (L. V. Lamouroux) J. Agardh foram coletadas nos Costões Rochosos da Praia da Fortaleza, em Ubatuba – São Paulo, levando em consideração as datas e períodos de maré baixa.

Inicialmente, o material algal coletado foi submetido à extração por maceração com metanol (MeOH), numa proporção de massa de alga/volume de solvente igual a 1:1. Em seguida, foi filtrado em gaze e papel de filtro, e concentrado em evaporador rotativo.

Posteriormente, o extrato metanólico concentrado foi submetido a partições líquido-líquido utilizando-se solventes orgânicos imiscíveis (hexano, acetato de etila e n-butanol) e resultando nas seguintes frações (Figura 7):

- Fração hexânica (BT-H)
- Fração acetato de etila (BT-A)
- Fração butanólica (BT-B)
- Fração hidro-metanólica (BT-MH)

Figura 7 – Fracionamento do extrato metanólico de *Bostrychia tenella* (FELÍCIO, 2010).

A fração BT-MH foi subfracionada por cromatografia fornecendo 2 novas subfrações:

- BT-Aq (solúvel em água)
- BT-M (solúvel em metanol)

5.1.2. Subfracionamento da fração BT-H

A fração hexânica (BT-H) foi fracionada por cromatografia líquida a vácuo, utilizando os solventes hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol. Sendo assim, foram coletadas 6 diferentes subfrações (Tabela 1).

Tabela 1 – Subfrações obtidas a partir do fracionamento de BT-H - fração hexânica de *Bostrychia tenella*.

Frações	Solvente
BTH-H	Hexano
BTH-HD	Hexano – Diclorometano (1:1)
BTH-D	Diclorometano
BTH-A	Acetato de etila
BTH-AM	Acetato de etila – metanol (1:1)
BTH-M	Metanol

5.2. Micro-organismos endofíticos

5.2.1. Coleta e obtenção dos extratos

Amostras de macroalgas vermelhas da espécie *Bostrychia tenella* foram coletadas nos Costões Rochosos da Praia Dura, em Ubatuba, litoral norte do Estado de São Paulo.

O material algal foi lavado para remoção de contaminantes e estocado em frascos contendo água do mar filtrada, suplementada com 200mg/L de cloranfenicol (antibiótico) e esterilizada por autoclavagem.

A superfície das amostras foi esterilizada com etanol 70% e hipoclorito de sódio de acordo com diferentes metodologias de esterilização da superfície descritas na Dissertação de Mestrado de Rafael de Felício (FELICIO, 2010), para evidenciar a microbiota endofítica, a fim de evitar o isolamento de micro-organismos associados à superfície das algas. Fragmentos foram transferidos para placas de Petri contendo o meio de escolha e incubados em estufa, a 30°C.

Após períodos variáveis de tempo, observou-se o crescimento de colônias, as quais foram isoladas, cultivadas e armazenadas de acordo com metodologia padronizada pela equipe do Laboratório de Química Orgânica do Ambiente Marinho – FCFRP/USP.

Dez linhagens foram selecionadas e submetidas à extração por maceração com metanol (MeOH), sendo obtidos os seguintes extratos metanólicos: T06; T65; T66; T67; T68; T69; T70; T71; T72; T73.

Das 10 linhagens de micro-organismos selecionadas para dar origem aos extratos endofíticos, 6 foram identificadas como fungos (Tabela 2). As outras linhagens ainda estão sendo identificadas.

Tabela 2 – Identificação das linhagens dos micro-organismos endofíticos selecionados.

Extratos	Espécies
T65	<i>Nigrospora oryzae</i>
T67	<i>Penicillium decaturense</i>
T68	Família Xylariaceae (<i>Xylariaceae</i> sp.)
T69	<i>Penicillium waksmanii</i>
T72	<i>Acremonium</i> sp.
T73	<i>Acremonium implicatum</i>

Nota: até o presente momento, somente 6 linhagens foram identificadas.

5.3. Preparo das amostras

Das 5 frações da macroalga *Bostrychia tenella* obtidas a partir do extrato metanólico, somente a fração BT-A (fração acetato de etila) não foi testada, portanto, fizeram parte das análises as frações: BT-H; BT-B; BT-Aq e BT-M.

Com relação às 6 subfrações obtidas a partir da fração hexânica BT-H e os 10 extratos metanólicos obtidos a partir dos micro-organismos endofíticos selecionados, todos foram testados. A Tabela 3 resume todas as amostras que fizeram parte desse estudo.

Foram fornecidos, aproximadamente, 10mg de material seco de cada amostra. Esse material foi solubilizado em solvente orgânico DMSO (dimetilsulfóxido) 1%, aliquoteado e armazenado a -20°C na concentração de 5mg/mL.

O DMSO possui propriedades anti-inflamatórias devido à sua capacidade de absorver radicais livres derivados do oxigênio (ROS), portanto, fez-se necessário testá-lo, separadamente, nos ensaios de atividade hemolítica. Os resultados obtidos mostraram que o DMSO 1% nos maiores volumes utilizados para solubilização das amostras não provocou modulação no SC (APÊNDICE B).

Tabela 3 – Frações, subfrações e extratos de *Bostrychia tenella* e micro-organismos endofíticos associados.

Frações e subfrações da alga <i>Bostrychia tenella</i>	Extratos de micro-organismos endofíticos de <i>Bostrychia tenella</i>
BT-H	T06
BT-B	T65
BT-Aq	T66
BT-M	T67
BTH-H	T68
BTH-HD	T69
BTH-D	T70
BTH-A	T71
BTH-AM	T72
BTH-M	T73

5.4. Animais

Duas coelhas adultas da linhagem Nova Zelândia, pesando cerca de 2,5Kg, foram obtidas no Biotério Central do Campus da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto-SP. Os animais foram mantidos e manipulados de acordo com os protocolos submetidos à Comissão de Ética no Uso de Animais de Experimentação do Campus USP-RP (Protocolo CEUA nº 10.1.213.53.7 – ANEXO B).

5.5. Avaliação da atividade imunomoduladora das frações e subfrações da macroalga *Bostrychia tenella* e extratos de micro-organismos endofíticos associados sobre o sistema complemento humano

5.5.1. Via Clássica/Via das Lectinas

Para avaliar a atividade imunomoduladora das frações e extratos na via clássica/via das lectinas (VC/VL) foi necessário colher sangue de três carneiros, através de punção venosa na veia jugular, em igual volume de solução de Alsever (APÊNDICE A). Este procedimento foi realizado por um veterinário do Biotério Central do Campus USP-RP, mediante agendamento prévio. O sangue colhido foi identificado, aliquotado e conservado a 4°C.

Para realizar os ensaios, alíquotas de sangue de carneiro foram centrifugadas (500xg, 15 minutos) e o sedimento lavado em tampão TEA-Ca²⁺-Mg² (APÊNDICE A). Após a terceira lavagem, preparou-se uma suspensão de hemácias a 5% a partir do sedimento, com o próprio tampão D, ajustada para conter, aproximadamente, 1,2 x 10⁹ céls/mL (ALMEIDA; FIFE, 1976).

Para sensibilizar as hemácias, a suspensão foi misturada com volume adequado de hemolisina (anticorpo de coelho anti-hemácia de carneiro), no título 1:800 (v/v), para atingir máxima sensibilização. Esta suspensão foi mantida a 4°C, por 15 minutos. Após esse período, a absorbância dessa suspensão sensibilizada foi

lida num comprimento de onda de 700nm e ajustada para 0,8 (Espectrofotômetro Spectramax plus – Molecular Devices).

5.5.2. Via Alternativa

As duas coelhas adultas foram mantidas no Biotério I da FCFRP-USP para o fornecimento periódico de sangue a ser utilizado nos ensaios hemolíticos da via alternativa (VA). Para realização dos ensaios, 5mL de sangue de cada coelha foram colhidos, por punção da artéria central da orelha, em igual volume de solução de Alsever (APÊNDICE A).

O sangue colhido foi filtrado em gaze e incubado com igual volume de tampão TEA-EDTA (APÊNDICE A) por 15 minutos, a 37°C. Após incubação, as hemácias foram lavadas três vezes, por centrifugação (500xg, 10 minutos), com tampão TEA-Mg²⁺ (APÊNDICE A).

Depois de lavadas, as hemácias foram ressuspensas em solução de Alsever contendo 0,05% de azida sódica, num volume duas vezes maior que o volume de sangue. Em seguida, essas hemácias foram aliquotadas e armazenadas a 4°C, onde permaneceram estáveis e próprias para uso por 15 dias.

Para realizar os ensaios hemolíticos, alíquotas da suspensão de hemácias foram lavadas três vezes com tampão TEA-EGTA-Mg²⁺ (APÊNDICE A), bloqueador da VC/VL. A partir do sedimento, foi preparada uma suspensão de hemácias a 5% com o tampão TEA-EGTA-Mg²⁺. Essa suspensão foi lida em 700nm e ajustada para 0,8 (Spectramax plus – Molecular Devices).

5.5.3. Ensaios de atividade hemolítica (Método Cinético)

Os ensaios de atividade hemolítica determinada através do método cinético utilizam volume fixo de SHN. Essa atividade é determinada pela medida do tempo, em segundos, necessário para ocorrer lise de 50% das hemácias presentes no meio de reação (t_{1/2}). Este método é baseado na mudança das propriedades de

dispersão de luz das hemácias, à medida que vão sofrendo hemólise, que é determinada espectrofotometricamente a 700nm, eliminando a necessidade de centrifugação para leitura (CROTT et al., 1997).

Utilizando microplacas de 96 poços, foi padronizado para a VC/VL um volume fixo de 7µL de *pool* de SHN. Para preparar os controles, 193µL de tampão para a VC (tampão TEA-Ca²⁺-Mg²⁺) foram pré-incubados com 7µL de SHN, em um volume final de 200µL. Para os testes, diferentes concentrações das frações, subfrações e extratos foram preparadas em tampão TEA-Ca²⁺-Mg²⁺, e pré-incubadas com 7µL de SHN, em volume final de 200µL. A microplaca foi pré-incubada a 37°C, por 1 hora.

Após a pré-incubação, foi adicionado, rapidamente, 40µL/poço de suspensão de hemácias de carneiro sensibilizadas com hemolisina. Em seguida, os meios reacionais foram homogeneizados por agitação, e fez-se a leitura cinética da turbidez de cada poço, em 700nm, durante 15 minutos (Spectramax plus – Molecular Devices).

Para a VA, padronizou-se um volume de SHN de 60µL. Portanto, os controles foram preparados com 140µL de tampão próprio para a VA (tampão TEA-EGTA-Mg²⁺) e 60µL de SHN, em volume final de 200µL. Para os testes, diferentes concentrações das frações, subfrações e extratos foram preparadas no tampão TEA-EGTA-Mg²⁺ e misturadas com 60µL de SHN, num volume final de 200µL. A pré-incubação foi feita por 1 hora, a 37°C.

Após a pré-incubação, adicionou-se, rapidamente, 40µL/poço de suspensão de hemácias de coelho aos controles e testes. Posteriormente, fez-se a homogeneização dos meios reacionais e a leitura cinética de cada poço, em 700nm, durante 15 minutos (Espectrofotômetro Spectramax plus – Molecular Devices).

A partir das leituras cinéticas e dos gráficos obtidos foi possível acompanhar e registrar a cinética de lise das hemácias, quando adicionadas aos meios reacionais. Com esses dados calculou-se o valor de t_{1/2} que corresponde ao tempo necessário para que a absorbância inicial do meio seja reduzida pela metade (Figura 8). E, utilizando os valores de t_{1/2} obtidos, calculou-se a porcentagem de inibição da atividade hemolítica (Figura 9).

Figura 8 – Gráfico representativo da cinética de lise das hemácias através do SC, por meio do qual o valor de $t_{1/2}$ é calculado. O tempo padronizado para o ensaio é de 15 minutos de leitura.

$$\% \text{ inibição} = 100 - \frac{t_{1/2} \text{ do SHN} \times 100}{t_{1/2} \text{ do SHN tratado}}$$

Figura 9 – Fórmula utilizada para calcular a porcentagem de inibição das amostras através dos valores de $t_{1/2}$ do SHN tratado e não tratado com as frações, subfrações e extratos.

Utilizando-se as porcentagens de inibição de cada concentração testada, foi possível estabelecer a concentração de amostra que inibe 50% da hemólise (IC₅₀), determinada através de cálculos de regressão linear, utilizando os percentuais de inibição versus a concentração. Desse modo, a atividade dos extratos e frações de algas e fungos endofíticos sobre a VC/VL e a VA do SC passou a ser expressa em valores de IC₅₀.

5.5.4. Imunoeletroforese bidimensional para análise da geração do fragmento C3b a partir do componente C3

A imunoeletroforese bidimensional (IEFbi) foi realizada de acordo com método descrito por CLARK; FREEMAN, 1968, com modificações, utilizando placas de vidro de 5,5 x 7,5cm, cobertas por uma fina camada de agarose (pré-coat).

A proteína C3 é um componente central da ativação do SC, independente da via de início. Isso porque as três vias (VC, VL e VA) convergem numa rota única a partir da clivagem de C3, que gera os fragmentos de C3a e C3b.

O C3a é um fragmento de 8kDa que atua como anafilatoxina, ou seja, um mediador pró-inflamatório que induz a quimiotaxia de leucócitos, desgranulação de fagócitos, mastócitos e basófilos, contração da musculatura lisa e aumento da permeabilidade vascular. O C3b (de aproximadamente 43kDa) também possui papel importante na resposta inflamatória, pois se liga à superfície do patógeno para compor a C3 convertase da VA, bem como reveste a superfície do micro-organismo melhorando o processo de fagocitose (opsonização), já que os fagócitos possuem receptores para os mesmos.

As amostras foram incubadas com SHN de acordo com os valores de IC50 calculados, por 1 hora, a 37°C. Após esse período, a ativação do SC foi parada com EDTA 0,1M. O volume de SHN a ser utilizado foi padronizado conforme o volume de amostra a ser testado.

Para o controle negativo foi utilizado somente o SHN, enquanto que, para o controle positivo, o SHN foi previamente tratado com zymosan (complexo glicoprotéico oriundo de fungos leveduriformes, conhecido como um potente ativador do SC). Ambos foram incubados nas mesmas condições dos testes e utilizou-se EDTA para parar a ativação do SC. Posteriormente, o SHN (tratado ou não) foi misturado com tampão PBS (APÊNDICE A), no mesmo volume de amostra a ser utilizado nos testes.

Para realizar a corrida eletroforética em primeira dimensão, metade da lâmina foi coberta com 3mL de agarose 1,3% preparada em tampão Tris-Glicina-EDTA, pH 8,8. Nesse gel foram feitos dois orifícios, aos quais foram aplicados 6µL de amostra ou controles.

A primeira corrida tem a finalidade de separar, através da passagem de corrente elétrica, o fragmento C3b do C3 íntegro em função da diferença de tamanho. Sendo assim, o fragmento C3b migra mais do que a proteína C3 inteira, e por isso observa-se a formação de dois arcos de precipitação quando eles encontram o gel contendo anticorpo anti-C3. A corrida em primeira dimensão teve duração de 3h, utilizando-se 150V e 5mA/placa.

Para realizar a corrida em segunda dimensão, o restante da placa foi coberto com 3mL de agarose 1,3% em tampão Tris-Glicina-EDTA (pH 8,8), contendo 1% de

anticorpo anti-C3 humano (Sheep IgG fraction anti-Human C3 – The Binding Site, U.K.). Antes de iniciar a corrida, a direção das placas na cuba de eletroforese foi alterada em 90° graus, de modo que as proteínas, anteriormente separadas na primeira corrida, corressem novamente em direção ao gel de agarose contendo o anticorpo anti-C3 (Figura 10).

Figura 10 – Esquema da metodologia de imuno-eletroforese bidimensional para análise da geração de fragmentos de C3. A corrida em primeira dimensão ocorre no sentido horizontal, separando os fragmentos da proteína íntegra. A corrida em segunda dimensão ocorre no sentido horizontal, forçando o encontro dos fragmentos e proteína íntegra com o anticorpo anti-C3, para serem observados os picos de precipitação.

Ao término da corrida, as placas foram lavadas com água destilada e secaram a temperatura ambiente, cobertas por papel-filtro umedecido. Depois de secarem e se tornarem finas camadas de agarose, as lâminas foram coradas com Ponceau S (APÊNDICE A) para observar a formação dos arcos de precipitação, correspondentes ao componente C3 (primeiro pico) e o fragmento C3b, formado quando há ativação do SC (segundo pico) (Figura 11).

Como ocorre ativação natural do complemento desencadeada pelo manuseio do SHN (descongelamento e incubação, por exemplo), em alguns casos observa-se no controle negativo (SHN não tratado) um pico grande de C3 inteiro e um menor de C3b. No caso do controle positivo, feito com zymosan, observa-se o perfil oposto, no qual há formação de um pico maior do fragmento C3b.

Figura 11 – Perfis obtidos para os controles negativo e positivo na imunoeletroforese bidimensional para análise da geração do fragmento C3b. Nota-se que o primeiro pico no lado esquerdo da figura representa a proteína C3 inteira, com um pico muito pequeno de C3b formado ao seu lado. No lado direito da figura, observa-se a mudança no perfil dos controles, no qual o tamanho do pico de C3b fica maior ou igual ao pico da proteína inteira, indicando ativação do SC.

5.5.5. Western blotting para determinação da formação de fragmentos de C3, C4 e Fator B

A formação dos fragmentos de C3, C4 e Fator B em SHN incubado com os extratos e frações de algas marinhas e fungos endofíticos foi determinada através de Western blotting. O volume de SHN e as diluições utilizadas de anticorpos primário e secundário foram padronizados previamente em nosso laboratório, bem como todas as condições necessárias para a corrida eletroforética, transferência e revelação das membranas de PVDF.

O SHN foi exposto aos extratos e frações por 1 hora, a 37°C, de acordo com os valores de IC50 para cada amostra. Como controle positivo, o SHN foi ativado com zymosan, enquanto que, como controle negativo utilizou-se somente o SHN, ambos nas mesmas condições.

Após a incubação, a ativação do SC foi parada com EDTA 0,1M. Posteriormente, todas essas amostras foram diluídas e incubadas com tampão de amostra (APÊNDICE A), por 5 minutos, a 100°C, para desnaturação das proteínas. E, por fim, uma alíquota de 10µL de cada amostra foi aplicada no gel de acrilamida 10%.

A corrida eletroforética durou 2h30, utilizando uma voltagem de 100V, em tampão de corrida (APÊNDICE A). Posteriormente, as proteínas foram transferidas do gel de acrilamida para membranas de PVDF, por 2h. Após serem marcadas com anticorpo primário e secundário, as membranas foram reveladas.

Para a revelação utilizamos o substrato cromogênico DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride - dihydrate) (Life Technologies – Gibco BRLTM). Ele é substrato da enzima peroxidase, e forma um composto de coloração marrom, insolúvel, que se deposita sobre a membrana quando em contato com a enzima conjugada no anticorpo secundário.

Como anticorpos primários foram utilizados: anti-C3 (Goat IgG Anti-Human C3 Complement component - Calbiochem®, U.S.A./Canada), anti-C4 (Sheep IgG fraction anti-Human C4 – The Binding Site, U.K.) e anti-fator B (Sheep IgG fraction anti-Human Factor B – The Binding Site, U.K.). O anticorpo secundário usado foi o anti-imunoglobulinas conjugado com a enzima peroxidase (Donkey Anti-Sheep/Goat Immunoglobulins Peroxidase Conjugate – The Binding Site, U.K.).

Finalmente, as membranas reveladas com DAB foram devidamente identificadas e escaneadas para documentação e, posteriormente, quantificação das bandas obtidas para cada fragmento pelo programa Scion Image Scion Corporation.

5.5.6. Análise da capacidade de geração de complexos terminais SC5b-9

A ativação do Sistema Complemento subsequente à exposição do SHN aos extratos e frações foi avaliada, adicionalmente, pela medida das concentrações de neo-antígenos SC5b-9, através de ensaio imunoenzimático (EIA MicroVue SC5b-9 Complement Kit – Quidel®, San Diego, CA).

O complexo terminal do Complemento (TCC) é formado após a ativação completa do sistema, independentemente da via que o iniciou, seja via clássica, das lectinas ou alternativa. Ele é constituído pelos fragmentos C5b, C6, C7, C8 e C9, e forma o complexo de ataque à membrana (MAC), capaz de se ligar às membranas das células-alvo e causar lise.

Os complexos formados na ausência da célula-alvo ligam-se em proteínas reguladoras presentes no soro, como por exemplo, a proteína S. Nesse caso, tornam-se complexos solúveis e incapazes de causar lise (SC5b-9).

Através do ensaio imunoenzimático, mediu-se os níveis do complexo SC5b-9 formados no SHN, após sua exposição aos extratos e frações, de acordo com os valores do SC foi parada com EDTA 0,1M.

Posteriormente, as amostras de SHN tratado foram diluídas 1:40, no próprio diluente de amostra presente no kit, segundo as recomendações do fabricante. Como controles positivo e negativo, utilizamos SHN ativado com zymosan e SHN puro, incubados nas mesmas condições.

O ensaio foi realizado em microplaca de 96 poços contendo, além das amostras e controles, o branco (somente diluente da amostra), padrões alto e baixo, e cinco diferentes concentrações do complexo SC5b-9 para compor a curva de calibração.

A microplaca foi inicialmente ativada com o tampão de lavagem, oriundo do próprio kit e preparado de acordo com as instruções. Em seguida, adicionou-se na microplaca 100µL/poço de cada amostra, controles, padrões e branco, e a placa foi incubada por 1 hora, a 37°C.

Após esse período, foram feitas cinco lavagens, e adicionou-se 50µL/poço de anticorpo conjugado com peroxidase. Seguiu-se, então, uma segunda incubação de 30 minutos, a 37°C. Posteriormente, foram feitas mais cinco lavagens e adicionou-se 100µL/poço de substrato. A microplaca permaneceu incubada por mais 15 minutos, 37°C.

Por fim, adicionou-se 100µL/poço de solução de paragem, composta por ácido sulfúrico, para realizar a leitura da absorbância em 450nm. Através das leituras e gráficos obtidos, calculamos a concentração de complexo SC5b-9 formado no SHN, tratado ou não, em ng/mL.

5.6. Análise Estatística

Nos ensaios da atividade hemolítica, os resultados obtidos foram analisados estatisticamente através do teste *t de Student*, com nível de significância estabelecido em $p < 0,05$, utilizando o programa GraphPad Prism, versão 5.0 (GraphPad Software Corporation, San Diego, California, USA).

Nos ensaios de Western blotting, a quantificação das bandas visualizadas nas membranas de PVDF foi feita através do programa Scion Image, versão 4.0 (Scion Corporation, Frederick, Maryland, USA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Ensaios de atividade hemolítica

Os ensaios de atividade hemolítica foram realizados pelo método cinético, para a VC/VL e VA, com a finalidade de triagem das amostras e seleção daquelas que fossem capazes de modular o SC presente no SHN.

O potencial imunomodulatório foi verificado, nos ensaios de atividade hemolítica, pela capacidade das amostras de alterarem o valor médio de $t_{1/2}$ do SHN, após seu tratamento, comparando-o com o valor médio de $t_{1/2}$ do SHN não tratado. Como o valor de $t_{1/2}$ corresponde ao tempo gasto pelo SC residual, em segundos, para lisar 50% das hemácias adicionadas ao meio reacional, nesse ensaio é possível verificar se o complemento sofre algum tipo de modulação através do aumento ou diminuição do seu tempo de lise.

Nos ensaios de atividade hemolítica, utiliza-se o termo “complemento residual” porque o SC pode ser ativado ou inibido, durante o seu tratamento com a amostra. Sendo assim, a hemólise observada nos resultados ocorre em função do complemento residual, e seu tempo pode ser diferente do tempo normal (SHN não tratado). Portanto, nos ensaios de atividade hemolítica é fundamental considerar os efeitos que a amostra pode causar no SC, para depois considerar o valor do $t_{1/2}$ do complemento na hemólise.

Em se tratando de substâncias isoladas, o valor médio de $t_{1/2}$ poderia estar aumentado, isto é, mais lento, quando a substância é capaz de ativar o SC na pré-incubação. Desse modo, haveria o consumo dos componentes durante o tratamento do SHN e, quando adicionadas hemácias, sua lise seria mais lenta. A hemólise também seria mais lenta, ou talvez nem ocorresse, se a substância fosse capaz de bloquear o complemento, como no caso do C1, bloqueando sua ativação (MORGAN; HARRIS, 2003).

Por outro lado, a substância poderia atuar no sistema regulatório do complemento, e não diretamente sobre as proteínas que compõem as diferentes vias de ativação. Nesse caso, ao inativar alguma proteína regulatória do SC, a lise

das hemácias adicionadas após o tratamento seria muito rápida e, consequentemente, seu $t_{1/2}$ seria menor.

No entanto, quando se trata de misturas complexas, como é o caso das amostras avaliadas nesse estudo, deve-se considerar que mais de uma substância poderia estar atuando sobre o SC, talvez até de maneira antagônica, durante o tratamento do SHN. O raciocínio seria o mesmo nos casos de ativação e bloqueio diretos do complemento, causando valores aumentados de $t_{1/2}$ na hemólise, ou em função do consumo dos componentes, ou do bloqueio propriamente dito.

Entretanto, quando pensamos no bloqueio de proteínas regulatórias, deve ser considerada a seguinte situação: a possibilidade de uma substância inibir alguma proteína de regulação, enquanto outra substância também presente na mistura seja capaz de ativar o SC. Nesse caso, a ativação ocorreria durante o tratamento do SHN, antes da adição das hemácias, diferentemente, do que ocorreria no caso de uma substância isolada. Portanto, a hemólise seria mais lenta e o $t_{1/2}$ maior, em função do consumo dos componentes do complemento. Mas, se na mistura houvesse somente substâncias que inativassem proteínas regulatórias, mas sem nenhuma outra capaz de causar ativação do complemento, o $t_{1/2}$ da hemólise seria mais rápido.

Inicialmente, havia 20 frações, subfrações e extratos a serem avaliados quanto ao seu potencial modulador:

- 4 frações da macroalga *Bostrychia tenella*;
- 6 subfrações da fração BT-H (fração hexânica);
- 10 extratos de micro-organismos endofíticos isolados de *B. tenella*

As amostras foram solubilizadas no solvente orgânico DMSO 1% em PBS, em diferentes concentrações, e avaliadas nas duas vias, separadamente. Para realizar a triagem, foi feito um ensaio para cada amostra, em triplicata, tanto na VC/VL, quanto na VA. As amostras que apresentaram modulação no complemento através da alteração significativa do valor médio de $t_{1/2}$ do SHN tratado foram testadas, novamente, em mais dois ensaios distintos.

6.1.1. Via Clássica/Via das Lectinas

Para analisar as amostras na VC/VL optou-se por uma extensa faixa de concentração, obtida a partir amostra inicial solubilizada em DMSO 1%, na concentração de 5000µg/ml. As diluições foram feitas em tampão próprio para a VC/VL (TEA-Ca²⁺-Mg²⁺):

- C1: 1000µg/mL
- C2: 500µg/mL
- C3: 250µg/mL
- C4: 100µg/mL
- C5: 50µg/mL
- C6: 25µg/mL
- C7: 10µg/mL
- C8: 5µg/mL
- C9: 2µg/mL

Os gráficos seguintes (Figuras 12 a 31) mostram os resultados obtidos na triagem das amostras na VC/VL. Para algumas concentrações não foi possível calcular o valor de t_{1/2} do SHN tratado, porque ele foi alterado a ponto de ser mais lento do que o tempo estipulado para o ensaio cinético (15 minutos). Essas amostras estão sinalizadas com o símbolo #. Para aquelas concentrações que foi possível calcular o valor de t_{1/2} do SHN tratado, fez-se a análise estatística, sendo que aquelas que apresentaram diferença significativa em relação ao controle (p<0,005) estão sinalizadas com o símbolo *.

Figura 12 – Valores médios de t_{1/2} em segundos no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações da fração BT-Aq de *B. tenella* na VC/VL. Cada coluna representa a média de três leituras de um ensaio representativo. SHN: soro humano normal não tratado. * p<0,005 em comparação ao SHN.

Figura 13– Valores médios de t_{1/2} em segundos no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações da fração BT-B de *B. tenella* na VC/VL. Cada coluna representa a média de três leituras de um ensaio representativo. SHN: soro humano normal não tratado. * p<0,005 em comparação ao SHN.

Figura 14 – Valores médios de t_{1/2} em segundos no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações da fração BT-H de *B. tenella* na VC/VL. Cada coluna representa a média de três leituras de um ensaio representativo. SHN: soro humano normal não tratado. *p<0,005 em comparação ao SHN. #concentrações nas quais não foi possível calcular o valor médio de t_{1/2} porque ele se apresentou mais lento que o tempo de leitura do ensaio cinético (>900s).

Figura 15 – Valores médios de t_{1/2} em segundos no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações da fração BT-M de *B. tenella* na VC/VL. Cada coluna representa a média de três leituras de um ensaio representativo. SHN: soro humano normal não tratado. * p<0,005 em comparação ao SHN.

Figura 16 – Valores médios de t_{1/2} em segundos no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações da subfração BTH-A de *B. tenella* na VC/VL. Cada coluna representa a média de três leituras de um ensaio representativo. SHN: soro humano normal não tratado. * p<0,005 em comparação ao SHN. #concentrações nas quais não foi possível calcular o valor médio de t_{1/2} porque ele se apresentou mais lento que o tempo de leitura do ensaio cinético (900s).

Figura 17 – Valores médios de t_{1/2} em segundos no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações da subfração BTH-AM de *B. tenella* na VC/VL. Cada coluna representa a média de três leituras de um ensaio representativo. SHN: soro humano normal não tratado. * p<0,005 em comparação ao SHN. #concentrações nas quais não foi possível calcular o valor médio de t_{1/2} porque ele se apresentou mais lento que o tempo de leitura do ensaio cinético (>900s).

Figura 18 – Valores médios de t_{1/2} em segundos no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações da subfração BTH-D de *B. tenella* na VC/VL. Cada coluna representa a média de três leituras de um ensaio representativo. SHN: soro humano normal não tratado. * p<0,005 em comparação ao SHN. #concentrações nas quais não foi possível calcular o valor médio de t_{1/2} porque ele se apresentou mais lento que o tempo de leitura do ensaio cinético (>900s).

Figura 19 – Valores médios de t_{1/2} em segundos no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações da subfração BTH-H de *B. tenella* na VC/VL. Cada coluna representa a média de três leituras de um ensaio representativo. SHN: soro humano normal não tratado. * p<0,005 em comparação ao SHN.

Atividade hemolítica na VC/VL da subfração BTH-HD de *B. tenella*

Figura 20 – Valores médios de t_{1/2} em segundos no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações da subfração BTH-HD de *B. tenella* na VC/VL. Cada coluna representa a média de três leituras de um ensaio representativo. SHN: soro humano normal não tratado. * p<0,005 em comparação ao SHN.

Atividade hemolítica na VC/VL da subfração BTH-M de *B. tenella*

Figura 21 – Valores médios de t_{1/2} em segundos no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações da subfração BTH-M de *B. tenella* na VC/VL. Cada coluna representa a média de três leituras de um ensaio representativo. SHN: soro humano normal não tratado. * p<0,005 em comparação ao SHN. #concentrações nas quais não foi possível calcular o valor médio de t_{1/2} porque ele se apresentou mais lento que o tempo de leitura do ensaio cinético (>900s).

Atividade hemolítica na VC/VL do extrato T-06 de endofíticos

Figura 22 – Valores médios de t_{1/2} em segundos no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações do extrato T06 de *B. tenella* na VC/VL. Cada coluna representa a média de três leituras de um ensaio representativo. SHN: soro humano normal não tratado. * p<0,005 em comparação ao SHN.

Atividade hemolítica na VC/VL do extrato T-65 de endofíticos

Figura 23 – Valores médios de t_{1/2} em segundos no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações do extrato T65 de *B. tenella* na VC/VL. Cada coluna representa a média de três leituras de um ensaio representativo. SHN: soro humano normal não tratado. * p<0,005 em comparação ao SHN.

Atividade hemolítica na VC/VL do extrato T-66 de endofíticos

Figura 24 – Valores médios de t_{1/2} em segundos no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações do extrato T66 de *B. tenella* na VC/VL. Cada coluna representa a média de três leituras de um ensaio representativo. SHN: soro humano normal não tratado. * p<0,005 em comparação ao SHN.

Atividade hemolítica na VC/VL do extrato T-67 de endofíticos

Figura 25 – Valores médios de t_{1/2} em segundos no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações do extrato T67 de *B. tenella* na VC/VL. Cada coluna representa a média de três leituras de um ensaio representativo. SHN: soro humano normal não tratado. * p<0,005 em comparação ao SHN

Atividade hemolítica na VC/VL do extrato T-68 de endofíticos

Figura 26 – Valores médios de t_{1/2} em segundos no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações do extrato T68 de *B. tenella* na VC/VL. Cada coluna representa a média de três leituras de um ensaio representativo. SHN: soro humano normal não tratado. * p<0,005 em comparação ao SHN.

Atividade hemolítica na VC/VL do extrato T-69 de endofíticos

Figura 27 – Valores médios de t_{1/2} em segundos no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações do extrato T69 de *B. tenella* na VC/VL. Cada coluna representa a média de três leituras de um ensaio representativo. SHN: soro humano normal não tratado. * p<0,005 em comparação ao SHN.

Atividade hemolítica na VC/VL do extrato T-70 de endofíticos

Figura 28 – Valores médios de t_{1/2} em segundos no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações do extrato T70 de *B. tenella* na VC/VL. Cada coluna representa a média de três leituras de um ensaio representativo. SHN: soro humano normal não tratado. * p<0,005 em comparação ao SHN..

Atividade hemolítica na VC/VL do extrato T-71 de endofíticos

Figura 29 – Valores médios de t_{1/2} em segundos no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações do extrato T71 de *B. tenella* na VC/VL. Cada coluna representa a média de três leituras de um ensaio representativo. SHN: soro humano normal não tratado. * p<0,005 em comparação ao SHN.

Atividade hemolítica na VC/VL do extrato T-72 de endofíticos

Figura 30 – Valores médios de t1/2 em segundos no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações do extrato T72 de *B. tenella* na VC/VL. Cada coluna representa a média de três leituras de um ensaio representativo. SHN: soro humano normal não tratado. * p<0,005 em comparação ao SHN. #concentrações nas quais não foi possível calcular o valor médio de t1/2 porque ele se apresentou mais lento que o tempo de leitura do ensaio cinético (>900s).

Atividade hemolítica na VC/VL do extrato T-73 de endofíticos

Figura 31 – Valores médios de t1/2 em segundos no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações do extrato T73 de *B. tenella* na VC/VL. Cada coluna representa a média de três leituras de um ensaio representativo. SHN: soro humano normal não tratado. * p<0,005 em comparação ao SHN.

Após análise estatística dos dados, observou-se que a maioria das amostras apresentava modulação do SC através do aumento dos valores médios de $t_{1/2}$ do SHN tratado. No caso das 4 frações de *B. tenella*, a BT-H foi a única que provocou aumento no valor médio de $t_{1/2}$ em todas as concentrações avaliadas (Figura 14), enquanto que as outras causaram essa mesma alteração somente na maior concentração (1000µg/mL) (Figuras 12, 13 e 15).

Com relação às 6 subfrações de BT-H da *B. tenella*, à exceção de BTH-H e BTH-HD que não alteraram significativamente o valor de $t_{1/2}$ do SHN (Figuras 19 e 20), todas foram capazes de aumentar o valor de $t_{1/2}$ do SHN tratado. As subfrações BTH-D e BTH-M provocaram esse aumento em todas as concentrações testadas (Figuras 18 e 21).

Ainda, para as 4 subfrações de BT-H que modularam o complemento, não foi possível calcular o valor do $t_{1/2}$ do SHN quando tratado, pelo menos, com a maior concentração (1000µg/mL). Isso porque a lise das hemácias pelo SC nessas concentrações foi mais lenta do que o tempo estipulado para avaliar a cinética hemolítica desse ensaio (< 900 segundos).

Para os extratos de micro-organismos endofíticos isolados de *B. tenella* observou-se que todas as 10 amostras avaliadas foram capazes de aumentar significativamente o valor de $t_{1/2}$ do SHN. O extrato T73 mostrou esse aumento somente nas quatro maiores concentrações (1000, 500, 250 e 100µg/mL), enquanto que o T69, somente nas duas maiores concentrações (Figuras 31 e 27, respectivamente). Os demais extratos aumentaram o valor de $t_{1/2}$ em todas as concentrações avaliadas, sendo que o T72 testado em sua maior concentração (1000µg/mL) não permitiu o cálculo do $t_{1/2}$ do SHN, já que a hemólise ficou mais lenta do que o tempo estipulado (Figura 30).

Para todas as amostras que apresentaram modulação do SC, foram feitos mais dois ensaios distintos, em triplicata e, partir dos valores médios de $t_{1/2}$ do SHN tratado, calculou-se a porcentagem de inibição de cada concentração avaliada (Figura 9).

Para as amostras que apresentaram porcentagens de inibição acima de 50% criou-se o gráfico “porcentagem de inibição *versus* concentração” e, por meio de regressão linear, calculou-se o valor da IC₅₀, que corresponde à concentração de amostra capaz de inibir 50% da hemólise (Figura 32).

Com a média dos valores de IC50 dos três ensaios estipulou-se que essa seria a concentração a ser testada nas metodologias seguintes (Tabela 4). Sendo assim, as amostras selecionadas foram: BT-H, BTH-A, BTH-AM, BTH-D, BTH-M, T68, T72, T73.

Figura 32 – Gráfico representativo da porcentagem de inibição da hemólise *versus* a concentração da amostra (µg/mL) que permite calcular o valor da IC50 para cada ensaio por regressão linear.

Tabela 4 – Média dos valores de IC50 (µg/mL) das amostras que apresentaram mais de 50% de inibição do SC através da VC/VL.

Amostras	IC50 (µg/mL)	Amostras	IC50 (µg/mL)
BT-H	52,22	BTH-M	114,70
BTH-A	463,79	T68	1029,79
BTH-AM	46,38	T72	312,19
BTH-D	122,14	T73	1084,95

6.1.2. Via Alternativa

Para avaliar as amostras na VA, as diluições foram feitas a partir da amostra inicial solubilizada em DMSO 1% (5000µg/mL), em tampão próprio para a VA (tampão TEA-EGTA-Mg²⁺):

- C1: 1000µg/mL
- C2: 500µg/mL
- C3: 250µg/mL
- C4: 100µg/mL
- C5: 50µg/mL
- C6: 10µg/mL

Os resultados obtidos nos ensaios hemolíticos da VA são apresentados nas figuras seguintes (Figura 33 a 52). Da mesma forma que para a VC/VL, as concentrações nas quais não foi possível calcular o valor médio de t_{1/2} devido ao fato de ter ultrapassado os 900 segundos ou 15 minutos estipulados para leitura do ensaio cinético estão sinalizadas com o símbolo #. Para aquelas em que foi possível calcular o valor de t_{1/2}, fez-se a análise estatística, sendo que as que tiveram diferença significativa quando comparadas com o controle estão sinalizadas com o símbolo *.

Figura 33 – Valores médios de t_{1/2} em segundos no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações da fração BT-Aq de *B. tenella* na VA. SHN: soro humano normal não tratado. * p<0,005 em comparação ao SHN. #concentrações nas quais não foi possível calcular o valor médio de t_{1/2} porque ele se apresentou mais lento que o tempo de leitura do ensaio cinético (>900s).

Figura 34 – Valores médios de t_{1/2} em segundos no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações da fração BT-B de *B. tenella* na VA. Cada coluna representa a média de três leituras de um ensaio representativo. SHN: soro humano normal não tratado. * p<0,005 em comparação ao SHN.

Figura 35 – Valores médios de t_{1/2} em segundos no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações da fração BT-H de *B. tenella* na VA. Cada coluna representa a média de três leituras de um ensaio representativo. SHN: soro humano normal não tratado. * p<0,005 em comparação ao SHN. #concentrações nas quais não foi possível calcular o valor médio de t_{1/2} porque ele se apresentou mais lento que o tempo de leitura do ensaio cinético (>900s).

Figura 36 – Valores médios de t_{1/2} em segundos no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações da fração BT-M de *B. tenella* na VA. Cada coluna representa a média de três leituras de um ensaio representativo. SHN: soro humano normal não tratado. * p<0,005 em comparação ao SHN.

Atividade hemolítica na VA da subfração BTH-A de *B. tenella*

Figura 37 – Valores médios de t_{1/2} em segundos no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações da subfração BTH-A de *B. tenella* na VA. Cada coluna representa a média de três leituras de um ensaio representativo. SHN: soro humano normal não tratado. * p<0,005 em comparação ao SHN.

Atividade hemolítica na VA da subfração BTH-AM de *B. tenella*

Figura 38 – Valores médios de t_{1/2} em segundos no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações da subfração BTH-AM de *B. tenella* na VA. Cada coluna representa a média de três leituras de um ensaio representativo. SHN: soro humano normal não tratado. * p<0,005 em comparação ao SHN. #concentrações nas quais não foi possível calcular o valor médio de t_{1/2} porque ele se apresentou mais lento que o tempo de leitura do ensaio cinético (>900s).

Atividade hemolítica na VA da subfração BTH-D de *B. tenella*

Figura 39 – Valores médios de t_{1/2} em segundos no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações da subfração BTH-D de *B. tenella* na VA. Cada coluna representa a média de três leituras de um ensaio representativo. SHN: soro humano normal não tratado. * p<0,005 em comparação ao SHN.

Atividade hemolítica na VA da subfração BTH-H de *B. tenella*

Figura 40 – Valores médios de t_{1/2} em segundos no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações da subfração BTH-H de *B. tenella* na VA. Cada coluna representa a média de três leituras de um ensaio representativo. SHN: soro humano normal não tratado. * p<0,005 em comparação ao SHN.

Atividade hemolítica na VA da subfração BTH-HD de *B. tenella*

Figura 41 – Valores médios de t_{1/2} em segundos no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações da subfração BTH-HD de *B. tenella* na VA. Cada coluna representa a média de três leituras de um ensaio representativo. SHN: soro humano normal não tratado. * p<0,005 em comparação ao SHN.

Atividade hemolítica na VA da subfração BTH-M de *B. tenella*

Figura 42 – Valores médios de t_{1/2} em segundos no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações da subfração BTH-M de *B. tenella* na VA. Cada coluna representa a média de três leituras de um ensaio representativo. SHN: soro humano normal não tratado. * p<0,005 em comparação ao SHN.

Atividade hemolítica na VA do extrato T-06 de endofíticos

Figura 43 – Valores médios de t_{1/2} em segundos no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações do extrato T06 de micro-organismos endofíticos isolados da macroalga *B. tenella* na VA. Cada coluna representa a média de três leituras de um ensaio representativo. SHN: soro humano normal não tratado. * p<0,005 em comparação ao SHN.

Atividade hemolítica na VA do extrato T-65 de endofíticos

Figura 44 – Valores médios de t_{1/2} em segundos no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações do extrato T65 de micro-organismos endofíticos isolados da macroalga *B. tenella* na VA. Cada coluna representa a média de três leituras de um ensaio representativo. SHN: soro humano normal não tratado. * p<0,005 em comparação ao SHN.

Figura 45 – Valores médios de t_{1/2} em segundos no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações do extrato T66 de micro-organismos endofíticos isolados da macroalga *B. tenella* na VA. Cada coluna representa a média de três leituras de um ensaio representativo. SHN: soro humano normal não tratado. * p<0,005 em comparação ao SHN.

Figura 46 – Valores médios de t_{1/2} em segundos no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações do extrato T67 de micro-organismos endofíticos isolados da macroalga *B. tenella* na VA. Cada coluna representa a média de três leituras de um ensaio representativo. SHN: soro humano normal não tratado. * p<0,005 em comparação ao SHN.

Atividade hemolítica na VA do extrato T-68 de endofíticos

Figura 47 – Valores médios de t_{1/2} em segundos no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações do extrato T68 de micro-organismos endofíticos isolados da macroalga *B. tenella* na VA. Cada coluna representa a média de três leituras de um ensaio representativo. SHN: soro humano normal não tratado. * p<0,005 em comparação ao SHN.

Atividade hemolítica na VA do extrato T-69 de endofíticos

Figura 48 – Valores médios de t_{1/2} em segundos no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações do extrato T69 de micro-organismos endofíticos isolados da macroalga *B. tenella* na VA. Cada coluna representa a média de três leituras de um ensaio representativo. SHN: soro humano normal não tratado. * p<0,005 em comparação ao SHN.

Atividade hemolítica na VA do extrato T-70 de endofíticos

Figura 49 – Valores médios de t_{1/2} em segundos no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações do extrato T70 de micro-organismos endofíticos isolados da macroalga *B. tenella* na VA. Cada coluna representa a média de três leituras de um ensaio representativo. SHN: soro humano normal não tratado. * p<0,005 em comparação ao SHN.

Atividade hemolítica na VA do extrato T-71 de endofíticos

Figura 50 – Valores médios de t_{1/2} em segundos no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações do extrato T71 de micro-organismos endofíticos isolados da macroalga *B. tenella* na VA. Cada coluna representa a média de três leituras de um ensaio representativo. SHN: soro humano normal não tratado. * p<0,005 em comparação ao SHN.

Atividade hemolítica na VA do extrato T-72 de endofíticos

Figura 51 – Valores médios de t_{1/2} em segundos no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações do extrato T72 de micro-organismos endofíticos isolados da macroalga *B. tenella* na VA. Cada coluna representa a média de três leituras de um ensaio representativo. SHN: soro humano normal não tratado. * p<0,005 em comparação ao SHN.

Atividade hemolítica na VA do extrato T-73 de endofíticos

Figura 52 – Valores médios de t_{1/2} em segundos no SHN não tratado e tratado com diferentes concentrações do extrato T73 de micro-organismos endofíticos isolados da macroalga *B. tenella* na VA. Cada coluna representa a média de três leituras de um ensaio representativo. SHN: soro humano normal não tratado. * p<0,005 em comparação ao SHN.

Os dados obtidos nos ensaios hemolíticos da VA foram analisados estatisticamente, e observou-se que, das 20 amostras iniciais, 6 não alteraram significativamente o valor médio de $t_{1/2}$ do SHN tratado.

Com relação às 4 frações de *B. tenella*, somente a fração BT-B não alterou significativamente o valor de $t_{1/2}$ do SHN tratado, enquanto as outras três provocaram seu aumento nas maiores concentrações (Figuras 33, 35 e 36), inclusive a fração BT-H causou esse mesmo aumento em todas as concentrações testadas.

Quanto às subfrações de BT-H, somente a subfração BTH-H não causou alteração no valor médio de $t_{1/2}$ do SHN tratado (Figura 40). As outras 5 subfrações provocaram seu aumento nas duas maiores concentrações (1000 e 500 $\mu\text{g/mL}$), e a subfração BTH-D, em todas as concentrações testadas (Figura 39).

Dos 10 extratos de micro-organismos, 4 deles não alteraram o valor de $t_{1/2}$ do SHN tratado (T66, T67, T70 e T71). Entretanto, os extratos T65, T72 e T73 aumentaram os valores médios de $t_{1/2}$ do SHN tratado em todas as concentrações (Figuras 44, 51 e 52). Os extratos T06, T68 e T69 causaram esse mesmo aumento, de modo geral, nas três maiores concentrações (1000, 500 e 250 $\mu\text{g/mL}$).

Sendo assim, para as amostras que apresentaram modulação do SC na VA foram feitos mais dois ensaios de atividade hemolítica, em triplicata. A partir dos valores médios de $t_{1/2}$ do SHN tratado calculou-se a porcentagem de inibição de cada concentração avaliada (Figura 9). Aquelas que apresentaram mais de 50% de inibição tiveram seus valores de IC50 calculados, através do gráfico “porcentagem de inibição *versus* concentração” (Figura 32).

Por fim, com a média das IC50 dos três ensaios, determinaram-se as concentrações a serem testadas de cada amostra nas metodologias seguintes (Tabela 5). Portanto, as amostras selecionadas foram: BT-Aq, BT-H, BTH-AM, BTH-M, T65 e T72.

Tabela 5 – Valores de IC50 ($\mu\text{g/mL}$) das amostras que apresentaram mais de 50% de inibição do SC através da VA.

Amostras	IC50 ($\mu\text{g/mL}$)	Amostras	IC50 ($\mu\text{g/mL}$)
BT-Aq	467,11	BTH-M	763,24
BT-H	705,53	T65	244,38
BTH-AM	1054,16	T72	1256,89

Considerando as amostras selecionadas, tanto na VC/VL, quanto na VA, observa-se que algumas foram capazes de modular o SC nas duas vias de ativação. Nesses casos, utilizou-se o menor valor de IC50 obtido para realizar as análises seguintes. Na Tabela 6, essas amostras encontram-se na coluna central, destacadas em negrito, enquanto que, nas colunas externas, encontram-se aquelas que modularam as diferentes vias de ativação.

Tabela 6 – Seleção das amostras após a triagem realizada através do ensaio de atividade hemolítica (método cinético) na VC/VL e na VA.

Amostras que modularam a VC/VL	Amostras selecionadas	Amostras que modularam a VA
BT-H	BT-Aq	BT-Aq
BTH-A	BT-H	BT-H
BTH-AM	BTH-AM	BTH-AM
BTH-D	BTH-A	BTH-M
BTH-M	BTH-D	T65
T68	BTH-M	T72
T72	T65	-
T73	T68	-
-	T72	-
	T73	

Nota: Na coluna central encontram-se destacadas em negrito as amostras que modularam ambas as vias de ativação do complemento.

Considerando-se todos os resultados de atividade hemolítica, a maioria das amostras avaliadas apresentou modulação do SC no SHN tratado, seja na VC/VL, na VA, ou ambas as vias. De modo geral, isso ocorreu nas maiores concentrações testadas (1000, 500, 250 e 100µg/mL). Porém, quando se trata de frações e extratos naturais, especialmente aqueles oriundos de fontes exóticas e de difícil acesso, trabalhar com concentrações muito altas pode ser um fator limitante, já que são

necessárias grandes quantidades de matéria-prima para obtenção dos mesmos (BHAKUNI; RAWAT, 2010; MOLINSKI et al., 2009). Mas, vale ressaltar que muitas das amostras avaliadas nesse estudo apresentaram modulação em concentrações menores que 100µg/mL.

Outro importante aspecto a ser considerado é o fato de que as frações e extratos são compostos por misturas complexas. Desse modo, substâncias que possuem atividade biológica podem estar presentes em concentrações muito pequenas, o que pode diminuir seu verdadeiro potencial biológico. Por isso, os estudos que avaliam os extratos e misturas são apenas o ponto de partida para tentar encontrar e isolar as substâncias com atividade (BAKER et al., 2007).

Sendo assim, é possível que muitas das amostras avaliadas apresentassem resultados mais interessantes se fossem purificadas, embora 50% das amostras iniciais tenham sido apontadas nos ensaios de triagem como moduladoras do SC presente no SHN tratado, em maior ou menor grau.

Como discutido, anteriormente na sessão “*Ensaio de atividade hemolítica*”, os resultados apresentados aqui permitem reconhecer, apenas, se há ou não modulação do SC no SHN tratado. Existem diferentes possibilidades para a atuação de uma, ou mais, substâncias presentes nas amostras, que podem interferir diretamente com o complemento ou, ainda, sobre o seu sistema regulatório (SERRUTO, 2010; THURMAN; RENNER, 2011). Para se conhecer informações mais precisas sobre o tipo de modulação são necessárias outras metodologias mais específicas, bem como identificar qual, ou quais, substâncias possuem tal propriedade.

Desse modo, os ensaios de atividade hemolítica tiveram como objetivo a seleção de amostras com potencial imunomodulador sobre o SC humano, para que elas fossem estudadas de maneira mais aprofundada, fornecendo subsídios para ajudar na elucidação de mecanismos de ativação, bloqueio e regulação do SC que possam ser úteis nas mais diversas condições patológicas em que o complemento atua.

6.2. Imunoeletroforese bidimensional para geração de fragmento C3b

Essa técnica foi realizada com as 10 amostras selecionadas, anteriormente, através do ensaio hemolítico, em ambas as vias de ativação do complemento: BT-H, BT-Aq, BTH-D, BTH-AM, BTH-M, BTH-A, T65, T68, T72 e T73. Por meio dela é possível verificar a presença ou não do fragmento de clivagem da proteína C3, o C3b, após o tratamento do SHN com as amostras, se houver ativação do SC.

Após o tratamento do SHN, realiza-se a corrida eletroforética em 1ª dimensão, com o intuito de separar a proteína C3 íntegra do fragmento C3b, se este tiver sido formado após ativação do complemento. Como o fragmento de C3b (185kDa) é mais leve, ele migra mais do que a proteína C3 inteira (195kDa). Num segundo momento, é feita uma nova corrida na qual a direção da lâmina é alterada em 90°, fazendo com que a proteína C3 e o fragmento C3b migrem em direção ao gel de agarose contendo o anticorpo anti-C3. Sendo assim, após a coloração da lâmina, é possível visualizar a formação de um ou dois picos, que representam a proteína inteira e seu fragmento de ativação. Na Figura 53 é possível observar de forma esquematizada, as direções das corridas e os picos formados.

No controle negativo, observa-se que o primeiro pico (da esquerda para a direita), de tamanho maior, corresponde ao C3 inteiro. O segundo pico corresponde ao fragmento C3b que, quando visualizado, aparece em tamanho muito menor, referente à ativação espontânea do complemento causada pelo manuseio do SHN. No controle positivo, observa-se o perfil oposto: o segundo pico, de C3b, é maior do que o primeiro pico, que corresponde ao C3 inteiro. Isso ocorre em função da ativação do SC no tratamento do SHN com o ativador zymosan. Sendo assim, é formada uma grande quantidade de fragmento de clivagem, evidenciando a ativação do complemento.

Os resultados do SHN tratado com as amostras foram comparados com controles diferentes uns dos outros, já que o volume de amostra utilizado para o tratamento do SHN variou de acordo com o valor de IC50. Desse modo, os controles negativo e positivo foram feitos com volumes de PBS e zymosan, respectivamente, iguais aos volumes de amostra utilizados no tratamento do SHN. Os resultados obtidos estão apresentados nas figuras seguintes (Figuras 53 a 58):

Figura 53 – Perfis obtidos na IEFbi para C3 e seu fragmento C3b no SHN tratado com as amostras BT-Aq e T72, juntamente com seus controles negativo e positivo.

Figura 54 – Perfis obtidos na IEFbi para C3 e seu fragmento C3b no SHN tratado com as amostras BT-H e BTH-AM, juntamente com seus controles positivo e negativo.

Figura 55 – Perfis obtidos na IEFbi para C3 e seu fragmento C3b no SHN tratado com as amostras BTH-M e T65, juntamente com seus controles positivo e negativo.

Figura 56 – Perfis obtidos na IEFbi para C3 e seu fragmento C3b no SHN tratado com as amostras BTH-D e BTHA, juntamente com seus controles positivo e negativo.

Figura 57 – Perfis obtidos na IEFbi para C3 e seu fragmento C3b no SHN tratado com as amostras T68 e T73, juntamente com seus controles positivo e negativo.

Através da análise comparativa dos perfis obtidos no SHN tratado com os perfis dos controles positivo e negativo, observa-se que, à exceção dos extratos T68 e T73, houve formação do fragmento C3b, gerado quando há ativação do SC e clivagem do componente C3, independentemente da via de ativação.

A subfração BTH-D e os extratos T65 e T72 apresentaram perfis de clivagem semelhantes aos seus controles negativos. Entretanto, por ser possível observar nas três amostras pequenos picos de C3b, considerou-se que houve clivagem do C3, mesmo que numa intensidade menor.

Já as frações BT-H e BT-Aq, juntamente com as subfrações BTH-AM, BTH-M e BTH-A apresentaram perfis de clivagem da proteína C3 semelhantes aos perfis dos controles positivos.

Para os extratos T68 e T73 considerou-se que não houve ativação do complemento e, conseqüentemente, clivagem de C3, nas IC50 testadas. Isso porque os perfis obtidos apresentam-se muito semelhantes aos dos controles negativos e, também, porque não foi possível visualizar a formação de picos menores de C3b em nenhum dos dois extratos.

Por esse motivo, testou-se o dobro da IC50 desses dois extratos, e como resultado observou-se que houve formação de pequenos picos de fragmento C3b,

em ambas as amostras, embora os seus perfis tenham mantido semelhança com o controle negativo. Sendo assim, considerou-se que houve clivagem e formação de C3b no SHN tratado, quando considerado o dobro do valor de IC50 para essas duas amostras (Figura 58).

Figura 58 – Perfis obtidos na IEFbi para C3 e seu fragmento C3b no SHN tratado com o dobro da IC50 das amostras T68 e T73, juntamente com seus controles positivo e negativo.

Como já descrito, a proteína C3 é componente central do SC, pois as três vias de ativação levam à sua clivagem, dando continuidade à via comum do complemento, que termina com a formação do complexo de ataque à membrana (MAC). Desse modo, essa análise era fundamental para definir se havia ou não ativação do SC presente no SHN, durante seu tratamento com as amostras.

Como todos os SHN tratados apresentaram formação do fragmento C3b, em maior ou menor quantidade, concluiu-se que houve ativação do SC durante seu tratamento com todas as amostras que apresentaram modulação do complemento nos ensaios de atividade hemolítica.

Porém, como foram avaliadas misturas complexas, o fato de ter ocorrido ativação do SC não exclui a possibilidade de haver nas amostras substâncias que atuem sobre as proteínas inibitórias, além daquelas que causaram sua ativação.

Isso porque, como já discutido na seção “*Ensaio de atividade hemolítica*”, pode haver nas misturas substâncias que bloqueiem proteínas inibitórias, enquanto outras sejam capazes de causar a ativação do complemento. Nesse caso, durante o tratamento do SHN ocorreria um grande consumo dos componentes do sistema, causando aumento no tempo de hemólise.

Entretanto, em ambas as possibilidades, sabe-se que houve ativação e consumo dos componentes do SC, no período de tratamento do SHN com as

amostras, resultando num tempo maior para causar a lise das hemácias pelo complemento residual (valor aumentado de $t_{1/2}$).

6.3. Western blotting para análise dos fragmentos de C3, C4 e Fator B

As análises feitas pela metodologia do western blotting (WB) foram feitas da mesma forma que na IEFbi para análise de C3, utilizando-se SHN tratado com a IC50 de cada amostra na diluição de 1:100. Como controle negativo utilizou-se o SHN não tratado para que fosse considerada a ativação espontânea do complemento causada pelo manuseio do SHN e, também, foi feito um controle positivo utilizando-se SHN tratado com zymosan.

As bandas obtidas em cada análise foram quantificadas no programa de imagem *Scion Image* – *Scion Corporation*, através da densidade de cor das bandas formadas nas membranas, em pixels. Os valores calculados para as bandas de interesse em cada amostra encontram-se nas Tabelas 7, 8 e 9. As Figuras 59, 61 e 62 mostram as membranas de PVDF reveladas com o substrato DAB, onde são destacadas as bandas que representam os fragmentos de C3, C4 e Fator B, respectivamente.

6.3.1. Análise de C3

Figura 59 – Análise por *western blotting* da proteína C3 e seus fragmentos no SHN não tratado e tratado com zymosan, frações, subfrações e extratos, por 1h a 37°C, na diluição 1:100. Os produtos de clivagem do C3 estão indicados por setas.

Tabela 7 – Quantificação das bandas de interesse obtidas na membrana de *western blotting* para análise dos fragmentos de C3 no SHN tratado com as frações, subfrações e extratos, na diluição 1:100.

Amostras	Banda 43kDa	Amostras	Banda 43kDa
ZY	1478,0	ZY	2716,0
SHN	1020,0	SHN	2099,0
BT-H	2923,0	BT-Aq	3563,0
BTH-AM	3659,0	T65	1633,0
BTH-M	3580,0	T68	1577,0
BTH-D	2506,0	T72	2059,0
BTH-A	2691,0	T73	2290,0

Nas membranas de WB para o componente C3 do complemento observou-se a presença do fragmento $\alpha'2$ em todas as amostras, incluindo os controles. Conforme mostra a Figura 60, o fragmento $\alpha'2$ faz parte da molécula de C3b, que é produto de clivagem da cadeia α da proteína de C3 e possui o tamanho de 43kDa.

Figura 60 – Ilustração esquemática da proteína C3 e seus produtos de clivagem (WAGNER; FRANK, 2010). O fragmento $\alpha'2$ encontra-se no destaque.

A presença desse fragmento indica que houve ativação do SC durante o tratamento do SHN, independentemente da via de ativação, com a subsequente clivagem da proteína C3. Sua presença no controle negativo indica ativação

espontânea do complemento devido à manipulação do SHN não tratado, como observado, também, nas lâminas de IEFBI para C3 íntegro e o fragmento C3b.

Nas membranas observam-se, ainda, bandas de 75kDa que correspondem à cadeia β da molécula de C3 (Figura 59). Entretanto, essa cadeia não é produto de clivagem da molécula de C3 e, portanto, não serve como marcador de ativação do SC.

A quantificação da banda de 43kDa (fragmento $\alpha'2$) mostra que todas as amostras analisadas induziram a clivagem de C3 no SHN através da ativação do complemento. Comparando os valores obtidos no SHN tratado com os valores no SHN não tratado, nota-se que somente as amostras T65, T68 e T72 não apresentaram uma quantidade maior do fragmento $\alpha'2$.

Esse resultado pode significar que essas três amostras não ativaram o SC, sendo os fragmentos gerados produto da clivagem espontânea de C3, já que o SHN não tratado tinha como função delimitar a clivagem espontânea daquela provocada pela amostra.

Porém, esta técnica de WB que utiliza *pool* de SHN ao invés de proteínas do complemento purificadas, é uma técnica desenvolvida em nosso laboratório e que está, ainda, sendo aperfeiçoada. Uma das dificuldades encontradas, por exemplo, foi avaliar a melhor diluição do SHN, pois nem todas as proteínas do SC encontram-se na mesma concentração no soro. Portanto, para cada uma delas é preciso encontrar uma diluição que elimine a maior parte das proteínas do SHN que podem interferir na análise, mas que não seja diluída em excesso, a ponto de não representar de maneira fidedigna os resultados.

O WB para análise dos fragmentos de C3 tinha dois objetivos: confirmar os resultados da técnica de IEFbi para análise da clivagem de C3, e ser avaliada como uma nova metodologia para ser utilizada em substituição à técnica imunoeletroforética utilizando-se o *pool* de SHN tratado.

Como os resultados do WB para fragmentos de C3 foram coerentes com aqueles obtidos na IEFbi, mostrando que houve formação de fragmentos de clivagem no SHN tratado com todas as amostras, pode-se concluir que é possível utilizá-la como uma metodologia alternativa à imunoeletroferese que, apesar de ser uma técnica tradicional na análise de fragmentos do complemento, é também uma técnica antiga e apenas qualitativa.

6.3.2. Análise de C4

Figura 61 – Análise por *western blotting* da proteína C4 e seus fragmentos no SHN não tratado e tratado com zymosan, frações, subfrações e extratos por 1h, a 37°C, na diluição 1:100. Os produtos de clivagem do C4 estão indicados por setas.

Tabela 8 – Quantificação das bandas de interesse obtidas na membrana de western blotting para análise dos fragmentos de C4 no SHN tratado com as frações, subfrações e extratos, na diluição 1:100.

Amostras	Banda 47kDa	Banda 8kDa	Amostras	Banda 47kDa	Banda 8kDa
ZY	1221,0	682,0	ZY	938,0	-
SHN	1006,0	-	SHN	568,0	-
BT-H	-	1111,0	BT-Aq	-	662,0
BTH-AM	455,0	1658,0	T65	245,0	-
BTH-M	1054,0	1045,0	T68	847,0	289,0
BTH-D	-	1469,0	T72	442,0	434,0
BTH-A	-	1395,0	T73	737,0	1074,0

A análise das membranas de C4 mostra que duas bandas ficaram bem evidentes: a banda de 47kDa, que corresponde ao fragmento C4d, e a banda de 8kDa, que corresponde ao fragmento de C4a. Nem todas as amostras apresentaram os dois fragmentos, entretanto, a presença de somente um deles já é indicativo de ativação do SC através da VC/VL, já que ambos são produtos de clivagem da cadeia α da molécula de C4 e fazem parte da via clássica e da via das lectinas.

Através da quantificação da banda de 47kDa, observou-se que nem todas as amostras que induziram a formação de C4d no SHN tratado possuíam valores maiores do que os do SHN não tratado, como a BTH-AM, T65 e T72. Por outro lado, através da quantificação das bandas de 8kDa, nota-se que a maioria das amostras que induziram o surgimento de C4a no SHN tratado apresentou valores elevados desse fragmento, enquanto que essa mesma banda não foi visível em nenhuma das duas membranas no SHN não tratado.

Cabe aqui, a mesma análise feita para o WB dos fragmentos de C3, na qual deve ser considerada a possibilidade da quantificação das bandas ter sofrido distorções em função da diluição do SHN, ao invés de afirmarmos que não houve ativação da VC/VL por parte das amostras cuja quantidade de fragmentos foi menor que a do SHN não tratado, embora isso possa ser possível.

No caso do componente C4, essa consideração é ainda mais pertinente do que para o C3, pois sua concentração no soro é de 300-600 μ g/mL, enquanto que a de C3 é de 1000-1200 μ g/mL. Considerando que ambos foram analisados na mesma diluição (1:100), pode ser que a proteína C4 e seus fragmentos estivessem em concentração muito baixa no SHN, o que pode ter prejudicado a sua detecção.

6.3.3. Análise de fator B

Figura 62 – Análise por *western blotting* da proteína Fator B e seus fragmentos no SHN não tratado e tratado com zymosan, frações, subfrações e extratos por 1h, a 37°C, diluição 1:60. Os produtos de clivagem do Fator B estão indicados por setas.

Tabela 9 – Quantificação das bandas obtidas na membrana de *western blotting* para análise dos fragmentos de Fator B no SHN tratado com as frações, subfrações e extratos, na diluição 1:60.

Amostras	Banda 63kDa	Amostras	Banda 63kDa
ZY	3200,0	ZY	5609,0
SHN	1480,0	SHN	2336,0
BT-H	3255,0	BT-Aq	4322,0
BTH-AM	2369,0	T65	1328,0
BTH-M	993,0	T68	1876,0
BTH-D	940,0	T72	2241,0
BTH-A	821,0	T73	1892,0

A análise das membranas para geração do fragmento de Fator B mostra que todas as amostras induziram a formação no SHN de uma banda de 63kDa no SHN tratado, que corresponde ao fragmento Bb, produto de clivagem da única cadeia do Fator B. Os valores obtidos na quantificação dessa banda de 63kDa (Bb) mostram que apenas as amostras BT-H, BTH-AM e BT-Aq levaram ao surgimento no SHN de quantidade maior do fragmento Bb do que no SHN não tratado.

Mas, deve-se considerar, também, que a concentração de Fator B no soro é de 200µg/mL, sendo dos três componentes avaliados aquele que se encontra em menor quantidade no SHN e, por esse motivo a diluição utilizada foi para ele foi de 1:60. Porém, isso não exclui a possibilidade do Fator B e seus fragmentos estarem presentes no SHN em concentrações muito baixas, o que poderia prejudicar sua detecção e quantificação.

O objetivo de analisar os fragmentos de C4 e Fator B no SHN tratado através do WB era avaliar qual via de ativação estava envolvida na ativação do SC provocada pelas amostras, durante o tratamento do SHN. Como o componente C4 faz parte da VC/VL, sua clivagem indica ativação por uma dessas duas vias. Já o Fator B é componente da VA e sua clivagem indica ativação do complemento por meio dela.

De acordo com os resultados obtidos na análise dos fragmentos de C4 observou-se que, com exceção do extrato T65, todas as outras amostras apresentaram pelo menos uma das duas bandas que correspondem aos seus produtos de clivagem em quantidade maior do que no SHN não tratado, o que indica ativação do SC por meio da VC/VL.

No caso do Fator B, os resultados mostraram que somente as amostras BT-H, BTH-AM e BT-Aq apresentaram bandas correspondentes ao fragmento Bb em quantidade maior que no SHN não tratado, o que indica ativação do SC por meio da VA somente por essas três amostras, sendo o restante considerada como clivagem espontânea.

6.4. Ensaio imunoenzimático para análise do complexo SC5b-9

A análise da geração no SHN de SC5b-9, que corresponde ao complexo de ataque à membrana (MAC) - último produto formado pela ativação do SC, foi feita através de dois ensaios imunoenzimáticos (ELISA), em duplicata. Da mesma forma, o SHN foi tratado com as amostras de acordo com seus valores de IC50. Como controle negativo utilizou-se o SHN com PBS, enquanto que, como controle positivo, o SHN tratado com zymosan.

Através da curva padrão do ensaio foi possível calcular a quantidade produzida desse fragmento no SHN tratado e não tratado. Quatro amostras (ZY, BT-Aq, T72 e T73) não tiveram os valores de SC5b-9 calculados no SHN tratado, porque induziram a formação de grande quantidade desse complexo, e seus valores de absorbância ultrapassaram a faixa de linearidade da curva padrão do ensaio. Essas amostras estão sinalizadas na Figura 63 com o símbolo #.

Figura 63 – Análise da geração e quantificação dos complexos SC5b-9 no SHN não tratado e tratado com as frações e subfrações de *Bostrychia tenella* e extratos de micro-organismos endofíticos associados através de ensaio imunoenzimático. Cada coluna representa a média de dois ensaios distintos, em duplicata. # amostras cuja quantidade de complexo SC5b-9 no SHN tratado não foi calculada porque seus valores de absorbância foram muito altos e saíram da faixa de linearidade até mesmo na diluição 1:250.

As quatro amostras que não tiveram calculadas as quantidades de SC5b9 no primeiro ensaio foram diluídas novamente (diluição 1:250) e, ainda assim, seus valores de absorbância não se encontraram dentro da faixa de linearidade do ensaio, o que indica a formação de grande quantidade desse complexo no SHN tratado por essas amostras. Para o restante foi possível calcular a quantidade produzida de SC5b-9 no SHN, tratado ou não.

Esse ensaio tinha como objetivo analisar se as amostras induziam ou não a formação do MAC no SHN tratado, o que indicaria ativação completa da cascata do complemento. Os resultados mostraram que todas as amostras, com exceção das subfrações BTH-D e BTH-A, produziram o complexo SC5b-9 (MAC) em maior quantidade do que no SHN não tratado. Isso evidencia que houve ativação total do SC no SHN tratado com essas amostras, já que todas elas também clivaram o componente central C3.

As subfrações BTH-D e BTH-A que não produziram o complexo SC5b-9 em quantidades maiores do que o SHN não tratado podem conter alguma substância presente na mistura que tenha impedido sua formação, caracterizando um tipo de regulação. Nesse caso, essa interferência teria ocorrido em algum ponto da via após a clivagem de C3, já que as duas amostras induziram sua clivagem por IEFbi e WB.

Avaliando de modo geral esse estudo, podemos concluir que as 10 amostras selecionadas entre as 20 iniciais ativaram completamente o SC, durante o tratamento do SHN com seus valores de IC50. Isso foi confirmado pelo fato de todas elas terem clivado o componente C3, bem como formado o MAC, último produto de ativação.

Porém, o fato das amostras serem constituídas por misturas complexas levanta mais uma hipótese sobre seus mecanismos de ação, além de afirmar que houve somente ativação direta do complemento por uma ou mais substâncias presentes nas amostras. Uma possível interferência sobre o sistema regulatório do complemento não pode ser excluída, já que ele possui uma variedade de proteínas regulatórias.

O SC possui papel fundamental na imunidade do organismo, mas sua participação em várias doenças autoimunes, inflamatórias e imunodeficiências, revela a necessidade de encontrar agentes capazes de modular esse sistema (WAGNER; FRANK, 2010). Nas condições em que ele é ineficaz, como na deficiência de seus componentes, ocorre susceptibilidade do indivíduo a infecções

recorrentes, nas quais substâncias capazes de ativá-lo ou mimetizar o papel das proteínas ausentes podem ser de grande importância para agentes moduladores do SC.

Por outro lado, existem as condições em que ele se apresenta demasiadamente ativado, levando ao dano tecidual, como nas diversas autoimunidades e doenças inflamatórias. Nessas situações, seu bloqueio ou a diminuição de sua atividade também se apresentam como alvos interessantes para agentes moduladores do SC.

Nesse contexto, diversos produtos naturais surgem como fonte rica de substâncias com diferentes atividades biológicas, como antivirais, analgésicas, antitumorais, antialérgicas, anti-inflamatórias e imunomoduladoras (CRAGG, 2010, 2012; D'ORAZIO et al., 2012; KULKARNI, 2005; NEWMAN). Especificamente no caso do sistema complemento, existem poucas substâncias naturais em uso. Esse fato é inerente às dificuldades da pesquisa com produtos naturais, mas também, aquelas relacionadas aos diferentes mecanismos de ativação e regulação do complemento, que exige muitos estudos sobre mecanismos de ação (WAGNER; FRANK, 2010).

A heparina e o *Cobra-Venom Factor* (CVF) são substâncias naturais que possuem conhecida atividade como agentes terapêuticos inibidores do complemento, embora isso ocorra através de diferentes mecanismos. A heparina, mais conhecida por seu uso tradicional com anticoagulante, é um polissacarídeo que inibe diferentes pontos de ativação do SC (BAZARGANI et al., 2005; SHARATH et al., 1995).

Já o CVF é uma proteína extraída do veneno de cobra (*Naja spp.*), que ativa fortemente o SC, atuando como um agente “depletador” do componente C3 no soro, através da formação de um complexo C3 convertase indissociável. Entretanto, existe uma busca persistente para encontrar substâncias com essas características, mas que possuam menos toxicidade, como no caso do CVF, e menos efeitos colaterais, como no caso da heparina, que não pode ser utilizada em condições inflamatórias por causa de sua potente atividade anticoagulante (MOLLNES; KIRSHFINK, 2006; WAGNER; FRANK, 2010).

Recentemente, a molécula floridosídeo, extraída da alga vermelha *Mastocarpus stellatus*, surgiu como um novo e potente ativador do SC (COURTOIS et al., 2008). Essa descoberta aliada ao enorme potencial que o ambiente marinho

possui como fonte de novas e inexploradas substâncias, juntamente com os crescentes indícios de que os micro-organismos associados às plantas são coprodutores de substâncias ativas já isoladas e grandes produtores de novos compostos, foram os principais impulsos para realizar esse trabalho (NEWMAN; CRAGG, 2010, 2012; ROSENBLUETH; MARTÍNEZ-ROMERO, 2006)

O floridosídeo é um heterosídeo encontrado em diversas espécies de algas vermelhas, sendo utilizado como reserva nutricional, osmorregulador e constituinte da parede celular. Estudos avaliando propriedades anticomplementares dessa substância mostraram que essa molécula ativa o SC, principalmente pela VC, através do recrutamento de anticorpos da classe IgM contra ela mesma (COURTOIS et al., 2008). Potentes ativadores do SC podem ser usados na terapia como agentes que depletem os componentes do complemento, como no caso do CVF, em condições em que há excesso de ativação do SC.

As algas são uma fonte extremamente rica de polissacarídeos, inclusive os sulfatados (galactanas, carragenanas, agaranas e fucanas). Além da propriedade nutricional, as algas são usadas na medicina alternativa há anos. Mas, como são um campo pouco explorado, poucas substâncias têm seus mecanismos de ação totalmente elucidados. Por esse motivo é que existem poucos agentes terapêuticos em uso, atualmente (JIAO et al., 2011).

As fucanas são polissacarídeos sulfatados extraídos das algas pardas que possuem a capacidade de bloquear o SC, o que é uma contradição quando pensamos no floridosídeo. Entretanto, esse fato nos mostra como o complemento possui vários pontos de interação em que pode ser regulado, ampliando as opções de potenciais agentes imunomoduladores (BLONDIN et al., 1994, 1996; POMIN, MOURÃO, 2008).

As fucanas são capazes de inibir a clivagem de C4, impedindo a formação do complexo C3 convertase (C4b2a) da VC. Elas também atuam impedindo a formação da C3 convertase da VA (C3bBb), suprimindo a continuação da via (FITTON, 2011; JIAO et al., 2011; POMIN; MOURÃO, 2008). Desse modo, são grandes candidatos a agentes moduladores do SC nas reações inflamatórias e autoimunes, onde há exacerbação de sua atividade.

Outro ponto que estimula a investigação da ação de produtos naturais marinhos sobre o sistema complemento é que polissacarídeos sulfatados produzidos por algas marinhas, bem como por invertebrados marinhos, são potentes agentes

anticoagulantes e antitrombóticos (POMIN; MOURÃO, 2008), e várias interconexões entre componentes individuais das cascatas do complemento, da coagulação e do sistema fibrinolítico têm sido descritas (AMARA et al., 2008; OIKONOMOPOULOU et al., 2012).

O sistema complemento e a cascata da coagulação têm várias características funcionais comuns que frequentemente se sobrepõem, incluindo o compartilhamento de moléculas regulatórias (inibidores ou co-fatores) que podem regular fisiologicamente ambos os sistemas (OIKONOMOPOULOU et al., 2012). Essas características comuns podem explicar a associação de ambos os sistemas com vários processos inflamatórios e trombóticos graves e justificam a pesquisa de atividades imunomoduladoras sobre o SC nesses produtos marinhos com atividades anticoagulantes previamente descritas.

Nesse sentido, podemos fazer algumas inferências sobre as frações e extratos avaliados nesse estudo. Por exemplo, a fração BT-Aq é uma fração aquosa, na qual provavelmente estão contidos os carboidratos e proteínas extraídos da alga *B. tenella*. Essa fração modulou apenas a VA nos ensaios hemolíticos, que é ativada justamente pela interação do C3b com grupos hidroxila, presentes nos carboidratos e proteínas de superfícies ativadoras, como patógenos. Isso é um indicativo de que esta fração pode conter polissacarídeos que atuam sobre o SC, que devem ser mais explorados e avaliados, também, em ensaios de coagulação.

A fração hexânica BT-H e suas subfrações, geradas por cromatografia à vácuo, foram analisadas por FELÍCIO (2010) quanto à sua composição química. A análise indicou que, de modo geral, estão presentes substâncias como: alcanos e alcenos, aldeídos, ácidos graxos, ésteres, diterpenos, esteróides, cetonas, lactonas e metabólitos contendo nitrogênio, o que é bastante interessante, pois se sabe que terpenos, esteróides e metabólitos halogenados, além de outras classes não encontradas nessas frações, já foram descritos por apresentar ação anticomplementar, tanto na VC, quanto na VA (KULKARNI; KELLAWAY; KOTWAL, 2005).

Os extratos de micro-organismos endofíticos que apresentaram modulação e ativação do SC foram identificados como fungos endofíticos da macroalga *Bostrychia tenella* (Tabela 2), sendo que dois deles (T72 e T73) são do gênero *Acremonium*. Fungos endofíticos *Acremonium sp.* foram descritos como produtores

de um novo composto (NBRI17671) que possui atividade antitumoral (KAWADA et al., 2010).

O extrato T65 foi identificado como *Nigrospora oryzae*, que possui atividades antimicrobianas e antifúngicas (WICKLOW; POLING, 2009), assim como o T68, que foi identificado como um fungo endofítico pertencente à Família *Xylariaceae*, com já conhecida atividade antibacteriana (CHAREPRASERT et al., 2012).

Em termos de atividades biológicas, nota-se que esses quatro micro-organismos presentes nos extratos possuem poucas já conhecidas, o que revela como os estudos nessa área são ainda escassos. Mas, sugere que eles sejam avaliados em outras diversas atividades, especialmente anticomplementares, já que foram capazes de modular o sistema complemento.

Entretanto, inúmeros trabalhos têm surgido, recentemente, descrevendo as mais diversas substâncias produzidas pelos micro-organismos endofíticos que possuem atividades antitumorais, anti-inflamatórias, antimicrobianas, antioxidantes, neuroprotetoras, entre outras (GUTIERREZ-GONZALEZ; RAMIREZ, 2012; KUSARI; ZÜHLKE; SPITELLER, 2009;).

Sendo assim, é evidente que os compostos produzidos pelos micro-organismos marinhos compõem um amplo espectro de estruturas com grande potencial para novos fármacos. Principalmente, com a solução para problemas na detecção e caracterização das substâncias bioativas, como melhorias nas técnicas de cultivo, análise genômica e novas ferramentas analíticas para elucidação estrutural (PENESYAN; KJELLEBERG; EGAN, 2010).

De maneira geral, os produtos naturais marinhos compõem uma área muito interessante a ser explorada por conter tanta biodiversidade de organismos e estruturas exóticas com enorme potencial biológico (BLUNT et al., 2009, 2010; PIMENTEL et al., 2011; STROBEL et al., 2004; VERMA; KHARWAR; STROBEL, 2009). Isso nos mostra que existe grande campo a ser percorrido, não só no sistema complemento, mas também nas diversas áreas médicas, que vai desde a identificação e isolamento das substâncias, até a elucidação de mecanismos de ação. Porém, é recompensador o resultado desse investimento de tempo e trabalho, ao permitir encontrar moléculas que apontem novos agentes terapêuticos ou, ainda, ferramentas que possam ajudar a esclarecer mecanismos patológicos.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

O principal objetivo desse estudo foi investigar a presença de substâncias com ação imunomoduladora sobre o sistema complemento humano nas frações e subfrações da macroalga *Bostrychia tenella* e nos extratos de micro-organismos endofíticos associados, com a finalidade de fornecer subsídios para utilização dessas substâncias em fins terapêuticos, ou como ferramentas que ajudem a elucidar os mecanismos patológicos de caráter inflamatório nos quais o SC está envolvido.

De modo geral, muitas das frações, subfrações e extratos avaliados apresentaram esse potencial imunomodulador, pois, das 20 amostras iniciais, metade delas apresentou modulação do SC, em maior ou menor grau. Deve-se considerar aqui, que as amostras avaliadas nesse estudo não são substâncias isoladas, mas misturas complexas que podem mascarar, inibir, minimizar ou potencializar atividades biológicas de determinadas substâncias, presentes em concentrações pequenas nas misturas.

Isso retoma o raciocínio de que existe, ainda, um longo caminho a ser trilhado, pois quanto maior o isolamento e purificação dos componentes dos extratos, maior a concentração de substâncias com possíveis potenciais biológicos, o que pode gerar resultados de atividades biológicas mais atraentes.

Feitas essas considerações, pode-se concluir que os resultados obtidos nesse estudo foram satisfatórios e permitiram que o nosso maior objetivo fosse alcançado, já que os ensaios de atividade hemolítica na VC/VL e VA foram eficientes na triagem das amostras, pois todas aquelas apontadas como imunomoduladoras, apresentaram ativação do SC através de diferentes metodologias, como IEFbi, WB e ELISA.

Os resultados do WB para análise dos fragmentos de C3 demonstraram que todas as amostras foram capazes de induzir a formação de bandas correspondentes a produtos de clivagem da proteína C3, indicando ativação do SC. Esses resultados obtidos no WB são coerentes com aqueles obtidos na IEFbi para C3, que é uma técnica consagrada para ensaios de avaliação do complemento, embora seja uma metodologia antiga, trabalhosa e qualitativa. Isso faz do WB uma ferramenta laboratorial eficiente na avaliação da geração de fragmentos de clivagem do SC.

De acordo, também, com os resultados obtidos pelo WB, foi possível identificar quais vias do SC foram utilizadas por cada amostra, através da análise da geração dos fragmentos de C4 e FB no SHN tratado, específicos para a VC/VL e VA, respectivamente.

Através dos resultados obtidos na análise dos fragmentos de C4 observou-se que, com exceção do extrato T65, todas as amostras levaram a formação de ao menos uma das duas bandas que correspondem aos seus produtos de clivagem no SHN tratado, em quantidade maior do que no SHN não tratado, o que indica ativação do SC por meio da VC/VL.

No caso do Fator B, os resultados mostraram que somente as amostras BT-H, BTH-AM e BT-Aq induziram a formação de bandas correspondentes ao fragmento Bb no SHN tratado, em quantidade maior que no SHN não tratado, o que indica ativação do SC por meio da VA somente por essas três amostras.

Com relação à ativação total do SC, os ensaios imunoenzimáticos para avaliar a formação do complexo SC5b-9 (MAC) no SHN tratado mostraram que todas as amostras, com exceção das subfrações BTH-D e BTH-A, produziram MAC em maior quantidade do que no SHN não tratado. Isso mostra que houve ativação completa do SC no SHN tratado induzida por essas amostras, já que todas elas também levaram à clivagem do componente central, que é o C3.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**, 6ª Ed. Tradução Claudia Reali. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 564 p.

ADACHI, Y.; OHNO, N.; OHSAWA, M.; OIKAWA, S.; YODOMAE, T. Macrophage activation in vitro by chemically cross-linked (1,3)- β -D glucans. **Chem. Pharm. Bull.**, Tokyo, v.38, p.988-992, 1990.

ALEGRETTI, A. P. et al. Diminished expression of complement regulatory proteins on peripheral blood cells from systemic lupus erythematosus patients. **Clin. Dev. Immunol.**, Cairo, v. 2012, Article ID 725684, 9 pages, 2012. doi:10.1155/2012/725684.

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W. **Introductory Mycology**. 4th edition. John Wiley & Sons INC, USA, 1996. 869 p.

ALMEIDA, J.O.; FIFE JR., E. H. Quantitatively standardized complement fixation methods for critical evaluation of antigens prepared from *Trypanosoma cruzi*. **Pan Am. Health Org. Scient. Public.**, Washington, v. 319, p. 92, 1976.

ALGAE MARIS BRASILIS, 2010a - <http://www.ib.usp.br/algaemaris/busca3.php?id=86>, acessado em 20 de março de 2011.

ALGAEBASE - <http://algaebase.org/> acessado em 22 de março de 2011.

AMARA, U. et al. Interaction between the coagulation and complement system. **Adv. Exp. Med. Biol.**, New York, v. 632, p. 71-9, 2008.

BACH, E.E.; KIMATI, H. Purification and Characterization of Toxins from Wheat Isolates of *Drechslera tririci-repentis*, *Bipolaris bicolor*, and *Bipolaris sorokiniana*. **J. Venom. Anim. Toxins**, Botucatu, v. 5, p. 184-199, 1999.

BAKER, D. D.; CHU, M.; OZA, U.; RAJGARHIA. The value of natural products to future pharmaceutical discovery. **Nat. Prod. Res.**, London, v. 24, p. 1225-1244, 2007

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**. Porto Alegre: Artmed, 2008. 536 p.

BAZARGANI, F. et al. Low molecular weight heparin improves peritoneal ultrafiltration and blocks complement and coagulation. **Perit. Dial. Int.**, New York, v. 25, p. 394-404, 2005.

BÉRDY, J. Bioactive microbial metabolites. **J. Antibiot. (Tokyo)**, London, v. 58, p. 1-26, 2005.

BHAKUNI, D. S.; RAWAT, D. S. **Bioactive marine natural products**. Nova Delhi: Anamaya, 2005, 382p.

BINGHAM, J. P.; MITSUNAGA, E.; BERGERON, Z. L.. Drug from slugs – past, present and future perspectives of ω -conotoxin research. **Chem. Biol. Interact.**, Amsterdam, v.183, p. 1-18, 2010.

BLONDIN, C.; FISCHER, E.; BOISSON-VIDAL, C.; KAZATCHKINE, M.D.; JOZEFONVICZ, J. Inhibition of complemente activation by natural sulphated polysaccharides (fucoidans) from brown seaweed. **Mol. Immunol.**, Oxford, v.31, p.247-253, 1994.

BLONDIN, C.; CHAUBET, F.; NARDELLA, A.; SINQUIN, C.; JOSEFONVICZ, J.; Relationship between chemical characteristics and anticomplementary activity of fucans. **Biomaterials**, Guilford, v.17, p.597-603, 1996.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; WAN-PING, H.; MUNRO, M. H. G.; NORTHCOTE, P. T.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Nat. Prod. Rep.**, London, v. 26, p. 170-244, 2009.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; MUNRO, M. H. G.; NORTHCOTE, P. T.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Nat. Prod. Rep.**, London, v. 27, p.165-237, 2010.

BUTLER, A.; CARTER-FRANKLIN, J. N. The role of vanadium bromoperoxidase in the biosynthesis of halogenated marine natural products. **Nat. Prod. Rep.**, London, v. 21, p.180-8, 2004.

BUTLER, M. S. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. **Nat. Prod. Rep.**, London, v. 25, p. 475-516, 2008.

CARDOZO, K. H. M.; GUARATINI, T.; BARROS, M. P.; FALCÃO, V. R.; TONON, A. P.; LOPES, N. P.; CAMPOS, S.; TORRES, M. A.; SOUZA, A. O.; COLEPICOLA, P.; PINTO, E. Metabolites from algae with economical impact. **Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.**, New York, v. 146C, p. 60-78, 2007.

CARROLL, M.C. The complement system in regulation of adaptive immunity. **Nat. Immunol.**, New York, v. 5, p. 981-986, 2004.

CARROLL, M. V.; SIM, R. B. Complement in health and disease. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, Amsterdam, v. 63, p. 965-75, 2011.

CARVALHO, L. R.; ROQUE, N. F. Fenóis halogenados e/ou sulfatados de macroalgas marinhas. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 23, p. 757-64, 2000.

CERIBELLI, A. et al. Complement cascade in systemic lupus erythematosus: analyses of the three activation pathways. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, New York, v. 1173, p. 427-34, 2009.

CHAREPRASERT, S. et al. *Xylariaceae* on the fringe. **Prog. Mol. Subcell. Biol.**, New York, v. 53, p. 229-41, 2012.

CHENG, W. et al. Dietary administration of sodium alginate enhances the immune ability of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. **Fish Shellfish Immunol.**, London, v. 18, p.1-12, 2005.

CHOWDARY, K. P.; RAO, Y. S. Mucoadhesive microspheres for controlled drug delivery. **Biol. Pharm. Bull.**, Tokyo, v. 27, p. 1717-24, 2004.

CHRISTINAT, A.; LEYVRAZ, S. Role of trabectedin in the treatment of soft tissue sarcoma. **Onco Targets Ther.**, Auckland, v. 2, p. 105-113, 2009.

CHURCH, F.C.; MEADE, J.B.; TREANOR, R.E.; WHINNA, H.C. Antitrombin activity of fucoidan: the interaction of fucoidan with heparin cofactor II, antitrombin III and trombin. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.264, p.3518-3623, 1989.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, Basingstoke, v.6, p.829-837, 2004.

CLARKE, M.H.G.; FREEMAN, T. Quantitative immunoelectrophoresis of human serum proteins. **Clin. Sci.**, Oxford, v.35, p.403-13, 1968

COLE, D.S.; MORGAN, B.P. Beyond lysis: how complement influences cell fate. **Clin. Sci.**, Oxford, v.104, p.455-466, 2003.

COURTOIS, A.; SIMON-COLIN, C.; BOISSET, C.; BERTHOU, C.; DESLANDES, E.; GUÉZENNEC, J.; BORDRON, A. Floridoside extracted from the red alga

Mastocarpus stellatus is a potent activator of the classical complement pathway. **Mar. Drugs**, Basel, v.6, p.407-417, 2008.

COSTA-LOTUFO, L. V.; WILKE, D. V.; JIMENEZ, P. C.; EPIFANIO, R. A. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: histórico & perspectivas. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 32, p. 703-716, 2009.

CROTT, L. S. P.; LUCISANO-VALIM, Y. M.; SILVA, C. L.; BARBOSA, J. E. Interactions of F1 fractions from different strains of *Paracoccidioides brasiliensis* with human complement and with human neutrophils. **Mycopathologia**, The Hague, v.140, p.19-27, 1997.

D'ORAZIO, N. et al. Marine Bioactives: Pharmacological Properties and Potential Applications against Inflammatory Diseases. **Mar. Drugs**, Basel, v. 10, p. 812-33, 2012.

DARIAS, J. et al. Furoplocamioids A-C, novel polyhalogenated furanoid monoterpenes from *Plocamium cartilagineum*. **J. Nat. Prod.**, Cincinnati, v.64, p.1383-7, 2001.

DEMAIN, A.L. Microbial secondary metabolism: a new theoretical frontier for academia, a new opportunity for industry. **Ciba Found Symp.**, Amsterdam, v. 171, p.3-16, 1992.

DEMAIN, A. L.; ZHANG, L. Natural products and drug discovery. In: ZHANG, L.; DEMAIN, A. L. **Natural products – drug discovery and therapeutic medicine**. Nova Jersey: Humana Press, 2005, Cap. 1, p. 3-29.

DEMAIN, A. L. Antibiotics: natural products essential to human health. **Med. Res. Rev.**, New York, v. 29, p. 821-842, 2009.

DEMBITSKY, V. M.; SREBNIK, M. Variability of hydrocarbon and fatty acid components in cultures of the filamentous cyanobacterium *Scytonema sp.* isolated from microbial community "black cover" of limestone walls in Jerusalem. **Biochemistry (Moscow)**, New York, v. 67, p. 1276-82, 2002.

DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, D. G.; NOSEDA, M. D.; TULIO, S.; PUJOL, C. A.; DAMONTE, E. B. Inhibitory effect of sulfated galactans from the marine alga *Bostrychia montagnei* on herpes simplex virus replication *in vitro*. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 8, p. 53-58, 2001.

DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, M. D.; CARDOSO, M. A.; TULIO, S.; CEREZO, A. S. The structure of a galactan sulfate from the red seaweed *Bostrychia montagnei*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 337, p. 1137-44, 2002.

DUNKELBERGER, J. R.; SONG, W. C. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. **Cell Res.**, Basingstoke, v. 20, p.34-50, 2010.

de FELÍCIO, R.; DEBONSI, H. M.; YOKOYA, N. S. 4-(Hidroximetil)-benzenossulfato de potássio: metabólito inédito isolado da alga marinha *Bostrychia tenella* (Rhodomelaceae, Ceramiales). **Quim. Nova**, São Paulo, v. 31, p. 837-839, 2008.

de FELÍCIO, R.; ALBUQUERQUE, S.; YOUNG, M. C. M.; YOKOYA, N. S.; DEBONSI, H. M. Trypanocidal, leishmanicidal and antifungal potential from marine red alga *Bostrychia tenella* J. Agardh (Rhodomelaceae, Ceramiales). **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Oxford, v. 52, p. 763-769, 2010.

FAULKNER, D. J. Marine natural products. **Nat. Prod. Rep.**, London, v.18, p. 1-49, 2001.

FITTON, J. H. Therapies from fucoidan; multifunctional marine polymers. **Mar. Drugs**, Basel, v. 9, p. 1731-60, 2011.

FELICIO, R. de. Produtos naturais marinhos: identificação de metabólitos fenólicos halogenados na macroalga *Bostrychia tenella* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) e potencial biológico de micro-organismos endofíticos associados. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 2010.

FRANCESCHINI, I. M.; BURLIGA, A. L.; REVIERS, B.; PRADO, J. F.; RÉZIG, S. H. **Algas – uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica**. 1ª. Ed. Porto Alegre: ARTMED. 2010, 332 p.

GANESAN, A. The impact of natural products upon modern drug discovery. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, London, v. 12, p. 306-317, 2008.

GLASER, K. B.; MAYER, A. M. S. A renaissance in marine pharmacology: from preclinical curiosity to clinical reality. **Biochem. Pharmacol.**, Oxford, v. 78, p. 440-448, 2009.

GUNATILAKA, A. A. L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **J. Nat. Prod.**, Cincinnati, v. 69, p. 509-526, 2006.

GUO, B.; WANG, Y.; SUN, X.; TANG, K. Bioactive natural products from endophytes: a review. **Appl. Biochem. Microbiol.**, New York, v. 44, p.136-142, 2008.

HAAS, P.-J.; STRIJP, J.V. Anaphylatoxins – Their role in bacterial infection and inflammation. **Immunol. Res.**, Basel, v.37, p.161-175, 2007

HARIKRISHNAN, R. et al. Effect of traditional Korean medicinal (TKM) triherbal extract on the innate immune system and disease resistance in *Paralichthys olivaceus* against *Uronema marinum*. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v. 170, p.1-7, 2010.

HARIKRISHNAN, R.; BALASUNDARAM, C.; HEO, M. S. Diet enriched with mushroom *Phellinus linteus* extract enhances the growth, innate immune response, and disease resistance of kelp grouper, *Epinephelus bruneus* against vibriosis. **Fish Shellfish Immunol.**, London, v.30, p. 128-34, 2011.

_____. *Styrax japonica* supplementation diet enhances the innate immune response in *Epinephelus bruneus* against bacterial and protozoan infections. **Exp. Parasitol.**, New York, v. 129, p.260-5, 2011.

HERTWECK, C. Hidden biosynthetic treasures brought to light. **Nat. Chem. Biol.**, New York, v. 5, p.450-452, 2009.

IMHOFF, J. F.; LABES, A.; WIESE, J. Bio-mining the microbial treasures of the ocean: new natural products. **Biotechnol. Adv.**, Oxford, v. 29, p.468-82, 2011.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. Immunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença, 5ª Ed. Tradução Denise Cantarelli Machado. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. 767 p.

JENSEN, P. R.; MINCER, T. J.; WILLIAMS, P. G.; FENICAL, W. Marine actinomycete diversity and natural product discovery. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 87, p. 43-48, 2005.

JEPSON, M. A.; CLARK, M. A.; HIRST, B. H. M cell targeting by lectins: a strategy for mucosal vaccination and drug delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, Amsterdam, v. 56, p. 511-25, 2004.

JIAO, G. et al. Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. **Mar. Drugs**, Basel, v. 9, p. 196-223, 2011.

KARSTEN, U.; GORS, S.; EGGERT, A.; WEST, J. A. Trehalose, digeneaside, and floridoside in the Florideophyceae (Rhodophyta) – a reevaluation of its chemotaxonomic value. **Phycologia**, Berkeley, v. 46, p.143-50, 2007.

KAWADA, M. et al. NBRI17671, a new antitumor compound, produced by *Acremonium* sp. CR17671. **J. Antibiot. (Tokyo)**, London, v.63, p.237-43, 2010.

KIRSCHFINK, M.; MOLLNES, T. E. C1-inhibitor: an anti-inflammatory reagent with therapeutic potential. **Expert Opin. Pharmacother.**, London, v. 2, p.1073-83, 2001.

KOZLOV, L. V. et al. Masked deficiency of C4 component of complement in patients with chronic gastrointestinal tract diseases of different etiology. **Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.**, Moskva, p. 61-5, 2011.

KULKARNI, A. P.; KELLAWAY, L. A.; KOTWAL, G. J. Herbal complement inhibitors in the treatment of neuroinflammation: future strategy for neuroprotection. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, New York, v.1056, p.413-29, 2005.

KUSARI, S.; ZUHLKE, S.; SPITELLER, M. An endophytic fungus from *Camptotheca acuminata* that produces camptothecin and analogues. **J. Nat. Prod.**, Cincinnati, v.72, p.2-7, 2009.

LAM, K. S. New aspects of natural products in drug discovery. **Trends Microbiol.**, Cambridge, v. 15, p. 279-289, 2007.

LI, J. W. -H.; VEDERAS, J. C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? **Science**, New York, v. 325, p. 161-165, 2009.

LOIRAT, C.; FREMEAUX-BACCHI, V. Atypical hemolytic uremic syndrome. **Orphanet J. Rare Dis.**, London, v. 6, p. 60, 2011.

MASTELLOS, D.; ANDRONIS, C.; PERSIDIS, A.; LAMBRIS, J.D. Novel biological networks modulated by complement. **Clin. Immunol.**, Orlando, v.115, p.225-235, 2005.

MAYER, A. M. et al. Marine pharmacology in 2003-4: marine compounds with anthelmintic antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. **Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.**, New York, v. 145, p. 553-81, 2007.

MAYER, A. M. S.; GLASER, K. B.; CUEVAS, C.; JACOBS, R. S.; KEM, W.; LITTLE, R. D. ; McINTOSH, J. M.; NEWMAN, D. J.; POTTS, B. C.; SHUSTER, D. E. The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. **Trends Pharmacol. Sci.**, Amsterdam, v. 31, p. 255-265, 2010.

MAYER, A. M. S.; GUSTAFSON, K. R. Marine pharmacology in 2003-2004: antitumour and cytotoxic compounds. **Eur. J. Cancer**, Oxford, v. 42, p. 2241-2270, 2006.

MAYER, A. M. S.; GUSTAFSON, K. R. Marine pharmacology in 2005-2006: antitumour and cytotoxic compounds. **Eur. J. Cancer**, Oxford, v. 44, p. 2357-2387, 2008.

MAYER, A. M.; HAMANN, M. T. Marine pharmacology in 2001--2002: marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. **Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.**, New York, v.140, p.265-86, 2005.

MAYER, A. M.; LEHMANN, V. K. Marine pharmacology in 1999: antitumor and cytotoxic compounds. **Anticancer Res.**, Athens, v. 21, p. 2489-500, 2001.

MAYER, A. M. S.; RODRÍGUEZ, A. D.; BERLINCK, R. G. S.; HAMANN, M. T. Marine pharmacology in 2005-6: marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antifungal, antiinflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities, affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1790, p. 283-308, 2009.

MAYILYAN, K. R. Complement genetics, deficiencies, and disease associations. **Protein Cell**, Heidelberg, v. 3, p. 487-96, 2012.

McCLINTOCK, J. B.; BAKER, B. J. **Marine Chemical Ecology**. Boca Raton: CRC Press, 2001, 610 p.

McCLURE, M. O.; MOORE, J. P.; BLANC, D. F.; SCOTTING, P.; COOK, G. M. W.; KEYNES, R. J.; WEBER, J. N.; DAVIES, D.; WEISS, R. A. Investigation into the mechanism by which sulfated polysaccharides inhibit HIV-infection in vitro. **AIDS Res. Human. Retrovir.**, New York, v.8, p.19-26, 1992.

McGIVERN, J. G. Ziconotide: a review of its pharmacology and use in the treatment of pain. **Neuropsychiatr. Dis. Treat.**, Albany, v. 3, p. 69-85, 2007.

MOLINSKI, T. F.; DALISAY, D. S.; LIEVENS, S. L.; SALUDES, J. P. Drug development from marine natural products. **Nat. Rev. Drug Discov.**, London, v. 8, p. 69-85, 2009.

MOLLNES, T. E.; KIRSCHFINK, M. Strategies of therapeutic complement inhibition. **Mol. Immunol.**, Oxford, v.43, p.107-21, 2006.

MORGAN, B. P.; HARRIS, C. L. Complement therapeutics; history and current progress. **Mol. Immunol.**, Oxford, v.40, p.159-70, 2003.

NAGUMO, T.; NISHINO, T. Fucan sulfates and their anticoagulant activities. In: Dumitriu, S. (Ed.), Polysaccharides in Medicinal Applications. **Marcel Dekker, Inc.** New York, 1996.

NARDELLA, A.; CHAUBET, F.; BOISSON, -V. C.; BLONDIN, C.; DURAND, P.; JOSEFONVICZ, J. Anticoagulant low molecular weight fucans produced by radical process and ion exchange chromatography of high molecular weight fucans extracted from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 289, p. 201-208, 1996.

NAZAROVA, I.; SHEVCHENKO, N.; KOVALEV, B.; KHOTIMCHENKO, Y. Immunomodulatory properties of polysaccharides from red algae: influence on the complement system. **Russ. J. Mar. Biol.**, New York, v. 24, p. 49-52, 1998.

NEWMAN, D. J. Natural products as leads to potential drugs: an old process or the new hope for drug discovery? **J. Med. Chem.**, Easton, v. 59, p. 2589-2599, 2008.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as drugs and leads to drugs: the historical perspective. In: BUSS, A. D.; BUTLER, M. S. **Natural product chemistry for drug discovery**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2010. cap. 1, p. 3-27.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **J. Nat. Prod.**, Cincinnati, v. 75, p. 311-35, 2012.

OIKONOMOPOULOU, K. et al. Interactions between coagulation and complement--their role in inflammation. **Semin. Immunopathol.**, Berlin, v. 34, p. 151-65, 2012.

OLIVEIRA, A. L. L.; SILVA, D. B.; TURATTI, I. C. C.; YOKOYA, N. S.; DEBONSI, H. M. Volatile constituents of Brazilian *Bostrychia* species (Rhodomelaceae) from mangrove and rocky shore. **Biochem. Syst. Ecol.**, Oxford, v. 37, p. 761-765, 2009.

ORNSTEIN, B. W.; ATKINSON, J. P.; DENSEN, P. The complement system in pediatric systemic lupus erythematosus, atypical hemolytic uremic syndrome, and complocentric membranoglomerulopathies. **Curr. Opin. Rheumatol.**, Philadelphia, v. 24, p.522-529, 2012.

PALARASAH, Y. et al. Novel assays to assess the functional capacity of the classical, the alternative and the lectin pathways of the complement system. **Clin. Exp. Immunol.**, Oxford, v. 164, p. 388-95, 2011.

PENESYAN, A.; KJELLEBERG, S.; EGAN, S. Development of novel drugs from marine surface associated microorganisms. **Mar. Drugs**, Basel, v. 8, p. 438-59, 2010.

PEREIRA, R. C.; SOARES-GOMES, A. **Biologia marinha**. Rio de Janeiro: Interciência, 2002, 382 p.

PIDDE-QUEIROZ, G. et al. Human complement activation and anaphylatoxins generation induced by snake venom toxins from *Bothrops* genus. **Mol. Immunol.**, Oxford, v.47, p. 2537-44, 2010.

PIMENTEL, M. R.; MOLINA, G.; DIONÍSIO, A.P.; MARÓSTICA JR., M. R.; PASTORE, G. M. The use of endophytes to obtain bioactive compounds and their application in biotransformation process. **Biotechnol. Res. Int.**, London, v. 2011, Article ID 576286, 11 pages, 2011. doi:10.4061/2011/576286.

POMIN, V. H.; MOURAO, P. A. Structure, biology, evolution, and medical importance of sulfated fucans and galactans. **Glycobiology**, Oxford, v.18, p.1016-27, 2008.

REVIERS, B. de. **Biologia e Filogenia das Algas**. 1ª. Ed. Porto Alegre: ARTMED. 2006, 260 p.

RODRIGUES, K.F.; HESSE, M.; WERNER, C. Antimicrobial activities of secondary metabolites produced by endophytic fungi from *Spondias mombin*. **J. Basic Microbiol.**, Berlin, v. 40, p.261-267, 2000.

ROSENBLUETH, M.; MARTINEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Mol. Plant Microbe Interact.**, St. Paul, v. 19, p. 827-37, 2006.

RUDIGER, H.; GABIUS, H. J. Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. **Glycoconj. J.**, Lund, v. 18, p. 589-613, 2001.

SALOMON, C. E.; MAGARVEY, N. A.; SHERMAN, D. H. Merging the potential of microbial genetics with biological and chemical diversity: an even brighter future for

marine natural product drug discovery. **Nat. Prod. Rep.**, London, v. 21, p. 105-21, 2004.

SERRUTO, D. et al. Molecular mechanisms of complement evasion: learning from staphylococci and meningococci. **Nat. Rev. Microbiol.**, London, v.8, p.393-9, 2010.

SHARATH, M. D. et al. Small heparin fragments regulate the amplification pathway of complement. **Immunopharmacology**, New York, v. 9, p.73-80,1985.

SIMMONS, T. L.; COATES, R. C.; CLARK, B. R.; ENGINE, N.; GONZALEZ, D.; ESQUENAZI, E.; DORRESTEIN, P. C.; GERWICK, W. H. Biosynthetic origin of natural products isolated from marine microorganism – invertebrate assemblages. **Proc. Natl. Acad.Sci. USA**, Washington, v.105, p. 4587-4594, 2008.

SOUZA, A.Q.L.; SOUZA, A.D.L.; FILHO, S.A.; PINHEIRO, M.L.B.; SARQUIS, M.I.M.; PEREIRA, J.O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. **Acta Amaz.**, Manaus, v. 34, p. 185-195, 2004.

SCHAEFFER, D. J.; KRYLOV, V. S. Anti-HIV activity of extracts and compounds from algae and cyanobacteria. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, New York, v.45, p.208-27, 2000.

STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **J. Nat. Prod.**, Cincinnati, v. 67, p. 257-268, 2004.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Nat. Prod. Rep.**, London, v. 18, p. 448-459, 2001.

THAKUR, N. L.; JAIN, R.; NATALIO, F.; HAMER, B.; THAKUR, A. N.; MÜLLER, W. E. G. Marine molecular biology: an emerging field of biological sciences. **Biotechnol. Adv.**, Oxford, v. 26, p. 233-245, 2008.

THURMAN, J. M.; RENNER, B. Dynamic control of the complement system by modulated expression of regulatory proteins. **Lab. Invest.**, Baltimore, v. 91, p. 4-11, 2011.

TRILLI, V.; MICHILINI, V.; MONTOVANI, V.; PIRT, S.J. Development of the agar disk method for the rapid selection of cephalosporim producers with improved yields. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v.13, p.7-13, 1978.

TURNER, M.W. Mannose-binding lectin: the pluripotent molecular of the innate immune system. **Immunol. Today**, Amsterdam, v.17, p. 532-540, 1996.

VAIRAPPAN, C. S.; SUZUKI, M.; ISHII, T.; OKINO, T.; ABE, T.; MASUDA, M. Antibacterial activity of halogenated sesquiterpenes from Malaysian *Laurencia* spp. **Phytochemistry**, London, v. 69, p. 2490-2494. 2008.

VERMA, V. C.; KHARWAR, R. N.; STROBEL, G. A. Chemical and functional diversity of natural products from plant associated endophytic fungi. **Nat. Prod. Commun.**, Westerville, v. 4, p. 1511-32, 2009.

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. C. E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à 0163-3864. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 27, p.139-145, 2004.

WAGNER, E.; FRANK, M. M. Therapeutic potential of complement modulation. **Nat. Rev. Drug Discov.**, London, v. 9, p.43-56, 2010.

WALPORT, M. J. Complement: First of two parts. **New Eng. J. Med.**, Boston, v. 344, p.1058-1066, 2001.

WALSH, C T.; FISCHBACH, M. A. Natural products version 2.0: connecting genes to molecules. **J. Am. Chem. Soc.**, Washington, v. 132, p. 249-2493, 2010.

WANG, J.; LI, G.; LU, H.; ZHENG, Z.; HUANG, Y.; SU, W. Taxol from *Tubercularia* sp. strain TF5, an endophytic fungus of *Taxus mairei*. **FEMS Microbiol. Lett.**, Oxford, v.193, p.249-253, 2000.

WEBSTER, N. S. et al. Phylogenetic diversity of bacteria associated with the marine sponge *Rhopaloeides odorabile*. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 67, p. 434-44, 2001.

WEST, J. A.; ZUCARELLO, G. C.; HOMMERSAND, M.; KARSTEN, U.; GÖRS, S. Observations on *Bostrychia radicata* comb. nov. (Rhodomelaceae, Rhodophyta). **Phycological Res.**, Tokyo, v. 54, p. 1-14, 2006.

WICKLOW, D. T.; POLING, S. M. Antimicrobial activity of pyrrocidines from *Acremonium zeae* against endophytes and pathogens of maize. **Phytopathology**, St. Paul, v. 99, p. 109-15, 2009.

WRIGHT, A. D.; GOCLIK, E.; KONIG, G. M. Three new sesquiterpenes from the red alga *Laurencia perforata*. **J. Nat. Prod.**, Cincinnati, v. 66, p. 435-7, 2003.

ZHUANG, C.; ITOH, H.; MIZUNO, T.; ITO, H. Antitumor active fucoidan from the brown seaweed, *Umitoranoo* (*Sargassum thunbergii*). **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, Tokyo, v.59, p.563-567, 1995.

ZUCARELLO, G. C.; WEST, J. A. Multiple cryptic species: molecular diversity and reproductive isolation in the *Bostrychia radicans*/*Bostrychia moritziana* complex (Rhodomelaceae, Rhodophyta) with focus on north american isolates. **J. Phycol.**, New York, v. 39, p. 948-959, 2003.

ZVYAGINTSEVA, T. N.; SHEVCHENKO, N. M.; POPIVNICH, I. B.; ISAKOV, V. V.; SCOBUN, A. S.; SUNDUKOVA, E. V.; ELYAKOVA, L. A. A new procedure for the separation of water-soluble polysaccharides from brown seaweeds. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v.322, p.32-39, 1999.

APÊNDICES

APÊNDICES

APÊNDICE A – Soluções e tampões

1. Solução de Alsever

Citrato Trissódico.2H ₂ O	8,0g
Cloreto de Sódio	4,2g
Glicose (anidro)	20,5g
Água Destilada	q.s.p. 1000mL

Ajustar pH 6,1 com solução de ácido cítrico H₂O a 10%

Esterelizar em autoclave a 109°C por 15 minutos

2. Tampão TEA-Ca²⁺-Mg²⁺

Trietanolamina	28,0mL
NaCl	75g
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	0,22g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	1,23g
Azida Sódica	0,50g
Água destilada	q.s.p. 1000mL (10x conc.)
HCl.....	q.s.p. pH 7,4 (final)

3. Tampão TEA-EDTA

Trietanolamina	28,0mL
NaCl	75g
EDTA.2H ₂ O.....	37,2g
Azida Sódica	0,50g
Água destilada	q.s.p. 1000mL (10x conc.)
HCl.....	q.s.p. pH 7,4 (final)

4. Tampão TEA-Mg²⁺

Trietanolamina	28,0mL
NaCl	75,0g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	4,93g
Azida Sódica	0,50g
Água destilada	q.s.p. 1000mL (10x conc.)
HCl.....	q.s.p. pH 7,4 (final)

5. Tampão TEA-EGTA-Mg²⁺

Trietanolamina	28,0mL
NaCl	75g
EGTA	30,42g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	4,93g
Azida Sódica	0,50g
Água destilada	q.s.p. 1000mL (10x conc.)
HCl.....	q.s.p. pH 7,4 (final)

Para o prepare das soluções de trabalho, os tampões acima descritos foram diluídos 10 vezes com água destilada e acrescidos de 0,1% de gelatina.

6. Preparo do Zymosan

Zymosan.....	20mg
Salina.....	10mL

Ferver em banho-maria durante 30 min

Desprezar o sobrenadante e ressuspender o sedimento em 10mL de tampão TEA-Ca²⁺-Mg²⁺

Estocar a solução em geladeira

7. Tampão Tris-Glicina-EDTA – Tampão-estoque (1:2)

Tris	47,2g
Glicina	54,2g
EDTA.....	14,2g
Azida Sódica.....	0,8g
Água destilada	q.s.p. 1000mL

Acertar para pH 8,8

8. Ponceau S (0,1% p/v)

20g.....1000mL ácido acético 5%

9. Solução descolorante

Ácido acético 10% (v/v) em água destilada

10. Tampão de Corrida

Tris base.....	3,0g
Glicina.....	14,48g
SDS	1,0g
Água.....	q.s.p. 1000mL

Acertar para pH a 8,4

11. Tampão de Transferência

Tris base.....	3,03g
Glicina.....	14,4g
metanol	200ml
Água.....	q.s.p. 1000mL
Acertar para pH a 8,3	

12. Tampão de Lavagem (TBS-T 0,1%)

Tris base.....	2,42g
NaCl.....	8g
Tween 20	1ml/L
Acertar para pH a 7,6	

13. Tampão de Amostra

Tris base.....	0,076g
SDS	0,4g
Glicerina(glicerol)	5ml
B-Mercaptoetanol.....	200µl
Azul de bromofenol.....	0,05g
Água.....	q.s.p. 1000mL

14. PBS (10X)

NaCl.....	80g
KCL.....	2g
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O,	21,7g
KH ₂ PO ₄	2 g
Água destilada	q.s.p. 1000mL

15. Tampão de Bloqueio (BSA 5% em TBS-T – g/mL)

50g BSA.....1000mL de TBS-T

/

APÊNDICE B – Padronização do solvente DMSO 1% PBS

Padronização do solvente DMSO 1%

As frações e subfrações da macroalga *Bostrychia tenella* e os extratos dos micro-organismos endofíticos associados foram solubilizados no solvente orgânico DMSO (dimetil-sulfóxido) 1% em PBS. Esse solvente possui atividade anti-inflamatória em determinadas concentrações, portanto, mesmo sendo utilizado diluído em tampão PBS, fez-se necessário avaliar se ele causaria algum efeito no SC presente no SHN.

Sendo assim, os maiores volumes utilizados de DMSO 1% para solubilização das amostras foram testados em ensaios de atividade hemolítica (VC/VL e VA) para verificar se não haveria nenhum tipo de interferência nos valores de $t_{1/2}$ do SHN, o que poderia levar a falsos resultados nos ensaios das amostras.

O SHN foi tratado (1 hora, 37°C) com os mesmos volumes utilizados de DMSO 1% para preparar as maiores concentrações das faixas escolhidas para realizar os ensaios de atividade hemolítica das amostras. Como as diferentes concentrações foram preparadas por diluição seriada, as primeiras, ou mais concentradas, são as que possuíam maior volume de DMSO 1%. No restante, o solvente já se encontrava bastante diluído no tampão próprio para cada via do complemento, sendo necessário testá-los somente se houvesse algum tipo de modulação nas concentrações maiores.

Os gráficos seguintes mostram os resultados dos valores de $t_{1/2}$ do SHN tratado com 4 volumes diferentes de DMSO 1% (280µl, 140µl, 70µl e 28µl) comparados com o valor médio de $t_{1/2}$ no SHN não tratado, nos ensaios de atividade hemolítica para VC/VL e VA. Feita a análise estatística dos dados no programa GraphPad Prisma - versão 5.0, observou-se que não houve diferença significativa ($p < 0,005$) entre os valores de $t_{1/2}$ do SHN não tratado e tratado com os diferentes volumes do DMSO 1% em ambas as vias. Desse modo, concluiu-se que o DMSO 1% nesses volumes não provocou nenhum tipo de modulação no SC do SHN tratado.

Ensaio hemolítico para análise do solvente DMSO 1% na VC/VL

Figura 64 – Valores médios de t_{1/2} em segundos no SHN não tratado e tratado com diferentes volumes do solvente DMSO 1% PBS na VC/VL. Cada coluna representa a média de três leituras de um ensaio representativo. SHN: soro humano normal não tratado. * p<0,005 em comparação ao SHN.

Ensaio hemolítico para análise do solvente DMSO 1% na VA

Figura 65 – Valores médios de t_{1/2} em segundos no SHN não tratado e tratado com diferentes volumes do solvente DMSO 1% PBS na VA. Cada coluna representa a média de três leituras de um ensaio representativo. SHN: soro humano normal não tratado. * p<0,005 em comparação ao SHN.

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO A – Certificado CEP/FCFRP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Of. CEP/FCFRP nº. 26/2010
kms

Ribeirão Preto, 7 de julho de 2010.

Ilma. Sra.

PROF.^a DR.^a LUCIANA SIMON PEREIRA CROTT

Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas
FCFRP – USP

Assunto: **Aprovação de protocolo de pesquisa.**

Prezada Professora,

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP aprovou, em sua 79ª Sessão Ordinária, realizada em 01/07/2010, o projeto de pesquisa intitulado “AValiação do potencial imunomodulador sobre o sistema complemento humano de extratos de algas marinhas o gênero BOSTRYCHIA e de fungos endofíticos associados”, apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo CEP/FCFRP nº. 175.

Em atendimento à Resolução 196/96, deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa e a publicação de seu resultado, para acompanhamento, bem como comunicada qualquer intorrência ou interrupção do mesmo.

Atenciosamente,

Prof.ª Dr.ª MARIA REGINA TORQUETI
Coordenadora do CEP – FCFRP/USP

ANEXO B – Certificado CEUA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 10.1.213.53.7), intitulado "Avaliação do Potencial Imunomodulador sobre o Sistema Complemento Humano de Extratos de Algas Marinhas do Gênero *Bostrychia* e de Fungos Endofílicos Associados", de autoria de **Juliana Campos Pereira** e de **Luciana Simon Pereira Crott** por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 07/04/2010.

This is to certify that the work (Protocol number 10.1.213.53.7), entitled: "Evaluation of the Immunomodulatory Potential of Seaweed Extracts from the Genus *Bostrycia* and of Extracts of Endophytic Fungi Isolated from the on the Human Complement System", by **Juliana Campos Pereira** and **Luciana Simon Pereira Crott**, is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the Campus of Ribeirão Preto – USP, and was approved in the meeting, April 07, 2010.

Ribeirão Preto, 9 de abril de 2010.

Presidente da CEUA
Profa.Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro

ANEXO C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Você está sendo convidado(a) a participar como voluntário(a) (doador de sangue) em uma pesquisa intitulada “Avaliação do potencial imunomodulador sobre o sistema complemento humano de frações da alga marinha *Bostrychia tenella* e de extratos de micro-organismos endofíticos associados” coordenado pela Profa. Dra. Luciana Simon Pereira Crott e tendo como responsável pelos esclarecimentos sobre a pesquisa a farmacêutica Juliana Campos Pereira, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP. Após os devidos esclarecimentos quanto a sua participação e, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra do pesquisador responsável.

O objetivo deste trabalho é investigar a influência de extratos e frações de algas marinhas e fungos endofíticos associados em **substâncias** que participam do sistema de defesa do organismo contra infecções (**sistema complemento**), e desta forma, descobrir se os extratos e frações em estudo prejudicam ou melhoram a sua eficiência. Para doar o sangue, você não poderá estar utilizando medicamentos há pelo menos duas semanas. O seguinte procedimento será realizado: serão colhidos 10 mL de sangue, uma única vez, após jejum de 8 horas. A colheita será realizada no período da manhã, por um profissional da área de saúde. Isto poderá trazer algum desconforto por causa da picada da agulha, sendo que é muito pequeno o risco de ocorrência de trauma. Os materiais utilizados serão descartáveis, não havendo risco de contaminação. Esperamos que este estudo resulte em contribuição importante para entender como esses extratos e frações de produtos naturais marinhos podem interferir em nosso sistema de defesa.

Se você estiver de acordo em participar, posso garantir-lhe que as informações fornecidas serão confidenciais e que o material coletado só será utilizado neste trabalho. Os resultados da pesquisa lhe serão fornecidos, se for de seu interesse. Não haverá despesas para você, pela sua participação. Se você tiver alguma dúvida em relação ao estudo ou não quiser mais fazer parte do mesmo, poderá entrar em contato com a Profa. Dra. Luciana Simon Pereira Crott ou com a farmacêutica Juliana Campos Pereira, pelo telefone (16) 36024241, ou no endereço Avenida do Café, s/n, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, sem que isso represente qualquer prejuízo a você.

Eu, _____, acredito ter sido suficientemente esclarecido(a) sobre a pesquisa “Avaliação do potencial imunomodulador sobre o sistema complemento humano de extratos de algas marinhas do gênero *Bostrychia* e de fungos endofíticos associados” e concordo voluntariamente em participar da mesma, podendo retirar meu consentimento a qualquer momento, sem penalidade, prejuízo ou perda de qualquer benefício que possa ter adquirido.

Ribeirão Preto _____/_____/_____

Assinatura: _____

RG: _____

Profa. Dra. Luciana Simon Pereira Crott

(Orientadora)

CPF 050087178-71

Juliana Campos Pereira

(Mestranda)

CPF 079471176-67