



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Avaliação *in vitro* do efeito do extrato bruto da alga marinha *Gigartina skottsbergii* e do extrato bruto e frações do fungo *Acremonium* sp. sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos mediado por receptores para IgG e complemento**

**Nathália Cristina Canicoba**

**Ribeirão Preto  
2022**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação *in vitro* do efeito do extrato bruto da alga marinha *Gigartina skottsbergii* e do extrato bruto e frações do fungo *Acremonium* sp. sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos mediado por receptores para IgG e complemento

Nathália Cristina Canicoba

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia em 13/09/2022. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2022

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação *in vitro* do efeito do extrato bruto da alga marinha *Gigartina skottsbergii* e do extrato bruto e frações do fungo *Acremonium* sp. sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos mediado por receptores para IgG e complemento

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Imunologia e Fisiopatologia

**Orientada:** Nathália Cristina Canicoba

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cleni Mara Marzocchi Machado

Ribeirão Preto

2022

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.

Canicoba, Nathália Cristina

Avaliação *in vitro* do efeito do extrato bruto da alga marinha *Gigartina skottsbergii* e do extrato bruto e frações do fungo *Acremonium* sp. sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos mediado por receptores para IgG e complemento. Ribeirão Preto, 2022.

120 p: il; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Imunologia e Fisiopatologia.

Orientadora: Marzocchi-Machado, Cleni Mara

1. Neutrófilos. 2. Espécies reativas de oxigênio. 3. Receptores para IgG. 4. Receptores para complemento. 5. Produtos Naturais. 6. Algas marinhas. 7. Fungos endofíticos.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nathália Cristina Canicoba

Avaliação *in vitro* do efeito do extrato bruto da alga marinha *Gigartina skottsbergii* e do extrato bruto e frações do fungo *Acremonium* sp. sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos mediado por receptores para IgG e complemento.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Imunologia e Fisiopatologia

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cleni Mara Marzocchi Machado

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_\_.

Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

**Dedicatória**

**Dedico este trabalho à minha família. A minha mãe, ao meu pai e ao meu irmão, pelo apoio, amor e carinho que sempre recebi ao longo de minha vida.**



# **Agradecimentos**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## RESUMO

CANICOBA, N. C. **Avaliação *in vitro* do efeito do extrato bruto da alga marinha *Gigartina skottsbergii* e do extrato bruto e frações do fungo *Acremonium sp.* sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos mediado por receptores para IgG e complemento** 2022. 120f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Os neutrófilos são células importantes para a resposta imune, mas também estão envolvidos na fisiopatologia de doenças inflamatórias devido ao estabelecimento do estresse oxidativo. Portanto, a busca por novas moléculas/substâncias que possam controlar as respostas pró- e anti-inflamatórias dos neutrófilos tem sido alvo de estudos. Nesse contexto, o potencial biológico de extratos, frações e compostos isolados de espécies de algas e fungos endofíticos está sendo estudado, pois esses produtos naturais representam uma fonte de novos metabólitos, principalmente antioxidantes. Em particular, as algas e fungos marinhos são uma fonte potencial para a pesquisa de substâncias com atividade biológica/terapêutica devido à sua capacidade de reaproveitamento de nutrientes. Considerando o estresse oxidativo como alvo terapêutico, este estudo avaliou os efeitos *in vitro* do extrato bruto da alga marinha *Gigartina skottsbergii* e o extrato bruto e frações do fungo endofítico *Acremonium sp.* sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos humanos mediado por receptores para IgG e para complemento. Extratos da *Gigartina skottsbergii* e do *Acremonium sp.*, bem como as frações deste fungo foram obtidos por adição de solvente acetato de etila, filtrados e concentrados sob pressão reduzida; neutrófilos foram isolados do sangue total de indivíduos humanos saudáveis usando a solução de gelatina (2,5%); o ensaio de quimioluminescência foi usado para avaliar a produção de ERO por neutrófilos tratados com as amostras da alga e do fungo (extratos bruto e frações) e estimulados com imunocomplexos opsonizados com soro humano normal (IC/SHN) ou forbol miristato acetato (PMA); as células endoteliais extraídas da veia do cordão umbilical (HUVEC) foram expostas aos neutrófilos tratados com as amostras da alga e do fungo, os quais foram estimulados com IC/SHN ou PMA, para avaliar os marcadores de estresse oxidativo: a peroxidação lipídica foi avaliada pelo método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e o consumo de antioxidante pela dosagem da glutatona total; a citotoxicidade das amostras da alga e do fungo sobre os neutrófilos foi avaliada pelos métodos de exclusão do corante azul de Trypan, da redução do sal de brometo de tetrazólio e dosagem da lactato desidrogenase. Os resultados mostraram que i) os extratos brutos da alga *Gigartina skottsbergii* e do fungo endofítico *Acremonium sp.* e suas frações foram capazes de reduzir a produção de ERO pelos neutrófilos; ii) a substância isolada ergosterol não foi capaz de diminuir a produção de ERO; iii) as amostras estudadas não foram citotóxicas para os neutrófilos; iv) o extrato bruto da alga *Gigartina skottsbergii* foi capaz de diminuir a peroxidação lipídica apenas para o estímulo PMA, enquanto o extrato bruto do fungo *Acremonium sp.* e suas frações foram capazes de diminuir a peroxidação lipídica para PMA e IC/SHN; v) o ergosterol aumentou a peroxidação lipídica das HUVEC; vi) não houve diferença no consumo da glutatona quando os neutrófilos foram tratados com o extrato e frações derivados do fungo. Os dados apresentados mostram um efeito do extrato bruto da alga marinha *Gigartina skottsbergii* e do extrato bruto do fungo endofítico *Acremonium sp.* e suas frações de redução do metabolismo oxidativo dos neutrófilos e da peroxidação lipídica que as ERO promovem em células endoteliais. Estes resultados apontam um potencial uso terapêutico de substâncias provenientes da alga marinha *Gigartina skottsbergii* e do fungo endofítico *Acremonium sp.* para os minimizar os efeitos deletérios da ativação dos neutrófilos em processos inflamatórios crônicos.

Palavras-chave: Neutrófilos; Espécies reativas de oxigênio; Receptores para IgG; Receptores para complemento; Produtos naturais; Algas marinhas; Fungos endofíticos.

## ABSTRACT

CANICOBA, N. C. ***In vitro* evaluation of the effect of the crude extract of the seaweed *Gigartina skottsbergii* and the crude extract and fractions of the fungus *Acremonium* sp. on the oxidative metabolism of human neutrophils mediated by receptors for IgG and complement** 2022. 120f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Neutrophils are important cells for the immune response, but they are also involved in the pathophysiology of inflammatory diseases due to the establishment of oxidative stress. Therefore, the search for new molecules/substances that can control the pro- and anti-inflammatory responses of neutrophils has been the subject of studies. In this context, the biological potential of extracts, fractions and compounds isolated from algae species and endophytic fungi is being studied, as these natural products represent a source of new metabolites, mainly antioxidants. Marine algae and fungi are a potential source for researching substances with biological/therapeutic activity due to their ability to reuse nutrients. Considering oxidative stress as a therapeutic target, this study evaluated the *in vitro* effects of the crude extract of the seaweed *Gigartina skottsbergii* and the crude extract and fractions of the endophytic fungus *Acremonium* sp. on the oxidative metabolism of human neutrophils mediated by receptors for IgG and for complement. Extracts of *Gigartina skottsbergii* and *Acremonium* sp., as well as the fractions of this fungus were obtained by adding ethyl acetate solvent, filtered and concentrated under reduced pressure; neutrophils were isolated from whole blood of healthy human subjects using the gelatin solution (2.5%); the chemiluminescence assay was used to evaluate ROS production by neutrophils treated with alga and fungus samples (crude extracts and fractions) and stimulated with immune complexes opsonized with normal human serum (IC/NHS) or phorbol myristate acetate (PMA); endothelial cells extracted from umbilical cord vein (HUVEC) were exposed to neutrophils treated with samples of alga and fungus, which were stimulated with IC/NHS or PMA, to evaluate markers of oxidative stress: lipid peroxidation was evaluated by the method of reactive substances to thiobarbituric acid and the consumption of antioxidant by the dosage of total glutathione; the cytotoxicity of samples of algae and fungus on neutrophils was evaluated by the methods of exclusion of Trypan blue dye, reduction of the salt of tetrazolium bromide and measurement of lactate dehydrogenase. The results showed that i) the crude extracts of the algae *Gigartina skottsbergii* and the fungus *Acremonium* sp., and the fractions of the fungus were able to reduce ROS production by neutrophils; ii) the isolated substance ergosterol was not able to decrease the production of ROS; iii) the samples studied were not cytotoxic to neutrophils; iv) the crude extract of the algae *Gigartina skottsbergii* was able to reduce lipid peroxidation only in the presence of the PMA stimulus, while the crude extract of the fungus *Acremonium* sp. and its fractions obtained were able to decrease lipid peroxidation in the presence of PMA and IC/NHS; v) ergosterol increased HUVEC lipid peroxidation; vi) there was no difference in the consumption of glutathione when the neutrophils were treated with the extract and fractions derived from the fungus. The data presented show an effect of the crude extract of the seaweed *Gigartina skottsbergii* and the crude extract of the endophytic fungus *Acremonium* sp. and its fractions that reduce the oxidative metabolism of neutrophils and the lipid peroxidation that ROS promote in endothelial cells. These results point to a potential therapeutic use of substances from the seaweed *Gigartina skottsbergii* and the endophytic fungus *Acremonium* sp. to minimize the deleterious effects of neutrophil activation in chronic inflammatory processes.

Keywords: Neutrophils; Reactive oxygen species; Receptors for IgG; Complement receptors; Natural products; Seaweed; Endophytic fungi.

**LISTA DE ABREVIATURAS**

BSA	Albumina de soro bovino
C1inh	Inibidor de C1, do inglês <i>C1-inhibitor</i>
C3bi	Fragmento inativado do componente C3 do complemento
CD	<i>Cluster</i> de diferenciação
CFD	Diluyente para fixação do complemento
CPM	contagem de fótons por minuto
CR	Receptor para complemento
CR3	Receptor para complemento tipo 3
CXC	Família CXC quimiocina
CXCL-5	Ligante 5 de CXC quimiocina
CXCR-2	Receptor de quimiocina do tipo CXC 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
ERO	Espécie(s) reativa(s) de oxigênio
Fc $\gamma$ R	Receptor para o Fc da imunoglobulina G (IgG)
FCFRP/USP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
GC/MS	espectrômetro de massas acoplada à cromatografia a gás (do inglês, <i>Gas chromatography – mass spectrometry</i> )

HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, <i>high performance liquid chromatography</i> )
HUVEC	Célula endotelial de veia de cordão umbilical (do inglês, <i>Human Umbilical Vein Endothelial Cell</i> )
MPO	Mieloperoxidase
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NET	Armadilhas extracelulares de neutrófilos, do inglês <i>neutrophil extracellular traps</i>
PDA	<i>Potato dextrose agar</i>
PDB	<i>Potato dextrose broth</i>
PE	Ficoeritrina
PSGL-1	Ligante 1 de P-selectina, do inglês <i>P-selectin granulocyte ligand 1</i>
QL	Quimiluminescência
SHI	Soro humano inativado
SHN	Soro humano normal
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

**LISTA DE SÍMBOLOS**

AcOEt	Acetato de etila
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
MDA	Malonaldeído
MeOH	Metanol
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
SWBG-11	<i>Seawater blue-green médium</i>
TBA	Ácido tiobarbitúrico

# Introdução



## 1.1. Neutrófilos na saúde e na doença

Os neutrófilos são as primeiras células a responder ao processo inflamatório agudo iniciado por um dano tecidual provocado pela presença de patógenos. Esta incumbência fisiológica deve-se à capacidade efetora dos neutrófilos de capturar microrganismos e gerar potentes agentes microbicidas, que impedem a disseminação dos patógenos e levam à sua morte, de liberar mediadores para atrair e ativar outras células da resposta imune e para reparar o dano tecidual (Burn *et al.*, 2021; Wang, 2018).

O potencial microbicida dos neutrófilos é mediado por mecanismos efetores que incluem a fagocitose, produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), liberação de proteases por desgranulação e formação de redes, compostas por DNA e proteínas, chamadas de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs, *neutrophil extracellular traps*). Estes mecanismos envolvem estratégias de captura e a geração de agentes tóxicos, que impedem a disseminação dos patógenos e levam à sua morte. Do ponto de vista fisiológico, este potencial efetor coloca os neutrófilos na linha de frente no processo inflamatório agudo, o que justifica a predominância, 50 a 70 por cento, destas células entre os leucócitos no sangue periférico de humanos adultos saudáveis (Kolaczkowska, Kubes, 2013).

Os neutrófilos têm origem na medula óssea a partir de precursores mieloides com uma produção diária contínua de cerca de  $2 \times 10^{11}$  células, para manter a população de neutrófilos no compartimento circulante. Os neutrófilos chegam à circulação sanguínea na sua forma madura caracterizada por um diâmetro de 7 a  $10 \mu\text{m}$ , núcleo com três a cinco lóbulos e citoplasma contendo uma variedade de grânulos e vesículas secretórias, e têm uma vida média de 8 horas na circulação, quando em condições de homeostase. As características morfológicas do núcleo e a presença de grânulos citoplasmáticos são responsáveis pela classificação dos neutrófilos como leucócitos polimorfonucleares e granulócitos, respectivamente. Enquanto o aspecto funcional confere aos neutrófilos a denominação de fagócitos (Borregaard, 2010).

Por muito tempo os neutrófilos foram considerados células de vida curta, cuja função era atuar no sítio inflamatório através da liberação de agentes antimicrobianos para contenção dos patógenos até que células do sistema imunológico mais especializadas migrassem para o tecido inflamado. Entretanto, estudos têm revelado

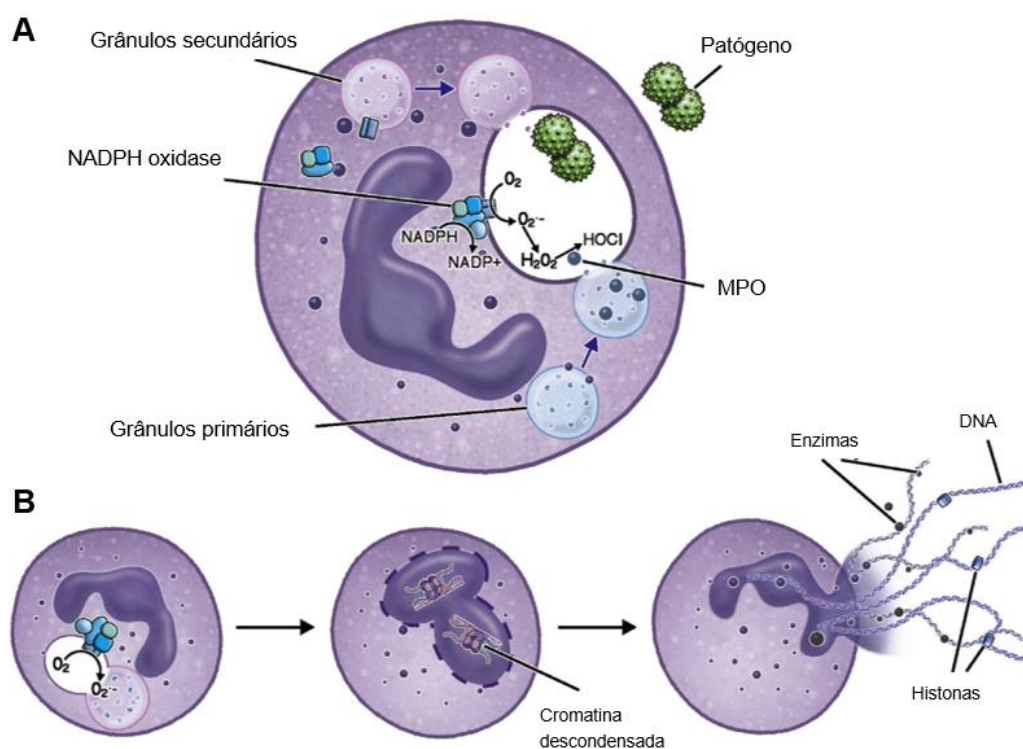
que os neutrófilos apresentam heterogeneidade morfológica, fenotípica e funcional, e contribuem para a iniciação, modulação e são importantes para a manutenção da homeostase (Wang, 2018; Metzemaekers *et al.*, 2020; Herrero-Cervera *et al.*, 2022).

A função primária do neutrófilo é a remoção e destruição tanto de patógenos, que conseguem chegar aos tecidos subjacentes às camadas superficiais do organismo, tendo vencido barreiras físicas e químicas, quanto de debris celulares, a qual é iniciada pela fagocitose (Borges *et al.*, 2020; Rubenich *et al.*, 2021). A fagocitose é um mecanismo de englobamento de material extracelular alvo a partir de 0,5 $\mu$ m mediado pela interação entre ligantes presentes neste alvo, geralmente opsoninas como complemento e/ou anticorpo, e receptores específicos nos neutrófilos (Cockram *et al.*, 2021). Esta interação promove a ativação de um sistema multiprotéico de transferência de elétrons, o complexo NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido) oxidase, que leva ao *metabolismo* oxidativo dos neutrófilos caracterizado pelo aumento do consumo de oxigênio e início da produção ERO. Entre as ERO, encontram-se o ânion superóxido, o radical hidroxila e o peróxido de hidrogênio, os quais são espécies altamente reativas que atuam como oxidantes de moléculas nos sistemas biológicos e, conseqüentemente, são tóxicos para a partícula fagocitada. Soma-se à fagocitose, o processo de desgranulação, que corresponde à fusão dos grânulos citoplasmáticos ao fagossomo formado pela invaginação da membrana do neutrófilo. Como resultado, um rico conteúdo enzimático é liberado dos grânulos no agora chamado fagolisossomo e potencializa a atividade microbicida do neutrófilo. Sobretudo através do sistema formado pela mieloperoxidase (MPO) liberada dos grânulos específicos (Figura 1), o peróxido de hidrogênio e íons haletos, especialmente o cloreto, que leva à geração de ácido hipocloroso e, subseqüentemente, cloro, cloraminas, radicais hidroxila, oxigênio singleto e ozônio, os quais são capazes de oxidar diversas moléculas e resultar na morte de uma variedade de microrganismos e células tumorais, que tenham sido fagocitados (Bardoel *et al.*, 2014).

Desta forma, geralmente, pequenos microrganismos são removidos pelos neutrófilos através da fagocitose e desgranulação. Frente aos microrganismos maiores, os neutrófilos são capazes de liberar as NETs, um complexo em forma de rede consistindo em DNA livre de células (cromatina), histonas e proteínas dos grânulos de neutrófilos, as quais são liberadas para o espaço extracelular para

capturar e inativar patógenos/partículas (Brinkmann *et al.*, 2004). O processo de ativação e liberação de NETs é geralmente referido como NETose e pode ser induzido, em geral, por bactérias gram-positivas e negativas, patógenos grandes, fungos e condições estéreis. O tamanho dos microrganismos, seus fatores de virulência e moléculas inflamatórias liberadas durante a inflamação regulam a indução de NETs. Provavelmente, as NETs sejam um mecanismo evolutivo conservado da resposta imune inespecífica para evitar a disseminação de patógenos e garantir sua eliminação através do aumento da concentração local de fatores antimicrobianos e tóxicos. No entanto, além da função antimicrobiana, as NETs também podem contribuir para a patogênese de várias doenças inflamatórias e autoimunes, especialmente doenças vasculares, como aterosclerose, glomerulonefrite, doença pulmonar crônica e sepse (Kaplan, Radic, 2012; Castanheira, Kubes, 2018; Singhal, Kumar, 2022).

Figura 1. Funções efetoras dos neutrófilos. A, Após a fagocitose dos patógenos, a fusão de grânulos dos neutrófilos com o fagossomo introduz o conteúdo de grânulos antimicrobianos no fagossomo. Os grânulos não primários transportam os componentes do complexo enzimático NADPH oxidase para o fagossomo, onde eles se reúnem com componentes citoplasmáticos. A NADPH oxidase ativada libera no fagossomo o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o qual é convertido em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e, na presença de íons cloro ( $Cl^-$ ) e da enzima mieloperoxidase (MPO), é convertido em ácido hipocloroso (HOCl). B. NETs são grandes redes extracelulares de proteínas microbicidas citosólicas e granulares envolvidas em uma rede de cromatina descondensada ou DNA mitocondrial (não mostrado). Adaptado de Lehman; Segal, 2020.



Na inflamação crônica, os neutrófilos são continuamente recrutados para o sítio inflamatório e contribuem para a manutenção do processo através da liberação do seu arsenal citotóxico, gerado por todas as suas funções efetoras, bem como para a ativação de outras células da resposta imune. As moléculas tóxicas produzidas pelos neutrófilos não são seletivas para os patógenos ou outros insultos ao hospedeiro. Em geral, estas moléculas têm como alvo o DNA, proteínas e lipídios e, se liberadas para o meio extracelular, agredem os tecidos, iniciando e sustentando a lesão tecidual mediada pela resposta imune nos processos inflamatórios crônicos (Borregaard, Cowland, 1987; Liew, Kubes, 2019).

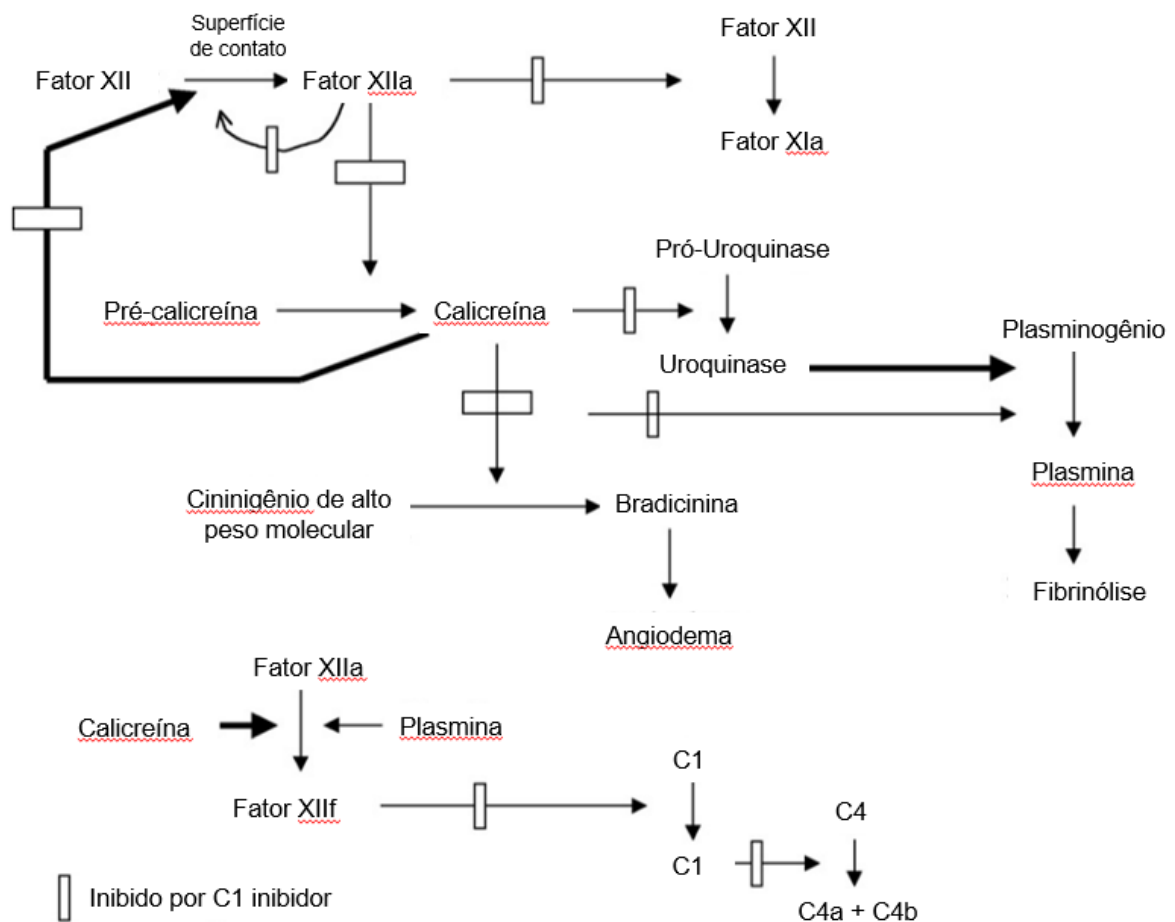
A inflamação crônica tem como característica um estado pró-trombótico causado pela ativação mútua de neutrófilos e plaquetas, os quais interagem por adesão direta através de PSGL-1 (do inglês, *P-selectin granulocyte ligand 1*), integrina  $\alpha\text{L}\beta 2$  e CD40 nos neutrófilos e P-selectina, ICAM-2 (do inglês, *intercellular adhesion molecule 2*) e CD40L (CD40 ligante) nas plaquetas. Além disso, moléculas secretadas pelas plaquetas, como a quimiocina CXCL5, e outras presentes nas suas vesículas extracelulares, promovem a adesão dos neutrófilos ao endotélio e ativam a formação de NETs, respectivamente. As NETs, por sua vez, ativam o fator XII da coagulação (Laridan *et al.*, 2019), que é capaz de desencadear as funções efetoras dos neutrófilos (Renné, Stavrou, 2019). Então, os neutrófilos ativados causam danos ao endotélio e sustentam a formação de trombos, o que resulta em mais plaquetas aprisionadas e interagindo com os neutrófilos, mantendo-se o processo tromboembólico (Noubouossie *et al.*, 2019).

A complexidade de interações entre os neutrófilos e a coagulação inclui ainda o sistema complemento. A coagulação e o complemento também são sistemas cruciais para a imunidade inata, ambos são ativados de forma maciça durante a inflamação e, devido à ancestralidade comum, eles interagem entre si e compartilham ativadores e inibidores como o fator XIIIa (ativado), que é capaz de ativar o componente C1q da via clássica do complemento (Figura 2). Da mesma forma, o inibidor de C1, (C1inh, do inglês *C1-inhibitor*) atua não apenas como inibidor da ativação do complemento pelas vias clássica e das lectinas, mas também da ativação da via intrínseca da coagulação, inibindo a ativação do fator XII e a geração subsequente de bradicinina. Na inflamação, a bradicinina induz a vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular (Kaplan, Ghebrehiwet, 2010). Adicionalmente, os fatores Xa e XIa da coagulação são capazes de clivar as proteínas C3 e C5 do complemento, o que leva à geração das anafilatoxinas C3 e C5a, as quais têm atividade quimiotática para neutrófilos. As redes de fibrina formadas pela coagulação também clivam C5 gerando C5a (Amara *et al.*, 2008). Sob condições de intensa ativação dos neutrófilos, a liberação maciça de ERO leva à inativação de antiproteases (Nathan, 2006), as quais controlam a ativação das serina proteases da via das lectinas do sistema complemento. Na ausência de antiproteases, estas serina proteases podem ativar a coagulação, a liberação de bradicinina, ativação do endotélio e de plaquetas (Garred *et al.*, 2016). A interface entre estes sistemas é rigorosamente controlada, uma vez

que a desregulação pode levar tanto à produção de mediadores inflamatórios pela ativação do complemento quanto a eventos tromboembólicos pela ativação da coagulação (Oikonomopoulou *et al.*, 2012).

Figura 2. Representação esquemática da cascata de formação de cinina no plasma indicando as etapas inibidas por C1 inibidor. Todas as funções do Fator XIIa e da caliceína são afetadas. A figura inferior indica que a digestão adicional do Fator XIIa pela caliceína e plasmina gera o fragmento do Fator XII (XII<sub>f</sub>), que é um iniciador da cascata do complemento.

Ambos os Fatores XII<sub>f</sub> e C1 são inibidos por C1 inibidor. Adaptado de Kaplan, Ghebrehiwet, 2010.



Assim, é necessária uma regulação fina da ativação dos neutrófilos para manter a homeostase e prevenir danos aos tecidos do hospedeiro. Esta prevenção é mediada por um equilíbrio entre a sinalização intracelular eliciada via imunoreceptores constitutivos e induzidos por inflamação expressos na superfície dos neutrófilos (Futosi *et al.*, 2013; van Rees *et al.*, 2016), sistemas antioxidantes que controlam a

ação de ERO (Valko *et al.*, 2007) e antiproteínases presentes no plasma e fluidos intersticiais que controlam a atividade de ERO e proteases (Siddiqui *et al.*, 2016).

Quanto aos imunoreceptores, os neutrófilos expressam na sua superfície uma grande diversidade de classes, as quais incluem receptores acoplados à proteína G, receptores para imunoglobulina G (Fc $\gamma$ R), receptores para moléculas de adesão como selectinas/ligantes de selectina e integrinas, incluindo o receptor para complemento tipo 3 (CR3; Mac-1; CD11b/CD18), vários receptores de citocinas, bem como receptores de reconhecimento de padrões moleculares, incluindo receptores do tipo Toll e lectinas do tipo C (Futosi *et al.*, 2013).

Dentre os imunoreceptores nos neutrófilos, os Fc $\gamma$ R e o CR3 medeiam a fisiopatologia do depósito de imunocomplexos (IC) nos pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES), uma doença inflamatória crônica de caráter autoimune. No LES, os IC ativam excessivamente os neutrófilos e causam danos ao endotélio. A produção contínua de IC formados por autoanticorpos e autoantígenos leva à exaustão dos mecanismos de remoção de imunocomplexos circulantes. Isto predispõem à deposição destes IC em sítios vulneráveis onde o sangue é filtrado sob alta pressão, principalmente no endotélio, rins e articulações (Davies, 1996). A fagocitose dos IC depositados sobre o endotélio ou outro tecido não é eficiente, pois o fagossomo não consegue internalizar o IC aderido ao tecido. Então, a liberação do arsenal citotóxico dos neutrófilos agride o tecido do hospedeiro, causa lesão e o processo inflamatório é retroalimentado. Como consequência, uma resposta inflamatória crônica se estabelece com intenso infiltrado de células imunes e produção de mediadores inflamatórios. Há predomínio de neutrófilos e ativação maciça do complemento no local. Neste cenário, os mecanismos efetores dos neutrófilos podem ser ativados via seus inúmeros receptores, sobretudo pela ativação mediada pelos seus receptores das opsoninas presentes nos IC, o Fc $\gamma$ R e o CR3, os quais são potentes ativadores da produção de ERO, desgranulação e liberação de NETs (Wang *et al.*, 2022). Adicionalmente, quimiocinas e citocinas podem ativar a desgranulação dos neutrófilos via receptores acoplados à proteína G (Mayadas *et al.*, 2014).

Diante da importância dos neutrófilos na fisiologia da resposta imune e do seu envolvimento na patogênese dos processos inflamatórios crônicos, eles são um alvo terapêutico de interesse para a pesquisa básica e aplicada.

## 1.2. Neutrófilos como alvo terapêutico

Os neutrófilos expressam várias classes de imunoreceptores, os quais estão envolvidos com o controle e o ajuste fino das suas funções efetoras através de vias de sinalização para ativação e inibição celular. Esta variedade de receptores se deve às diferenças entre os ligantes e à importância de controlar as respostas dos neutrófilos em diferentes circunstâncias. Para entender o papel dos imunoreceptores nas funções dos neutrófilos, é necessário conhecer as condições fisiológicas e patológicas nas quais eles estão envolvidos, bem como entender a relação entre eles. Embora os dados da literatura ainda sejam dispersos, a regulação de algumas das vias de sinalização destes imunoreceptores têm se mostrado promissoras como alvo terapêutico e estudos futuros devem demonstrar se isto será benéfico para o tratamento de doenças humanas (van Rees *et al.*, 2016).

O desafio está em como desenvolver um alvo terapêutico que controle as respostas deletérias dos neutrófilos sem prejudicar as funções importantes para a manutenção da homeostase.

Os neutrófilos estão associados à patologia de diversas doenças infecciosas, inflamatórias aguda e crônicas, autoimunes, hepáticas, neurodegenerativas, sepse, câncer, distúrbios respiratórios, e perda óssea de etiologia inflamatória. Assim, estudos voltados para o desenvolvimento e produção de neutrófilos; descobrimento de substâncias químicas ou naturais que possam controlar a ativação dessas células e, conseqüentemente, a inflamação; e sobre o fenótipo dos neutrófilos existente nessas doenças estão sendo realizados com o objetivo de descobrir novas abordagens terapêuticas (Jaillon *et al.*, 2013; Du *et al.*, 2014; Stapels *et al.*, 2015; Chun-Yu *et al.*, 2016; Németh *et al.*, 2020).

Algumas estratégias terapêuticas envolvendo os neutrófilos se encontram em fase de teste clínico. Exemplos dessas estratégias são a utilização de antagonistas do receptor para a interleucina 8 (CXCR2, do inglês *CXC chemokine receptor 2*) no tratamento da asma e a administração de um inibidor para a elastase para tratamento de bronquiolite obliterante (Németh *et al.*, 2020).

Em doenças autoimunes, onde o neutrófilo desempenha um papel importante, como o LES, os pacientes têm sido tratados em grande parte com terapias imunossupressoras empíricas, que estão associadas com toxicidade e nem sempre



há controle adequado das manifestações da doença. Terapias específicas para a patogênese ou para a progressão da doença têm sido restritas aos ensaios clínicos, em grande parte devido à natureza complexa e heterogênea da doença e dificuldades na uniformidade nos resultados. Os avanços recentes que poderiam melhorar o tratamento incluem a identificação de variações genéticas que influenciam o risco de desenvolver a doença, uma melhor compreensão da ativação da resposta imunológica inata e adaptativa e regulação da tolerância, dissecação da ativação das células imunes e vias inflamatórias, elucidação dos mecanismos e marcadores de danos nos tecidos. Estes avanços, juntamente com melhorias no *design* dos ensaios clínicos, poderiam formar uma plataforma para lançar o desenvolvimento de uma nova geração de terapias para o lúpus (Thieblemont *et al.*, 2016).

Considerando-se o envolvimento dos neutrófilos na fisiopatologia de doenças, o estudo das funções efetoras dos neutrófilos é importante para a compreensão dos mecanismos que envolvem as defesas do hospedeiro e a interação neutrófilo-endotélio na patogênese dos processos inflamatórios, bem como para estudar potenciais moléculas que possam regular os fenótipos anti-inflamatórios dos neutrófilos.

### **1.3. Produtos naturais de organismos marinhos provenientes da Antártica**

Os produtos naturais e suas atividades biológicas representam uma fonte de diversidade química para a descoberta de novos candidatos a fármacos com potencial terapêutico para uma variedade de doenças. Eles são considerados a classe mais bem-sucedida de potenciais medicamentos, sendo que mais de um milhão de substâncias químicas descobertas têm origem nos produtos naturais (Shinde *et al.*, 2019; Chen, Kirchmair, 2020; Rateb, Abdelmohsen, 2021). Apesar de medicamentos provenientes de metabólitos naturais serem menos potente quando comparados a drogas sintéticas, eles representam cerca de 60% do número de medicamentos disponíveis no mercado e são consideradas as drogas com menor chance de causar efeitos adversos e as que apresentam melhor absorção pelo organismo. Estes dados atestam a contribuição significativa da química de produtos naturais para o desenvolvimento de novos medicamentos. No entanto, estima-se que dois milhões da

biodiversidade mundial (cerca de 95%) ainda não foram estudados quanto a uma possível atividade biológica (Shinde *et al.*, 2019).

Com a expansão e aprofundamento de pesquisas, a maior parte está voltada em buscar substâncias naturais com bioatividade versátil. Assim, ambientes especiais como mar profundo, zonas árticas e ambientes simbióticos podem ser fontes vitais para a descoberta de metabólitos (Song *et al.*, 2021). Neste contexto, o ambiente marinho é considerado uma importante fonte de produtos naturais, acumulados principalmente nos organismos vivos (Avila, 2016; Shinde *et al.*, 2019; Song *et al.*, 2021). Estima-se que cerca de 1% das 250.000 espécies marinhas conhecidas tem sido estudado (Blunt *et al.*, 2014), o que significa que existe uma enorme variedade de organismos marinhos a serem explorados quanto à suas propriedades química, biológica e biossintética.

Estudar esses organismos é essencial para a descoberta de produtos naturais que possam apresentar um potencial tanto ecológico como farmacológico. No entanto, as potenciais aplicações de produtos naturais marinhos ainda permanecem pouco exploradas na farmacologia (Ogaki *et al.*, 2021). Estudos recentes relataram que os organismos marinhos fornecem mais produtos naturais bioativos quando comparados a organismos terrestres. Contudo, quando se fala em organismos marinhos, a maior parte dos estudos está direcionada a áreas temperadas e tropicais, enquanto as áreas polares estão sendo pouco exploradas (Ogaki *et al.*, 2021).

O Continente Antártico possui um cenário marinho exuberante. É um dos ambientes mais extremos da Terra, onde 99,8% de sua área está coberta por uma camada de gelo, cuja espessura é de cerca de 2 km. A Península Antártica e as ilhas adjacentes (Antártica marítima) apresentam o clima marítimo frio com temperaturas mensais médias de 0 a -15°C e precipitações anuais de 350 a mais de 500mm. O resto do continente (Antártica continental) é caracterizado por apresentar condições mais amenas ao longo da costa e mais extremas no interior. As temperaturas médias mensais variam de -15°C a -50°C e as precipitações são quase inexistentes no Planalto do Gelo (Post *et al.*, 2019; Zucconi *et al.*, 2020).

Mesmo em condições tão adversas, uma diversidade de formas de vida está presente no continente Antártico como bactérias, fungos, invertebrados, aves e mamíferos (Avila, 2016; Overy *et al.*, 2019). Entretanto, os ecossistemas terrestres da Antártica são dominados por microrganismos, caracterizados por apresentarem

adaptações surpreendentes para suportar as condições extremas do continente. Em particular, as temperaturas extremamente baixas, eventos frequentes de congelamento e degelo, ventos fortes, diferentes condições de pH e alta salinidade (Ogaki *et al.*, 2021). Neste continente, algas, bactérias e fungos não somente habitam regiões onde não há gelo, como também prosperam no gelo marinho, na neve e em lagos cobertos de gelo. Em particular, o ambiente marinho é perfeito para proliferação de microalgas e macroalgas (Post *et al.*, 2019).

Também chamadas de algas marinhas, as macroalgas são organismos eucarióticos fotossintéticos multicelulares que apresentam clorofila e podem estar livres ou fixadas a substratos duros. A classificação das macroalgas é determinada de acordo com seus pigmentos fotossintéticos. Os principais grupos incluem algas verde (divisão Chlorophyta), algas marrons (divisão Phaeophyta) e algas vermelhas (divisão Rhodophyta) (Dahms, Dobretsov, 2017; Sasaki, Yoshikuni, 2022).

As macroalgas marinhas são bastante dominantes em águas polares, temporais e tropicais. Estima-se que 90% das espécies de macroalgas estão localizadas no oeste da Antártica (Dahms, Dobretsov, 2017; Sasaki, Yoshikuni, 2022). Grandes quantidades de macroalgas à deriva são desperdiçadas e apenas algumas espécies estão atualmente em uso, os quais variam entre alimentos, cosméticos, fertilizantes, biocombustíveis e fonte de produtos naturais (Dahms, Dobretsov, 2017). Adiciona-se ainda o fator de essas algas serem de fácil cultivo e alto potencial tecnológico (Dahms, Dobretsov, 2017; Sasaki, Yoshikuni, 2022).

A pesquisa sobre a biodiversidade das algas na Antártica é restrita devido à falta de informações taxonômicas e de distribuição consistente, o que nos impulsiona a realizar estudos de prospecção química e biológica com as mesmas (Clayton, 1994).

Por ser fortemente isolada, a flora ficológica do Oceano Antártico teve como consequência um aumento no grau de endemismo e, por isso, aproximadamente 30% das espécies da região são endêmicas (Wiencke, Clayton, 2002).

Macroalgas saudáveis produzem uma secreção rica em carboidratos, lipídeos e peptídeos, que age como um fator atrativo para os microrganismos colonizadores (Zuccaro, Mitchell, 2005), como por exemplo, fungos. Fungos em associação com macroalgas integram um grupo variado que inclui espécies simbiotes, sapróbias, parasitas e patogênicas (Suryanarayanan, 2012; Ogaki *et al.*, 2021).

Os fungos marinhos correspondem aos fungos encontrados exclusivamente no ambiente marinho, sendo que muitos se adaptaram e se reproduzem através da dispersão dos esporos nas águas marinhas (Overy *et al.*, 2019). Eles são uma classe de microrganismos pouco estudada dentro de um diversificado e complexo ecossistema. No entanto, sabe-se que estes fungos são importantes no reaproveitamento de nutrientes, principalmente, na decomposição de substratos lenhosos, herbáceos e até mesmo de animais mortos nos oceanos, além de serem responsáveis pela liberação de fósforo, nitrogênio e carbono na atmosfera e no solo (Zucconi *et al.*, 2020; Ogaki *et al.*, 2021). Também são os responsáveis pela produção e secreção de uma grande variedade de enzimas e metabólitos bioativos, os quais podem ser uma fonte de descoberta de novas substâncias com atividade terapêutica (Ogaki *et al.*, 2021).

A região externa das algas fornece um local protegido em um ambiente que constantemente é alvo de fatores de estresse como a baixa concentração de nutrientes, dessecação, salinidade e radiação ultravioleta (Zucconi *et al.*, 2020).

Por crescerem em um habitat extremo e crítico para reprodução, os fungos produzem metabólitos secundários diferenciados, resultantes da adaptação química frente às pressões ambientais (Ogaki *et al.*, 2021). O primeiro fármaco oriundo do ambiente marinho foi a Ziconotida, que é potente analgésico extraído do gastrópode *Conus magus* (Oliveira *et al.*, 2012). Por esta razão, houve um aumento nas pesquisas destinadas a esses organismos, principalmente com relação aos produtos naturais produzidos por esses fungos (Overy *et al.*, 2019). O antibiótico cefalosporina C foi o primeiro metabólito terapeuticamente ativo extraído do fungo marinho *Cephalosporium sp.*, obtido de água marinha (Burton, Abraham, 1951; Kelecom, 2002). Além dessas drogas, outros exemplos que podem ser citados são drogas anticancerígenas (Filippi, 2019; Lawrence *et al.*, 2020; Ogaki *et al.*, 2021). e analgésicos (van Rees *et al.*, 2016; Ogaki *et al.*, 2021,).

As relações ecológicas que existem entre microrganismos e macroalgas são pouco conhecidas e podem ter um importante significado para a conservação e exploração biotecnológica dos ambientes marinhos (Hawksworth, 1991; Zucconi *et al.*, 2020; Ogaki *et al.*, 2021).

#### 1.4. *Gigartina skottsbergii*

Por apresentar uma coloração vermelha intensa brilhante, essa alga está classificada na divisão Rhodophyta (Dahms, Dobretsov, 2017; Sasaki, Yoshikuni, 2022).

*Gigartina skottsbergii* apresenta talos espessos ao toque, os quais apresentam contorno semicircular a circular (Figura 3). São caracterizadas por habitarem áreas subtidais (áreas sempre cobertas por água) em profundidades que variam de 3 a 20m (Suryanarayanan, 2012; Ogaki *et al.*, 2021).

Figura 3. Alga marinha *Gigartina skottsbergii* coletada no continente Antártico.



Fonte: Foto de N.C. Canicoba

Essa alga é considerada endêmica para as regiões do extremo sul do continente Sul-Americano, sendo encontrada principalmente nas costas do Chile e da Antártica (Diogo *et al.*, 2014). Conhecida por ser uma das maiores fontes produtoras de carrageninas, uma substância de grande importância na indústria alimentícia, esta alga vem sendo altamente exportada, principalmente de países asiáticos. Entretanto, ainda existem muitas incógnitas sobre o potencial das propriedades químicas, bacteriostáticas e de preservação de alimentos dessas espécies de algas (Ortiz-Viedma *et al.*, 2021).

## 1.5. Fungos endofíticos

Entre os microrganismos que habitam o ecossistema, os fungos são onipresentes e os principais responsáveis pela decomposição da matéria orgânica e pela liberação de moléculas como o fósforo, nitrogênio e carbono na atmosfera e no solo. Também produzem e secretam uma grande variedade de enzimas e metabólitos secundários bioativos, alguns dos quais são de grande interesse biotecnológico (Onofri *et al.*, 2007; Bridge; Spooner, 2012; Rosa *et al.*, 2019).

Os fungos marinhos são uma classe de microrganismos pouco estudada dentro de um diversificado e complexo ecossistema, no entanto sabe-se que estes fungos são importantes no reaproveitamento de nutrientes, principalmente, na decomposição de substratos lenhosos, herbáceos e até mesmo de animais mortos nos oceanos (Hyde *et al.*, 1998), podendo ser uma fonte de descoberta de novas substâncias com atividade terapêutica. Algumas espécies de fungos encontradas no ambiente antártico possivelmente estão presentes como propágulos transportados pelo ar de fora do continente e não crescem ativamente nesse ambiente natural. Outras espécies são nativas, ou mesmo endêmicas, capazes de crescer e se reproduzir ativamente em condições ambientais que são consideradas as mais extremas da Terra (Zucconi *et al.*, 2020). Uma das maneiras que auxilia no crescimento e reprodução desses fungos é a capacidade de eles habitarem a parte externa das algas, a qual fornece uma região protegida em um ambiente que constantemente é alvo de fatores de estresse como a baixa concentração de nutrientes, dessecação, salinidade e radiação UV (Hyde *et al.*, 1998).

Por crescerem em um habitat extremo e crítico para reprodução, os fungos produzem metabólitos secundários diferenciados, resultantes da adaptação química frente às pressões ambientais (Bhadury *et al.*, 2006). O primeiro fármaco oriundo do ambiente marinho foi a Ziconotida, que é potente analgésico extraído do gastrópode *Conus magus* (Oliveira *et al.*, 2012). O antibiótico cefalosporina C foi o primeiro metabólito terapeuticamente ativo extraído do fungo marinho *Cephalosporium sp.*, obtido de água marinha (Burton; Abraham, 1951, Kelecom, 2002).

As relações ecológicas que existem entre microrganismos e macroalgas são pouco conhecidas e podem ter grande significado para a conservação e exploração biotecnológica dos ambientes marinhos (Hawksworth, 1991).

**Conclusão**

- Os resultados confirmam a hipótese inicial que o extrato bruto da alga marinha *Gigartina skottsbergii* e as frações do fungo endofítico isolado *Acremonium* sp. exercem efeito sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos isolados de indivíduos humanos adultos saudáveis.
- Os extratos brutos da alga *Gigartina skottsbergii* e do fungo endofítico *Acremonium* sp., e as frações do fungo foram capazes de reduzir a produção de ERO pelos neutrófilos.
- As amostras estudadas não foram citotóxicas para os neutrófilos.
- O extrato bruto da alga *Gigartina skottsbergii* foi capaz de diminuir a peroxidação lipídica das células endoteliais na presença do estímulo PMA, enquanto o extrato bruto do fungo *Acremonium* sp. e suas frações foram capazes de diminuir a peroxidação lipídica para PMA e IC/SHN;
- O ergosterol aumentou a peroxidação lipídica das HUVEC;
- Não houve diferença no consumo da glutatona quando os neutrófilos foram tratados com o extrato e frações derivados do fungo.



## **Referências Bibliográficas**

ABAD, L. V. et al. Antioxidant activity potential of gamma irradiated carrageenan. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 79, p. 73–79, set. 2013.

ABDELMOHSEN, U. R. et al. **Potential of marine natural products against drug-resistant fungal, viral, and parasitic infections. The Lancet Infectious Diseases**Lancet Publishing Group, , 1 fev. 2017.

ARULKUMAR, A. et al. Chemical biopreservative effects of red seaweed on the shelf life of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Foods**, v. 9, n. 5, 1 maio 2020.

AVILA, C. Ecological and Pharmacological Activities of Antarctic Marine Natural Products. **Planta Medica**, v. 82, n. 9–10, p. 767–774, 1 jun. 2016.

BARDOEL, B. W. et al. **The balancing act of neutrophils. Cell Host and Microbe**Cell Press, 14 maio 2014.

BORGES, L. et al. **COVID-19 and Neutrophils: The relationship between hyperinflammation and neutrophil extracellular traps. Mediators of Inflammation**Hindawi Limited, , 2020.

BORREGAARD, N. **Neutrophils, from Marrow to Microbes. Immunity**, 24 nov. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Conselho Nacional de Saúde. Resolução n. 466, de 12 de dezembro de 2012. Aprova diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos.** Brasília, Diário Oficial da União, 12 dez. 2012. Disponível em <https://conselho.saude.gov.br/resolucoes/2012/Reso466.pdf>

BRINKMANN, V. et al. **Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <[www.sciencemag.org](http://www.sciencemag.org)>.

BROCHETTA, C. et al. **Identification and Subcellular Localization of Neuronal Calcium Sensor-1 (NCS-1) in Human Neutrophils and HL-60 Cells**Inflammation. [s.l: s.n.].

BULUA, A. C. et al. Mitochondrial reactive oxygen species promote production of proinflammatory cytokines and are elevated in TNFR1-associated periodic syndrome (TRAPS). **Journal of Experimental Medicine**, v. 208, n. 3, p. 519–533, 14 mar. 2011.

BURN, G. L. et al. **The Neutrophil. Immunity**Cell Press, , 13 jul. 2021.

CASTANHEIRA, F. V. S.; KUBES, P. **Neutrophils and NETs in modulating acute and chronic inflammation. Blood**American Society of Hematology, , 16 maio 2019.

CHEN, C. Y. et al. **Marine natural product inhibitors of neutrophil-associated inflammation. *Marine Drugs***MDPI AG, , 1 ago. 2016.

CHEN, Y.; KIRCHMAIR, J. **Cheminformatics in Natural Product-based Drug Discovery. *Molecular Informatics***Wiley-VCH Verlag, , 1 dez. 2020.

CLAYTON, M.N. **Evolution of the Antarctic benthic algal flora. *Journal Phycology***. 1994; 30:897–904.

COCKRAM, T. O. J. et al. **The Phagocytic Code Regulating Phagocytosis of Mammalian Cells. *Frontiers in Immunology***Frontiers Media S.A., , 9 jun. 2021.

DAHMS, H. U.; DOBRETSOV, S. **Antifouling compounds from marine macroalgae. *Marine Drugs***MDPI AG, , 1 set. 2017.

DE FELÍCIO, R. et al. Trypanocidal, leishmanicidal and antifungal potential from marine red alga *Bostrychia tenella* J. Agardh (Rhodomelaceae, Ceramiales). ***Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis***, v. 52, n. 5, p. 763–769, set. 2010.

DIOGO, J. V. et al. Antiviral activity of lambda-carrageenan prepared from red seaweed (*Gigartina skottsbergii*) against BoHV-1 and SuHV-1. ***Research in Veterinary Science***, v. 98, p. 142–144, 1 fev. 2015.

DU, J. et al. Diagnostic utility of neutrophil CD64 as a marker for early-onset sepsis in preterm neonates. ***PLoS ONE***, v. 9, n. 7, 17 jul. 2014.

EDWARDS, K.; JOHNSTONE, C.; THOMPSON, C. **A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis***Nucleic Acids Research*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://nar.oxfordjournals.org/>>.

FILIPPI, M. D. **Neutrophil transendothelial migration: Updates and new perspectives. *Blood***American Society of Hematology, , 16 maio 2019.

FUTOSI, K.; FODOR, S.; MÓCSAI, A. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. ***International Immunopharmacology***, v. 17, n. 3, p. 638–650, 2013.

GARRED, P. et al. **A journey through the lectin pathway of complement—MBL and beyond. *Immunological Reviews***Blackwell Publishing Ltd, , 1 nov. 2016.

GEBHARD, F.; LAMBRIS, J. D.; HUBER-LANG, M. **6. Interaction Between the Coagulation and Complement System 1 1 2 3.** [s.l: s.n.].

Hawksworth1991Magnitude. [s.d.].

INCALZA, M. A. et al. **Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases.** *Vascular Pharmacology* Elsevier Inc., , 30 abr. 2018.

JAILLON, S. et al. **Neutrophils in innate and adaptive immunity.** *Seminars in Immunopathology*, jul. 2013.

KAPLAN, A. P.; GHEBREHIWET, B. **The plasma bradykinin-forming pathways and its interrelationships with complement.** *Molecular Immunology*, ago. 2010.

KAPLAN, M. J.; RADIC, M. Neutrophil Extracellular Traps: Double-Edged Swords of Innate Immunity. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 6, p. 2689–2695, 15 set. 2012.

KEDARE, S. B.; SINGH, R. P. **Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay.** *Journal of Food Science and Technology*, ago. 2011.

KELECOM, A. Secondary metabolites from marine microorganisms\*. v. 74, n. 1, p. 151–170, 2002.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. **Neutrophil recruitment and function in health and inflammation.** *Nature Reviews Immunology*, mar. 2013.

KON, S. et al. **Isolation of Antibiotics from a Species of Cephalosporium. Cephalosporins P1, P2, P3, P4 and P5** *Indu8tr. Engng Chem. (Anal. Ed.)*. [s.l: s.n.].

LARIDAN, E.; MARTINOD, K.; DE MEYER, S. F. Neutrophil Extracellular Traps in Arterial and Venous Thrombosis. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v. 45, n. 1, p. 86–93, 2019.

LAWRENCE, S. M.; CORRIDEN, R.; NIZET, V. **How Neutrophils Meet Their End.** *Trends in Immunology* Elsevier Ltd, , 1 jun. 2020.

LEANDRINI DE OLIVEIRA, A. L.; DE FELÍCIO, R.; DEBONSI, H. M. Marine natural products: chemical and biological potential of seaweeds and their endophytic fungi. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 4, p. 906–920, [s.d.].

LIEW, P. X.; KUBES, P. The Neutrophil's Role During Health and Disease. **Physiol Rev**, v. 99, p. 1223–1248, 2019.

MACIEL, O. M. C. et al. Photoprotective potential of metabolites isolated from algae-associated fungi *Annulohyphoxylon stygium*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 178, p. 316–322, 1 jan. 2018.

MARZOCCHI-MACHADO, C. M. et al. Fcγ and complement receptors: Expression, role and co-operation in mediating the oxidative burst and degranulation of neutrophils of Brazilian systemic lupus erythematosus patients. **Lupus**, v. 11, n. 4, p. 240–248, 2002.

MAYADAS, T. N.; CULLERE, X.; LOWELL, C. A. The multifaceted functions of neutrophils. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 9, p. 181–218, 2014.

METZEMAEKERS, M.; GOUWY, M.; PROOST, P. **Neutrophil chemoattractant receptors in health and disease: double-edged swords**. **Cellular and Molecular Immunology** Springer Nature, , 1 maio 2020.

MORAES, V. R. **Prospecção química e avaliação do potencial biológico do fungo endofítico *Aspergillus unguis* obtido da alga *Palmaria decipiens* proveniente da Antártica**. 2017. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

MOSMANN, T. **Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays** **Journal of Immunological Methods**. [s.l.: s.n.].

NAKAHIRA, K. et al. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. **Nature Immunology**, v. 12, n. 3, p. 222–230, mar. 2011.

NATHAN, C. **Neutrophils and immunity: Challenges and opportunities**. **Nature Reviews Immunology**, mar. 2006.

NÉMETH, T.; SPERANDIO, M.; MÓCSAI, A. **Neutrophils as emerging therapeutic targets**. **Nature Reviews Drug Discovery** Nature Research, , 1 abr. 2020.

NOUBOUOSSIE, D. F. et al. **Neutrophils: Back in the thrombosis spotlight**. **Blood** American Society of Hematology, , 16 maio 2019.

Nogueira, G. A. **Estudo do metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos expostos a produtos de alga marinha e fungo endofítico provenientes da Antártica**. 2018. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. Orientador: Cleni Mara Marzocchi Machado

OGAKI, M. B. et al. Fungi Present in Antarctic Deep-Sea Sediments Assessed Using DNA Metabarcoding. **Microbial Ecology**, v. 82, n. 1, p. 157–164, 1 jul. 2021.

OIKONOMOPOULOU, K. et al. **Interactions between coagulation and complement - Their role in inflammation. Seminars in Immunopathology**, jan. 2012.

ORTIZ-VIDEIRA, J. et al. Protective effect of red algae (Rhodophyta) extracts on essential dietary components of heat-treated salmon. **Antioxidants**, v. 10, n. 7, 1 jul. 2021a.

ORTIZ-VIDEIRA, J. et al. Protective effect of red algae (Rhodophyta) extracts on essential dietary components of heat-treated salmon. **Antioxidants**, v. 10, n. 7, 1 jul. 2021b.

OVERY, D. P. et al. The neglected marine fungi, sensu stricto, and their isolation for natural products' discovery. **Marine Drugs**, v. 17, n. 1, 10 jan. 2019.

PAOLIELLO-PASCHOALATO, A. B. et al. Isolation of healthy individuals' and rheumatoid arthritis patients' peripheral blood neutrophils by the gelatin and Ficoll-Hypaque methods: Comparative efficiency and impact on the neutrophil oxidative metabolism and Fcγ receptor expression. **Journal of Immunological Methods**, v. 412, p. 70–77, 1 out. 2014.

PAVELKOVA, M.; KUBALA, L. Luminol-, isoluminol- and lucigenin-enhanced chemiluminescence of rat blood phagocytes stimulated with different activators. **Luminescence**, v. 19, n. 1, p. 37–42, jan. 2004.

PEREIRA-CROTT, L. S. et al. Bothrops moojeni venom and BmooLAAO-I downmodulate CXCL8/IL-8 and CCL2/MCP-1 production and oxidative burst response, and upregulate CD11b expression in human neutrophils. **International Immunopharmacology**, v. 80, 1 mar. 2020.

PORSE, H.; RUDOLPH, B. **The seaweed hydrocolloid industry: 2016 updates, requirements, and outlook.** Journal of Applied Phycology. **Anais...**Springer Netherlands, 1 out. 2017.

POST, E. et al. **ENVIRONMENTAL SCIENCES** The polar regions in a **2°C warmer world****Sci. Adv.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://data.>>.

RATEB, M. E.; ABDELMOHSEN, U. R. marine drugs Editorial Bioactive Natural Products from the Red Sea. 2021.

RENNÉ, T.; STAVROU, E. X. **Roles of factor XII in innate immunity.** **Frontiers in Immunology**Frontiers Media S.A., , 2019.

RUBENICH, D. S. et al. Neutrophils: fast and furious-the nucleotide pathway. [s.d.].

SALVATI, A.M.; TENTORI, L. **Detemination of aberranthemoglobin derivatives in human blood.** Methods Enzymol. 76,717-720

SASAKI, Y.; YOSHIKUNI, Y. Metabolic engineering for valorization of macroalgae biomass. **Metabolic Engineering**, v. 71, p. 42–61, 1 maio 2022.

SHINDE, P.; BANERJEE, P.; MANDHARE, A. **Marine natural products as source of new drugs: a patent review (2015–2018).** **Expert Opinion on Therapeutic Patents**Taylor and Francis Ltd, , 3 abr. 2019.

SIDDIQUI, T. et al. Reactive oxygen species and anti-proteinases. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v. 122, n. 1, p. 1–7, 1 jan. 2016.

SIGALA, P. A. et al. Deconvoluting heme biosynthesis to target blood-stage malaria parasites. **eLife**, v. 4, n. JULY2015, 14 jul. 2015.

SINGHAL, A.; KUMAR, S. **Neutrophil and remnant clearance in immunity and inflammation.** **Immunology**John Wiley and Sons Inc, , 1 jan. 2022.

SKROPETA, D.; WEI, L. **Recent advances in deep-sea natural products.** **Natural Product Reports**Royal Society of Chemistry, , 2014.

SONG, C. et al. **Marine Natural Products: The Important Resource of Biological Insecticide. Chemistry and Biodiversity** John Wiley and Sons Inc, , 1 maio 2021.

STAPELS, D. A. C.; GEISBRECHT, B. V.; ROOIJAKKERS, S. H. M. **Neutrophil serine proteases in antibacterial defense. Current Opinion in Microbiology** Elsevier Ltd, , 1 fev. 2015.

STOSCHECK, C. M. **50 GENERAL METHODS FOR HANDLING PROTEINS AND ENZYMES [6] [6] Quantitation of Protein.** [s.l: s.n.].

STROBER, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. **Current Protocols in Immunology**, v. 111, n. 1, p. A3.B.1-A3.B.3, 1 nov. 2015.

SURYANARAYANAN, T. S. Fungal endosymbionts of seaweeds. **Progress in molecular and subcellular biology**, v. 53, p. 53–69, 2012.

THIEBLEMONT, N. et al. **Human neutrophils in auto-immunity. Seminars in Immunology** Academic Press, , 1 abr. 2016.

TOLLER-KAWAHISA, J. E. et al. The variant of CD11b, rs1143679 within ITGAM, is associated with systemic lupus erythematosus and clinical manifestations in Brazilian patients. **Human Immunology**, v. 75, n. 2, p. 119–123, fev. 2014.

TOLLER-KAWAHISA, J. E. et al. Systemic lupus erythematosus onset in lupus-prone B6.MRL/lpr mice is influenced by weight gain and is preceded by an increase in neutrophil oxidative burst activity. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 86, p. 362–373, 27 jul. 2015.

VALKO, M. et al. **Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, 2007.

VAN REES, D. J. et al. **Immunoreceptors on neutrophils. Seminars in Immunology** Academic Press, , 1 abr. 2016.



VIES, A.-D. **COMPLEMENT, IMMUNE COMPLEXES AND SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS**\**British Journal of Rheumatology*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://rheumatology.oxfordjournals.org/>>.

VIGATO-FERREIRA, I. C. C. et al. FcγRIIIa and FcγRIIIb polymorphisms and associations with clinical manifestations in systemic lupus erythematosus patients. *Autoimmunity*, v. 47, n. 7, p. 451–458, 1 nov. 2014.

WANG, J. **Neutrophils in tissue injury and repair**. *Cell and Tissue Research* Springer Verlag, , 1 mar. 2018.

WANG, L.; LUQMANI, R.; UDALOVA, I. A. **The role of neutrophils in rheumatic disease-associated vascular inflammation**. *Nature Reviews Rheumatology* Nature Research, , 1 mar. 2022.

WANG, T.; JÓNSDÓTTIR, R.; ÓLAFSDÓTTIR, G. Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food Chemistry*, v. 116, n. 1, p. 240–248, 1 set. 2009.

WIENCKE, C., CLAYTON, M. **Antarctic seaweeds**. A.R.G Gantener Verlag, 2002.

ZHONG, Q. et al. **The antioxidant activity of polysaccharides derived from marine organisms: An overview**. *Marine Drugs* MDPI AG, , 2019.

ZUCCARO, A. et al. Detection and identification of fungi intimately associated with the brown seaweed *Fucus serratus*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 74, n. 4, p. 931–941, fev. 2008.

ZUCCONI, L. et al. **Extracellular enzymes and bioactive compounds from antarctic terrestrial fungi for bioprospecting**. *International Journal of Environmental Research and Public Health* MDPI AG, , 2 set. 2020.

