



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

EDFRANCK DE SOUSA OLIVEIRA VANDERLEI

**ATIVIDADES ANTIVIRAL E ANTI-INFLAMATÓRIA DE UMA FRAÇÃO
POLISSACARÍDICA SULFATADA DA ALGA MARINHA VERMELHA *Gracilaria*
birdiae (Plastino e Oliveira)**

**Fortaleza-CE
2012**

EDFRANCK DE SOUSA OLIVEIRA VANDERLEI

ATIVIDADES ANTIVIRAL E ANTI-INFLAMATÓRIA DE UMA FRAÇÃO
POLISSACARÍDICA SULFATADA DA ALGA MARINHA VERMELHA *Gracilaria birdiae*
(Plastino e Oliveira)

**Tese apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Bioquímica da Universidade
Federal do Ceará como parte dos requisitos
para obtenção do título de Doutor em
Bioquímica. Área de concentração:
Bioquímica Vegetal.**

Orientadora: Prof. Dra. Norma Maria Barros
Benevides

FORTALEZA – CE

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- V315a Vanderlei, Edfranck de Sousa Oliveira.
Atividades antiviral e anti-inflamatória de uma fração polissacarídica sulfatada da alga marinha vermelha *Gracilaria birdiae* (Plastino e Oliveira) / Edfranck de Sousa Oliveira Vanderlei - 2012.
141 f. : il., colr., enc. ; 30 cm.
- Tese (doutorado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciência, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2012.
Área de Concentração: Bioquímica Vegetal.
Orientação: Profa. Dra. Norma Maria Barros Benevides.
1. Virologia. 2. Inflamação. 3. Toxicidade. I. Título.

CDD 574-192

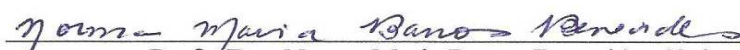
EDFRANCK DE SOUSA OLIVEIRA VANDERLEI

ATIVIDADES ANTIVIRAL E ANTI-INFLAMATÓRIA DE UMA FRAÇÃO
POLISSACARÍDICA SULFATADA DA ALGA MARINHA VERMELHA *Gracilaria birdiae*
(Plastino e Oliveira)

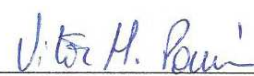
Aprovada em: 18/09/2012

**Tese apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Bioquímica da Universidade
Federal do Ceará como parte dos requisitos
para obtenção do título de Doutor em
Bioquímica. Área de concentração:
Bioquímica Vegetal.**

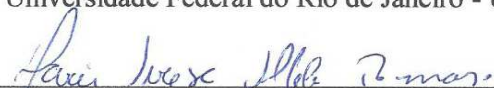
BANCA EXAMINADORA



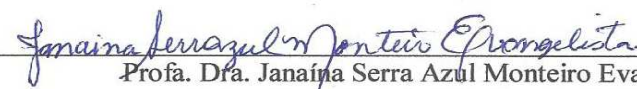
Prof. Dra. Norma Maria Barros Benevides (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará – UFC



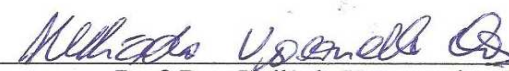
Prof. Dr. Vítor Hugo Pomin
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ



Prof. Dra. Maria Teresa Villela Romanos
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ



Prof. Dra. Janaína Serra Azul Monteiro Evangelista
Universidade Estadual do Ceará – UECE



Prof. Dra. Heliáda Vasconcelos Chaves
Universidade Federal do Ceará – UFC - Campus Sobral

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, pelas oportunidades, por todos os momentos maravilhosos que tenho obtido na minha jornada e, principalmente, por me dar paz e força interior para superar as dificuldades, mostrar o caminho nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

À Profa. Dra. Norma Maria Barros Benevides, minha orientadora, a quem sou eternamente grato por ter me aceitado e dado a oportunidade de poder trabalhar no Laboratório de Carboidratos e Lectinas (CarboLec) da UFC, além de ter sido indispensável para meu crescimento e para minha formação pessoal e científica.

À Profa. Dra. Mirna Marques Bezerra, da Faculdade de Medicina – Campus Sobral/UFC, pela atenção durante o período que estive no Laboratório de Farmacologia – Campus Sobral/UFC, pelo apoio e orientação na realização dos ensaios farmacológicos e a importante contribuição na minha formação profissional.

À Profa. Hellíada Vasconcelos Chaves, da Faculdade de Odontologia – Campus Sobral/UFC, pela sua amizade, gentileza, companheirismo, ensinamentos e atenção oferecida a mim durante a realização desta tese e também do meu artigo.

Ao Prof. Antônio Alfredo Rodrigues e Silva, da Faculdade de Odontologia – Campus Sobral/UFC, pela amizade e participação em ensaios presentes neste trabalho.

À Profa. Dra. Maria Teresa Villela Romanos, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) por seu apoio, orientação e gentil recepção, ao disponibilizar a estrutura de seu laboratório durante a realização dos experimentos de virologia presentes neste trabalho e aceitar o convite de integrar a banca examinadora deste trabalho.

Às amigas do Laboratório de Virologia, Gabriella Mendes e Jéssica Cavalcanti pela ajuda imprescindível nos experimentos de virologia na Universidade Federal do Rio de Janeiro.

À Profa. Dra. Regina Célia Monteiro de Paula, do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC, por tornar possível a obtenção dos resultados de caracterização estrutural presente neste trabalho.

À Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro e sua estudante Roberta Jeane Bezerra Jorge do Departamento de Fisiologia, Farmacologia e Odontologia (UFC), pela contribuição durante as análises histológicas relacionadas aos ensaios de toxicidade.

Às Profs. Drs. Vítor Hugo Pomin e Janaína Serra Azul Monteiro Evangelista por terem gentilmente aceito o convite para integrar a banca examinadora, gerando importante contribuição para este trabalho.

Aos amigos e integrantes do laboratório de Carboidratos e Lectinas (Carbolec) da Universidade Federal do Ceará: Ianna Fernandes, José Ariévilo Rodrigues (Ari), Ana Luíza Quinderé, Bruno Fontes, Ismael Nilo, Gabriela de Paula (Gabi I), Luana Maria, Natássia Ribeiro, Ticiane Abreu (Tici I), Ticiane Lima (Tici II), Chistiane Coura (Cris), Ygor Raphael Eloy, Gardênia Prado Mendonça, Gabrielle de Freitas (Gabi II), Antônio Willame (Will), Joana Trycia, Jane de Fátima, Ricardo Basto, Antonio Neto e José Gerardo Carneiro (Zé) pela amizade, pelo ótimo convívio e pelo conhecimento que adquiri durante este período que participei desta família.

Em especial, agradeço o Ariévilo e o Ygor pelos conhecimentos transmitidos, dedicação e ajuda constante, Ana Luíza e Bruno, pela dedicação, amizade e apoio durante os experimentos.

Ao meu grande amor, Ianna, pelo seu apoio, dedicação integral, pela troca de conhecimentos, por me tornar uma pessoa mais feliz dentro e fora do laboratório e por me dar forças para trilhar um caminho de sucesso pessoal e profissional.

Aos meus pais, Severino Gomes Vanderlei Júnior (Bill) e Maria Amélia de Sousa Oliveira Vanderlei, que são meus maiores torcedores e lutam sempre do meu lado para a realização de todos os meus objetivos, desejos e sonhos.

Aos meus irmãos (Hermínia Adélia, Hyder e Helen), pelo apoio e carinho nos momentos felizes e difíceis durante a minha vida.

Aos amigos de doutorado do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, em especial, o amigo Elton Marques, pelo uso do condutivímetro no laboratório do Prof. Enéas Gomes.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), através do financiamento de projetos vinculados ao curso de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq), através do convênio com o curso de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia

Molecular da Universidade Federal do Ceará e auxílios de projetos e bolsas concedidas a esse Departamento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), através do convênio com o curso de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará e pela bolsa concedida.

À Universidade Federal do Ceará, através do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, que viabilizou a execução deste trabalho em seus laboratórios e que contribuíram para enriquecer o meu conhecimento científico.

RESUMO

Moléculas bioativas extraídas a partir de algas marinhas, tais como os polissacarídeos sulfatados, vêm se destacando como possuidores de diversas atividades biológicas. Este estudo teve como objetivo avaliar as atividades antiviral e anti-inflamatória de uma fração polissacarídica sulfatada da alga marinha *Gracilaria birdiae*. Os polissacarídeos sulfatados totais (PST) foram extraídos por digestão enzimática e em seguida, fracionados em coluna de DEAE-celulose, originando duas frações (FI- 0,5 M e FII- 0,75 M). A fração FI, de maior rendimento, foi objeto de estudo, sendo identificada como uma agarana por espectroscopia de infravermelho (FT-IR) e de elevada massa molecular (>100 KDa) por cromatografia de permeação em gel. A viabilidade celular da fração FI foi determinada por alteração da morfologia celular com posterior quantificação a 492 nm. As células foram tratadas com diluições seriadas de FI (1000 a 7,8 µg/mL) e em seguida, incorporado o corante vermelho neutro, com posterior leitura de absorbância. O grau de atividade antiviral foi expresso como percentagem de inibição viral. Os resultados mostraram que FI na concentração de 250 µg/mL não apresentou toxicidade em células C6/36, Vero e HEp-2 e apresentou um efeito antiviral significativo com inibição de 95,8% contra o HSV-1, de 94,4 % contra o HSV-2 em células Vero e de 89,2 % contra DENV-1 em células C6/36, quando comparado ao grupo controle. Em adição, FI (10 mg/kg) apresentou efeito anti-inflamatório quando administrada por via subcutânea (s.c.) em ratos Wistar no modelo de peritonite utilizando carragenina como agente flogístico ou no edema de pata induzido por carragenina ou dextrana. FI (10 mg/kg) provocou um efeito anti-inflamatório por uma diminuição no número de leucócitos na cavidade peritoneal, além de também reduzir o edema de pata induzido por carragenina na terceira hora, comprovado pela quantificação da mieloperoxidase e também o edema por dextrana nos primeiros trinta minutos. Para analisar o envolvimento da via heme oxigenase na atividade anti-inflamatória de FI, os animais foram pré-tratados por via s.c. com um inibidor específico do grupo heme (zinco protoporfirina IX). Depois de inibida por ZnPP IX, o efeito anti-inflamatório de FI no edema de pata induzido por carragenina não foi observado. Para avaliar os efeitos sistêmicos, FI (10 mg/kg) foi administrada por via intraperitoneal em camundongos em dose única. As alterações sistêmicas foram avaliadas durante 48 h ou por dose repetida, uma vez ao dia durante 14 dias, sendo que FI (10 mg/kg) não causou mortalidade ou alterações significativas nos parâmetros bioquímicos, hematológicos e histológicos, sendo considerada segura na dose testada.

Palavras-chave: polissacarídeos sulfatados, *Gracilaria birdiae*; virologia; inflamação, toxicidade.

ABSTRACT

Bioactive molecules extracted from seaweed, such as sulfated polysaccharides, have been highlighted as having diverse biological activities. This study aimed to evaluate the antiviral activity and anti-inflammatory effect of a sulfated polysaccharide from seaweed *Gracilaria birdiae*. Total sulfated polysaccharides (TSP) were extracted by enzymatic digestion and following fractionated on DEAE-cellulose column, obtaining two fractions (FI - 0.5 M and FII - 0.75 M). The FI fraction, which had the highest yield, was object of this study, has been identified as an agar by IR spectroscopy (FT-IR) and with a high molecular weight (>100KDa) by gel permeation chromatography. The cell viability of FI fraction was determined by the change of the cell morphology with further quantification at 492 nm. Cells were treated with serial dilutions of FI (1000 to 7.8 µg/mL) and then, neutral red dye was incorporated, with subsequent measurement of absorbance. The degree of antiviral activity was expressed as percent inhibition of the virus. The results showed that FI at a concentration of 250 µg/mL showed no toxicity on C6/36, Vero and HEp-2 cells and had a significant antiviral effect with inhibition of 95.8% against HSV-1, 94.4% against HSV-2 on Vero cells and 89.2% against DENV-1 on C6/36 cells, when compared to the control group. In addition, FI (10 mg /kg) presented anti-inflammatory effect when administered by subcutaneous route (s.c.) in Wistar rats in a model of peritonitis using carrageenan with a flogistic agent or in the paw edema using carrageenan or dextran. FI (10 mg/kg) induced an anti-inflammatory effect by a decrease in the leukocytes into the peritoneal cavity. FI also reduced the paw edema induced by carrageenan in the third hour compared by the mieloperoxidase quantification and also inhibited the paw edema induced by dextran on the first thirty minutes. To analyze the involvement of the heme oxygenase pathway on anti-inflammatory activity of FI, animals were pretreated by s.c. route with an specific inhibitor of heme group (zinc protoporphyrin IX). After inhibition by ZnPP IX, the anti-inflammatory effect of FI on carrageenan-induced paw edema has not been observed. To evaluate the systemic effects, FI (10 mg/kg) was administered by intraperitoneal route in mice in a single dose. The systemic changes were evaluated during 48 h or by repeated dose, once a day for 14 days. The results showed that, FI (10 mg/kg) did not cause mortality or significant changes in the biochemical, hematological and histopathological parameters, considered safe in the tested dose.

Key words: sulfated polysaccharides; *Gracilaria birdiae*; virology; inflammation, toxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Alga marinha vermelha <i>Gracilaria birdiae</i> em zona de cultivo	22
Figura 2 - Estruturas químicas básicas repetitivas de carragenanas com unidades D-alternantes	27
Figura 3 – Estrutura química básica repetitiva de agaranas com unidades D- e L-alternantes	29
Figura 4 – Efeito citopático em células Vero infectadas com vírus herpes tipo 1	33
Figura 5 – Esquema representativo da entrada do HSV na célula hospedeira	38
Figura 6 – Esquema representativo da montagem do nucleocapsídeo viral	39
Figura 7 – Esquema representativo da liberação das partículas virais de HSV da célula hospedeira	40
Figura 8 – Esquema representativo do ciclo de vida do flavivírus na célula hospedeira	42
Figura 9 - Migração de leucócitos através do endotélio vascular	49
Figura 10 - Via do catabolismo da heme oxigenase	53
Figura 11 – Aspecto macroscópico da alga marinha vermelha <i>Gracilaria birdiae</i> e sua classificação taxonômica	66
Figura 12 – Fluxograma de obtenção dos PST da alga marinha vermelha <i>Gracilaria birdiae</i>	70

Figura 13 – Fracionamento por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose	82
Figura 14 – Eletroforese em gel de agarose 0,5 % dos polissacarídeos sulfatados totais (PST) e suas frações F I (0,5 M) e F II (0,75 M) presentes no gel, reveladas com 0,1 % de azul de toluidina	83
Figura 15 – Espectros de IV da fração F I (0,5 M) obtida por cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose) de <i>G.birdiae</i>	87
Figura 16 – Espectros de IV da fração F II (0,75 M) obtida por cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose) de <i>G.birdiae</i>	88
Figura 17 - Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) em solução de NaNO ₃ 0,1 M das frações (FI e F II) de <i>G.birdiae</i>	90
Figura 18 - Fotomicrografia das células hospedeiras	92
Figura 19 – Efeito da fração FI na migração de leucócitos induzidas por carragenina (Cg) em ratos	101
Figura 20 – Efeito da fração FI no edema de pata induzidos por carragenina em ratos	104
Figura 21 – Dosagem da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) realizada no sobrenadante do homogenato do tecido da pata	105
Figura 22 – Efeito da fração FI no edema de pata induzidos por dextrana em ratos	107
Figura 23 – Envolvimento da via da heme oxigenase (HO-1) no mecanismo de ação da fração FI	109

Figura 24 – Fotomicrografias de luz dos órgãos coração, fígado e rim dos animais após o tratamento com a fração FI (10 mg/kg) após 14 dias	116
Figura 25 - Fotomicrografias de luz de fígado e rim de camundongo Swiss após administração i.p. da fração FI (10 mg/kg) após 14 dias	117
Figura 26 – Fotomicrografias de luz dos órgãos baço, timo e linfonodos dos animais após o tratamento com a fração FI (10 mg/kg) após 14 dias	118
Figura 27 – Fotomicrografias de luz do baço de camundongo Swiss após administração i.p. da fração FI (10 mg/kg) após 14 dias	119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Rendimento e composição química dos polissacarídeos sulfatados da alga <i>Gracilaria birdiae</i>	85
Tabela 2 – Principais sinais característicos de agaranas no infravermelho por espectroscopia transformada de Fourier	86
Tabela 3 – Viabilidade celular da fração FI em diferentes concentrações nas células LLC-MK2	93
Tabela 4 – Viabilidade celular da fração FI em diferentes concentrações nas células Vero, HEp- 2 e C6/36	93
Tabela 5 – Atividade antiviral da fração F I contra o vírus do herpes (HSV-1 e HSV-2) em células Vero	96
Tabela 6 – Curva dose-resposta de Inibição Viral da fração F I contra DENV-1 em células C6/36	97
Tabela 7 – Atividade antiviral da fração F I contra DENV-1 em células C6/36	97
Tabela 8 – Massa corporal e peso dos órgãos da fração F I em camundongos	113
Tabela 9 – Parâmetros bioquímicos da fração F I em camundongos	114
Tabela 10 – Parâmetros hematológicos da fração F I em camundongos	115

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT	5-hidroxitriptamina
AINEs	anti-inflamatórios não-esteroidais
AH	ácido hialurônico
BK	bradicinina
BVD	biliverdina
BVR	biliverdina redutase
Cg	carragenina
CHCM	concentração hemoglobínica corpuscular média
CMNT	concentração máxima não tóxica
COX	ciclooxigenase
DNA	ácido desoxirribonucleico
DEAE	dietilaminoetil celulose
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EDTA	ácido etilenoaminotetracético
E.P.M.	erro padrão da média
F I	fração polissacarídica sulfatada eluída com 0,5 M de NaCl
F II	fração polissacarídica sulfatada eluída com 0,75 M de NaCl
DC	dengue clássica
DENV	vírus da dengue
FT-IR	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
FHD	febre hemorrágica da dengue
GAGs	glicosaminoglicanos
GPC	cromatografia de Permeação em Gel
GTP	guanosina trifosfato
HGB	hemoglobina
HCT	hematócrito
HCM	hemoglobina corpuscular média
HTAB	brometo de hexadecil-trimetil-amônio
HIV	vírus da imunodeficiência adquirida
HO-1	heme-oxigenase 1

HPLC	cromatografia líquida de alta performance
IL-6	interleucina 6
IL-8	interleucina 8
IL-1 β	interleucina 1-beta
IL-1 β	interleucina 1-beta
i.pl.	intra-plantar
i.p.	intraperitoneal
IRA	insuficiência respiratória aguda
i.v.	intravenosa
IUPAC	União Internacional de Química pura e aplicada
Leitor de ELISA	espectrofotômetro de microplaca
KBr	brometo de potássio
mmol	milimolar
Mono Q –FPLC	cromatografia líquida de troca iônica
MPO	mieloperoxidase
Mw	peso molecular
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na forma reduzida
NaNO ₃	nitrito de sódio
NF-kB	fator nuclear kappa B
nm	nanômetro
NO	óxido nítrico
iNOS	óxido nítrico sintase induzida
PAF	fator de ativação plaquetária
PAFR	receptor do fator de ativação plaquetária
PGD ₂	prostaglandina D ₂
PGE ₂	prostaglandina E ₂
PGI ₂	prostaciclina
pH	potencial hidrogeniônico
PST	polissacarídeos sulfatados totais
OMS	Organização Mundial da Saúde

s.c.	subcutânea
Receptor FC	Fragmento cristalizável da célula ligado ao anticorpo
rpm	rotações por minuto
RPMI	Meio de cultura de tecido animal desidratado
RMN	Ressonância magnética nuclear
RNA	ácido ribonucleico
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
SCD	Síndrome do choque da dengue
TGO	Transaminase glutâmico-oxalacética
TGP	Transaminase glutâmico-pirúvica
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
TT	tempo de protrombina
TTPa	tempo de tromboplastina parcial ativada
TX	tromboxanos
VCM	volume corpuscular médio
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular
ZnPP IX	zinco protoporfirina IX

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1. Algas	20
1.1.1. Gênero <i>Gracilaria</i>	21
1.2. Polissacarídeos Sulfatados	23
1.2.1. Polissacarídeos sulfatados de algas verdes	24
1.2.2. Polissacarídeos sulfatados de algas pardas	25
1.2.3. Polissacarídeos sulfatados de algas vermelhas	26
<i>1.2.3.1. Carragenanas</i>	26
<i>1.2.3.2. Agaranas</i>	28
1.3. Atividades biológicas de Polissacarídeos Sulfatados de algas marinhas	29
1.4. Virologia	32
1.4.1. Adenovírus	35
1.4.2. Herpes	37
1.4.3. Dengue	41
1.5. Inflamação	45
1.5.1. Eventos vasculares	46
1.5.2. Eventos celulares	48
1.5.3. Via da Heme oxigenase	51
1.5.4. Agentes inflamatórios	56
1.5.5. Fármacos utilizados no controle da inflamação	57
1.6. Parâmetros toxicológicos	58
1.6.1. Parâmetros Hematológicos	58
1.6.2. Parâmetros Bioquímicos	60
1.6.2.1. Transaminase Glutâmico-Oxaloacética e Pirúvica (TGO e TGP)	60
1.6.2.2. Fosfatase alcalina	61
1.6.2.3. Uréia	61
1.6.2.4. Creatinina	62
1.6.3. Histologia	62

2. OBJETIVOS	65
2.1. Geral	65
2.2. Específicos	65
3. MATERIAIS	66
3.1. Alga marinha	66
3.2. Animais	67
3.3. Células e vírus	67
3.4. Material testado	68
4. MÉTODOS	68
4.1. Extração dos polissacarídeos totais	68
4.2. Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose	69
4.3. Eletroforese em gel de agarose	71
4.4. Determinação do teor de carboidratos totais, proteínas e sulfato	71
4.5. Espectroscopia de absorção por infravermelho	71
4.6. Cromatografia de permeação em gel (GPC)	71
4.7. Atividade antiviral	72
4.7.1. Toxicidade da fração polissacarídica para cultura de células	72
4.7.1.1. Verificação da morfologia celular	72
4.7.1.2. Viabilidade celular	73
4.7.2. Atividade antiviral <i>in vitro</i>	73
4.8. Atividade anti-inflamatória	74
4.8.1. Ensaio de migração celular induzida por Carragenina (Cg)	74
4.8.2. Edema de pata induzido por Carragenina (Cg)	75
4.8.3. Avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO)	75
4.8.4. Edema de pata induzido por Dextrana	75
4.8.5. Envolvimento da via HO-1 na atividade anti-inflamatória	76
4.9. Avaliação sistêmica	76
4.9.1. Parâmetros hematológicos	76
4.9.2. Parâmetros bioquímicos	77
4.9.3. Análise histológica	79
4.10. Análise estatística	79

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	80
5.1. Rendimento dos Polissacarídeos Sulfatados Totais	80
5.2. Cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose)	80
5.3. Eletroforese em gel de agarose	81
5.4. Determinação do teor de carboidratos totais, proteínas e sulfato	83
5.5. Espectro de absorção na região do infravermelho	85
5.6. Cromatografia de permeação em gel (GPC)	89
5.7. Atividade antiviral de F I da alga marinha <i>Gracilaria birdiae</i>	91
5.7.1. Citotoxicidade e viabilidade celular	91
5.7.2. Atividade antiviral contra adenovírus	94
5.7.3. Atividade antiviral contra o herpes (HSV)	94
5.7.4. Atividade antiviral de FI contra o vírus da dengue (DENV-1)	96
5.8. Atividade anti-inflamatória da alga marinha <i>G.birdiae</i>	100
5.8.1. Migração celular induzida por carragenina	100
5.8.2. Edema de pata induzido por carragenina e atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)	103
5.8.3. Edema de pata induzido por dextrana	106
5.8.4. Análise do envolvimento da via HO-1 na atividade anti-inflamatória da fração F I	109
5.9. Avaliação sistêmica de F I	110
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	120
7. CONCLUSÃO	120
REFERÊNCIAS	121
ANEXOS	140

1. INTRODUÇÃO

1.1. Algas

As algas representam um grupo diversificado de organismos fotossintetizantes, que podem ser encontrados em ambientes aquáticos e terrestres úmidos, podendo assumir estilos de vida na forma de seres planctônicos (microalgas) e bentônicos (macroalgas) (SZE, 1997). A classificação desses organismos está sobre constante revisão à medida que mais evidências genéticas e de ultra-estruturas são acumuladas (BARSANTI, GUALTIERI, 2006).

As macroalgas marinhas estão classificadas, de acordo com a composição e quantidade de pigmentos acessórios e de proteção que absorvem a clorofila, em 3 filos principais: Chlorophyta (algas verdes), Phaeophyta (algas pardas) e Rhodophyta (algas vermelhas) (VIDOTTI, ROLLEMBERG, 2004; BARSANTI, GUALTIERI, 2006).

A investigação de muitos de seus metabólitos (polissacarídeos, lectinas, lipídios, carotenóides etc) tem despertado o interesse crescente nestes organismos, uma vez que as algas são organismos promissores para a síntese de novas substâncias biologicamente ativas e de compostos essenciais para a nutrição humana (CARDOZO *et al.*, 2007).

Portanto, uma oferta crescente de extratos de algas, de frações ou compostos puros para o setor econômico torna-se necessária para obtenção de novos biopolímeros pelo homem para diversas aplicações na Biotecnologia (DOS SANTOS *et al.*, 2005).

Muitas espécies de algas vêm sendo usadas na indústria principalmente para extração de ficocolóides (alginatos, carragenanas e ágar) e como fonte de substâncias farmacêuticas, na forma de ervas medicinais, fertilizantes, fungicidas, herbicidas e também para uso na alimentação (GRESSLER *et al.* 2010).

A utilização de algas iniciou-se a partir de coletas realizadas em bancos naturais para utilização na alimentação, existindo desde então, um crescente interesse no cultivo de espécies, no intuito de minimizar a dependência de bancos naturais (OLIVEIRA, ALVEAL, ANDERSON, 2000).

Para se implementar o cultivo em uma escala comercial, vários estudos são necessários para estabelecer um fácil gerenciamento do método de cultivo, com uma relação custo-benefício satisfatória. Para isso, é necessário que se tenha o conhecimento da ecologia, fisiologia e

produtividade das espécies de interesse econômico. Tal conhecimento permite a implementação de fazendas produtivas, gerando fontes alternativas de renda para populações costeiras tropicais, que geralmente dependem exclusivamente da pesca artesanal como seu meio de subsistência (BEZERRA, MARINHO-SORIANO, 2010).

No tocante à exploração de espécimes com fins comerciais, essa atividade vem correspondendo significativamente com a coleta de algas vermelhas do gênero *Gracilaria* e *Hypnea* no litoral nordestino, com as principais coletas realizadas na costa, entre os estados do Ceará e da Paraíba (VIDOTTI, ROLLEMBERG, 2004).

1.1.1. O gênero *Gracilaria*

As algas marinhas vermelhas do gênero *Gracilaria* apresentam talo cilíndrico ou achatado, filamentosos ou pseudoparenquimatosos, com comprimento podendo variar entre 0,1 a 5,0 metros (GUIMARÃES, PLASTINO, OLIVEIRA, 1999).

A maior parte das espécies ocorre nos mares tropicais e temperados, distribuindo-se desde a linha do equador até altas latitudes, mas também são encontradas em zona entre-marés até o infralitoral raso. São comuns em locais protegidos do batimento de ondulações, suportam a exposição ao ar por curtos períodos de tempo e possuem alta tolerância a variações das condições ambientais, como salinidade, temperatura e circulação de água, devendo ser consideradas fundamentais quando trabalhadas em ambientes de cultivo (OLIVEIRA, PLASTINO, 1994; COURA, 2011).

Tradicionalmente, o cultivo é realizado através de propagação vegetativa em estruturas chamadas *long-line*, sendo este modelo constituído por uma corda principal onde são penduradas cordas secundárias. Para a sua instalação no mar, as extremidades são fixadas através de blocos de concreto para evitar ou minimizar danos durante o cultivo (CARVALHO-FILHO, 2004).

Por outro lado, alguns fatores dificultam a produção comercial de algas no mar, tais como a sazonalidade (GLENN *et al.*, 1999), herbivoria e a ocorrência de organismos incrustantes e/ou algas epífitas, resultando frequentemente em grandes variações de biomassa (MUÑOZ, FREILE-PELEGRIN, ROBLEDO, 2004). Além da biomassa das algas, a taxa de crescimento relativo também pode ser inibida pelo posicionamento das estruturas do cultivo próximas à costa, pela baixa profundidade e pela turbidez da água (ARAÚJO, RODRIGUES, 2011).

A espécie de alga *Gracilaria birdiae* foi primeiramente descrita por Plastino e Oliveira (2002) que a identificaram ao longo da Costa brasileira, do Estado do Ceará até o estado do Espírito Santo (Figura 1).

No estado do Ceará, esta espécie vem sendo cultivada desde 2001 ao longo da costa, em um projeto envolvendo a Universidade Federal do Ceará e uma ONG denominada de Instituto Terramar. Este último é um tipo de agronegócio com a participação local de cooperações produtivas (MACIEL *et al.*, 2008).

A alga é cultivada e comercializada pelos nativos do litoral, que são normalmente populações de pescadores, como uma forma de promover a inclusão social, já que é uma fonte de extração de ágar explorada a partir dos bancos naturais, que cresce na faixa entre 0,2 a 1,5 metros de profundidade. Por produzir uma biomassa considerável para a maricultura, é usada como referência de cultivo em escala comercial no Nordeste do Brasil (MACIEL *et al.*, 2008; MARINHO-SORIANO *et al.*, 2009; BEZERRA, MARINHO-SORIANO, 2010).

A coleta da alga marinha *Gracilaria birdiae* vem sendo realizada por extração manual ou através de mergulho livre para fins de exportação e também para processamento no próprio país, visando à produção de ágar (VIDOTTI, ROLLEMBERG, 2004), que é um ficocolóide de grande interesse para as indústrias de alimentos (MELO *et al.*, 2002; MACIEL *et al.*, 2008), farmacêutica e cosmética (ARMISEN, 1995), o que tem levado vários países a cultivar algas marinhas (DE BOER, 1981).



Figura 1: Alga marinha vermelha *Gracilaria birdiae* em zona de cultivo.

Fonte: Fotografia retirada por Beto Naseri, 2011.

1.2. Polissacarídeos Sulfatados

Os polissacarídeos sulfatados representam uma classe de macromoléculas polianiónicas complexas e heterogêneas formadas por unidades repetitivas de açúcares e carregadas negativamente devido à presença de grupos sulfatados. Embora também encontrados em gramíneas marinhas, que constituem um grupo de plantas vasculares presentes em ambientes marinhos (AQUINO *et al.*, 2005), esses polímeros são raramente encontrados em plantas terrestres ou de água doce (DANTAS-SANTOS *et al.*, 2012). No entanto, os polissacarídeos sulfatados são encontrados principalmente em algas marinhas (JIAO *et al.*, 2011) e no reino animal (MEDEIROS *et al.*, 2000).

Os glicosaminoglicanos (GAGs) são os polissacarídeos sulfatados de animais mais conhecidos. Eles são polissacarídeos polidispersos lineares compostos de unidades dissacarídicas alternativas, ligados por ligações glicosídicas, com a sulfatação ocorrendo em diferentes posições. Quase todos os GAGs estão distribuídos nos tecidos na forma de proteoglicanos, onde as cadeias desses polissacarídeos estão covalentemente ligadas a uma proteína (DREYFUSS *et al.*, 2009).

Os GAGs exibem uma variabilidade estrutural peculiar de acordo com o tecido e a espécie. Considerando a sua localização celular, diversidade estrutural e mudanças de expressão durante diferentes condições fisiológicas, tais como divisão celular, crescimento celular, adesão celular, migração celular, diferenciação celular, entre outras, levanta-se a hipótese de que os proteoglicanos e GAGs desempenham um papel específico nas interações celulares (DANTAS-SANTOS *et al.*, 2012).

Os GAGs de significância fisiológica são o ácido hialurônico (AH), que é destituído de grupamentos sulfato e os glicosaminoglicanos sulfatados, como o condroitim sulfato, queratan sulfato, o dermatam sulfato e o heparan sulfato (NELSON, COX, 2011) e a heparina, que é um agente terapêutico largamente explorado para prevenção e tratamento da trombose (BLOSSOM *et al.*, 2008).

O heparan sulfato é um GAG abundante na superfície de células de mamíferos, que tem uma capacidade de interação com um grande número de proteínas, incluindo fatores de crescimento e componentes da matriz extracelular, assim como várias enzimas e fatores presentes

no plasma, servindo como um receptor para muitos agentes microbianos, incluindo bactérias, parasitas e vírus (ROSTAND, ESKO, 1997; SPILLMANN, 2001; NELSON, COX, 2011).

Nas algas marinhas, os polissacarídeos sulfatados são encontrados na matriz extracelular da parede celular. Sua função fisiológica nestes organismos seria de formação da estrutura da parede celular e de proteção contra a desidratação que ocorre em maré baixa. Isso explicaria o maior teor de polissacarídeos sulfatados de algas no nível entre-marés (MICHEL *et al.*, 2010; DANTAS-SANTOS *et al.*, 2012).

As estruturas dos polissacarídeos sulfatados dependem das classes de algas dos filos Rhodophyta, Phaeophyta e Chlorophyta. Os polissacarídeos sulfatados mais conhecidos nas algas vermelhas são as galactanas sulfatadas, que são divididas em carragenanas e agaranas (USOV, 2011). As algas pardas compreendem homo e heteropolissacarídeos contendo α -L-fucose sulfatada denominadas fucanas e fucoïdanas, respectivamente (COSTA *et al.*, 2011). Em algas verdes, geralmente são encontrados heteropolissacarídeos contendo xilose, galactose, arabinose, ácido glucurônico, manose ou glucose. No entanto, existe uma predominância de um monossacarídeo, em detrimento de outros em várias ordens de algas (CIANCIA, QUINTANA, CEREZO, 2010).

A importância de se estudar a estrutura química dos polissacarídeos isolados de macroalgas marinhas está em se correlacionar detalhes estruturais com propriedades físico-químicas ou atividades biológicas apresentadas pelos mesmos (USOV, BILAN, 2009).

1.2.1. Polissacarídeos sulfatados de algas verdes

Representam o grupo mais diversificado dessas moléculas. São heteropolissacarídeos aniônicos não repetitivos, apresentando-se, geralmente, bastante ramificados, complexos e constituídos de unidades de monossacarídeos ou dissacarídeos contendo unidades de xilose, galactose, arabinose, ácido glucurônico, manose ou glucose (PERCIVAL, McDOWELL, 1967; CIANCIA, QUINTANA, CEREZO, 2010).

Ainda são poucos os estudos sobre os heteropolissacarídeos presentes nas algas verdes, sendo estes geralmente ricos em sulfato e de variável peso molecular. Entretanto, trabalhos já reportam estruturas químicas de algumas espécies de algas verdes. Segundo Ray e Lahaye (1995), o polissacarídeo encontrado na alga marinha *Ulva rigida* é constituído de ramnose 3-*O*-sulfato ligada à resíduos de xilose parcialmente sulfatados em 2-*O* e 1,4-ligadas. Resíduos de

ácido glucurônico e de ácido galacturônico também são encontrados na estrutura química. Há referências quanto à presença de piruvatos em polissacarídeos de algumas espécies de algas verdes, como a *Codium yezoense* (BILAN *et al.*, 2007), contribuindo assim para a natureza altamente complexa e heterogênea dessas moléculas.

1.2.2. Polissacarídeos sulfatados de algas pardas

As fucoïdanas, que representam os polissacarídeos sulfatados de algas pardas, são ricas em α -L-fucopirranose, mas também estão presentes na sua composição outros monossacarídeos como galactose, manose, xilose, ácidos urônicos e grupos acetis (USOV, BILAN, 2009).

Estudos demonstram que as fucanas de algas pardas podem ser homofucanas (constituídas somente de fucose sulfatada) ou heterofucanas, quando constituídas de fucose e outros açúcares como xilose, glucose, galactose, manose e ácido urônico com sulfato em diferentes proporções (LEITE *et al.*, 1998).

Seu caráter altamente higroscópico protege as algas da desidratação, quando estas são expostas a longos períodos ao sol durante as marés baixas. Tal propriedade mucilagínosa contribui para tornar o organismo flexível para suportar as variações de marés e captar nutrientes (PERCIVAL, McDOWELL, 1967).

Segundo recomendações da IUPAC, são fucanas sulfatadas os polissacarídeos baseados principalmente em L-fucose com menos de 10% de outros monossacarídeos. Desta forma, este termo se aplica às fucanas sulfatadas obtidas de invertebrados marinhos, enquanto o termo fucoïdana refere-se a polissacarídeos mais complexos obtidos de algas (BERTEAU, MULLOY, 2003).

As fucoïdanas presentes nas algas pardas são usualmente polissacarídeos irregulares muito complexos (DUARTE *et al.*, 2001a; PONCE *et al.*, 2003). Sendo assim, apesar de em alguns casos existir certa regularidade no padrão de ligações glicosídicas, essa pode ser mascarada pelo padrão de sulfatação não regular apresentado por estas fucoïdanas (BILAN *et al.*, 2004).

Apesar dos numerosos estudos realizados, a estrutura química fina de grande parte das fucoïdanas permanece não esclarecida. Devido à grande complexidade apresentada por estes polímeros, as análises estruturais de fucanas nativas por métodos químicos, bem como por

espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), fornecem apenas informações parciais sobre suas estruturas (MULLOY, MOURÃO, GRAY, 2000). As fucoïdanas de *Sargassum stenophyllum*, descritas por Duarte *et al.* (2001a), podem ser citadas como um exemplo da complexidade da estrutura destes polissacarídeos.

1.2.3. Polissacarídeos sulfatados de algas vermelhas

Também denominadas galactanas sulfatadas, são polímeros de açúcares complexos e heterogêneos constituídos por unidades repetitivas alternadas de β (1 \rightarrow 3) D-galactopiranosose (unidade A) e α (1 \rightarrow 4) D- ou L- galactopiranosose (unidade B) dotados de radicais sulfato, os quais são componentes da matriz extracelular (PAINTER, 1983).

A classificação das galactanas segue a estereoquímica dessas moléculas, quando relacionada à unidade B. Quando a referida unidade pertence a série D-, sugere-se a ocorrência de carragenanas e quando pertencem a série L-, dita-se como agaranas (CAMPO *et al.*, 2009).

1.2.3.1. Carragenanas

As carragenanas são divididas em 6 formas básicas, identificadas por letras gregas, que são: Kappa (κ -), Iota (ι -), Lambda (λ -), Mu (μ -), Nu (ν -) e Theta (θ -), sendo esta nomenclatura relevante para a classificação química e para a produção comercial derivada de algas marinhas (CAMPO *et al.*, 2009). Cada família é subdividida em diferentes tipos e constituídas de unidades (1 \rightarrow 3)- β -D-galactopiranosose (unidade A) e (1 \rightarrow 4)- α -D-galactopiranosose (unidade B) (STEPHANIE *et al.*, 2010).

Segundo Campo *et al.* (2009), os três tipos de carragenanas mais importantes comercialmente são: Kappa (κ -), Iota (ι -) e Lambda (λ -), que diferem entre si de acordo com a quantidade e a posição dos grupos sulfato nas unidades A e B e ciclização da unidade B. A kappa-carragenana apresenta apenas um radical sulfato em sua estrutura, que é constituída por [(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopiranosose 4-sulfato- (1 \rightarrow 4) 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose éster sulfato]. A iota-carragenana apresenta na sua estrutura dois radicais sulfato [(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopiranosose 4-sulfato- (1 \rightarrow 4) 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose 2-sulfato] e a lambda-carragenana apresenta três radicais sulfato e apresenta-se na forma de [(1 \rightarrow 3)- β -D- galactopiranosose 2-sulfato- (1 \rightarrow 4) 3,6-

anidro- α -D-galactopiranosose 2,6-dissulfato]. Mu (μ)- e Nu (ν -) carragenanas são frequentemente encontradas nas formas comerciais, pois são precursoras da Kappa (κ -) e Iota (ι -) carragenanas respectivamente, que são formadas *in vivo* pela ação de uma sulfidrolase (Figura 2).

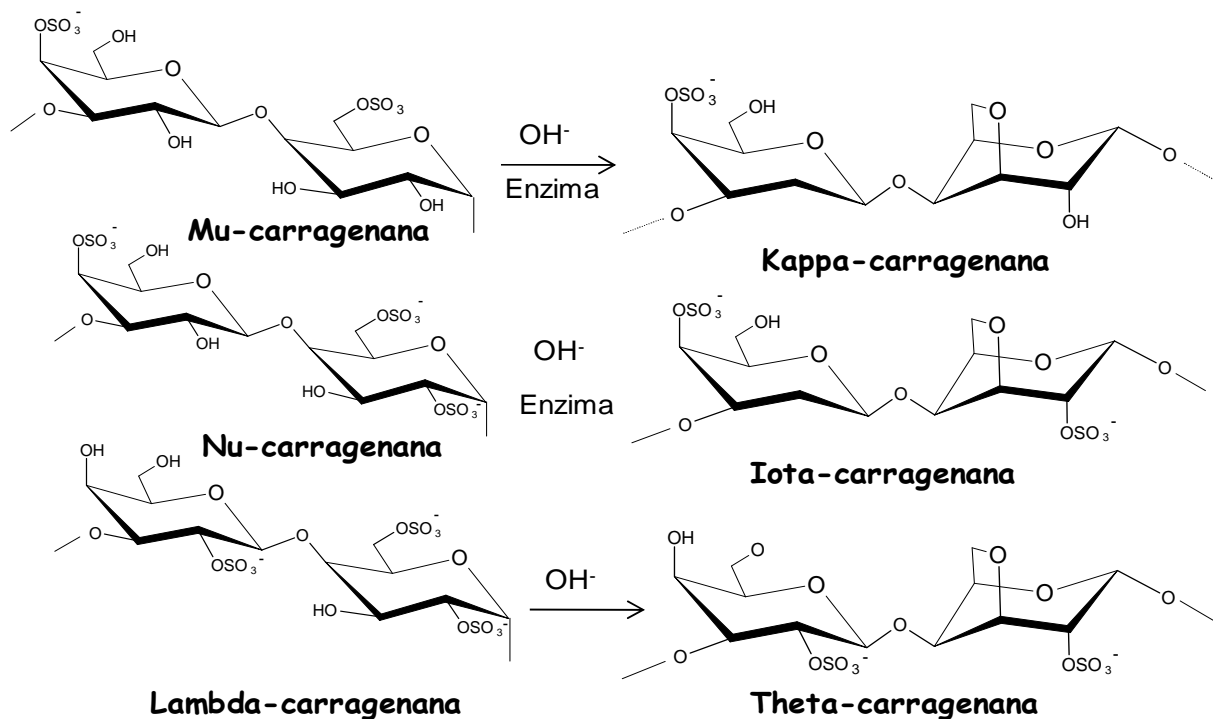


Figura 2: Estruturas químicas básicas repetitivas de carragenanas, com unidades D-alternantes.
 Fonte: Campo *et al.* (2009).

A indústria alimentícia responde por 70 a 80% da utilização mundial de carragenana, na qual 45% são direcionados para os produtos lácteos e cerca de 30% para derivados da carne. (McHUGH, 2003).

Considerando a diversidade das aplicações desses compostos, já existem relatos na literatura mostrando a eficiência das carragenanas na indução de inflamação crônica em modelos utilizando animais (MORRIS, 2003).

A solubilidade das carragenanas depende essencialmente da quantidade de grupos sulfato e sua associação aos cátions magnésio, cálcio, potássio, sódio, entre outros, que ocorrem em baixa frequência. Conseqüentemente, a proporção de grupos sulfato e o equilíbrio com cátions ionizáveis em solução aquosa, determinam a viscosidade e força do gel formado por esse

ficocolóide, representando, desta forma, as principais características exploradas pela indústria alimentícia e farmacêutica no uso das carragenanas (CAMPO *et al.*, 2009).

Enquanto as formas kappa e iota formam uma rede resultante de ligações cruzadas, com seus grupamentos sulfatos orientados para a parte externa, a carragenana do tipo lambda apresenta o grupo sulfato orientado para a parte interna, que evita esta ligação cruzada, que por consequência impede a gelificação desta carragenana, tornando-a mais solúvel (VAN DE VELDE *et al.*, 2002; CAMPO *et al.*, 2009).

1.2.3.2. Agaranas

As agaranas são polissacarídeos sulfatados extraídos da parede celular de uma série de de algas vermelhas, principalmente das famílias *Gelidiaceae* e *Gracilariaceae* (ARMISEN, GALACTAS, 1987).

As agaranas apresentam uma estrutura básica repetitiva, constituída por unidades alternantes de β -D-galactopiranosose (unidade A) e α -L-galactopiranosose (unidade B), diferindo, portanto, das carragenanas pela forma estereoquímica L- da unidade B (PAINTER, 1983).

De acordo com Stortz e Cerezo (2000), assim como nas carragenanas, a unidade B das agaranas pode estar na forma do seu derivado 3,6-anidrogactose, porém, a substituição por grupos sulfato, metil e pirúvico em suas estruturas difere do observado em carragenanas. A presença de unidades A piruvatadas (4,6-*O*-(1carboxietilideno)-D-galactopiranosose) e com grupos metil (6-*O*-metil-D-galactopiranosose) é frequente, bem como cadeias laterais de 4-*O*-metil-L-galactopiranosose e unidades B metiladas no carbono 2. A classificação das agaranas não é tão específica quanto a das carragenanas (Figura 3).

Normalmente, são utilizadas em diferentes setores industriais: na indústria de alimentos, como na fabricação de gelatinas e doces; na indústria farmacêutica, como laxantes, e agentes emulsificantes e estabilizadores de medicamentos; em pesquisas de laboratório como um meio de cultura e nas aplicações biotecnológicas em geral (McHUGH, 2003).

Géis de dextrana (Sephadex) e agarose (Sepharse) modificados quimicamente são utilizados em laboratórios em cromatografias de exclusão molecular e de troca iônica (DEAE-Sephadex; CM-celulose). Os géis de agarose estão entre os meios mais utilizados para eletroforese (NOSEDA, 1994).

A agarose é desprovida de sulfato e conseqüentemente, é a galactana com maior propriedade geleificante dentro do grupo das agaranas, já que a substituição das unidades de α -L-galactopiranosose-6-sulfato por unidades de anidro-galactose reduz consideravelmente a capacidade desses polímeros formarem gel, enquanto que a introdução de grupos metil, praticamente não influencia sobre tal propriedade (USOV, IVANOVA, SHASHKOV, 1983).

Dentre os principais países produtores de ágar estão o Chile, Espanha, Portugal, Coréia, França, Marrocos, Estados Unidos (EUA), México, Nova Zelândia e Japão, com uma produção de valor de cerca de 132 milhões de dólares por ano (DHARGALKAR; VERLECAR, 2009).

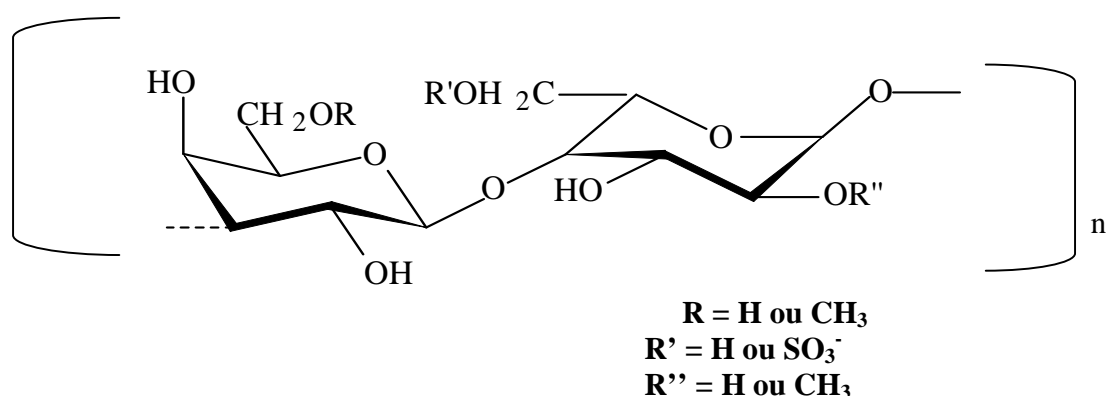


Figura 3. Estrutura básica repetitiva de agaranas, com unidades D- e L- alternantes.
 Fonte: Tischer, 2006.

1.3. Atividades Biológicas de Polissacarídeos Sulfatados de algas marinhas

Além de usos industriais, os polissacarídeos derivados de algas marinhas têm surgido nos últimos anos como uma fonte rica e importante de compostos naturais bioativos e por esta razão, a produção e as aplicações desses polissacarídeos como agentes terapêuticos têm sido cada vez mais temas de importantes pesquisas (PATEL, 2012).

A maioria das atividades biológicas de polissacarídeos derivados de algas marinhas vem sendo observadas em ensaios *in vitro*, tais como antiviral (TALARICO *et al.*, 2005), anticoagulante (RODRIGUES, FARIAS, 2009) antioxidante (ZHANG *et al.* 2003) e antitumoral (LINS *et al.*, 2009) ou em ensaios *in vivo* com animais, tais como anti-inflamatória (COURA *et al.*, 2012) antinociceptiva e pró-inflamatória (ARAÚJO *et al.*, 2011).

Mendes *et al.* (2011) avaliaram a atividade antiviral do extrato da alga marinha parda *Styopodium zonale* contra os metapneumovírus e os resultados mostraram que a porcentagem de inibição viral foi de 97,7 % na concentração de 12,5 µg/mL.

Bouhlal *et al.* (2011), demonstraram que os polissacarídeos sulfatados isolados de duas algas vermelhas *Sphaerococcus coronopifolius* e *Boergeseniella thuyoides* inibiram a replicação *in vitro* do vírus da imunodeficiência humana na concentração de 12,5 µg/mL, através da inibição da formação de sincícios.

A fucana sulfatada isolada a partir do extrato aquoso da alga parda *Stoechospermum marginatum* promoveu uma atividade antiviral significativa, que foi atribuída a presença do sulfato presente na fucana durante o período de adsorção do vírus herpes simples. Em adição, a referida fucana não apresentou atividade anticoagulante na mesma concentração que promoveu efeito antiviral, mostrando que não houve correlação entre as atividades antiviral e anticoagulante (ADHIKARI *et al.*, 2006).

Yoon *et al.* (2007) relataram que um polissacarídeo purificado em coluna Mono Q-FPLC da alga parda *Laminaria cichorioides* apresentou potente atividade anticoagulante estimado pelo ensaio do tempo tromboplastina parcial ativada (TTPa), cujo efeito é principalmente mediado pela inibição da trombina pelo cofator II da heparina.

Li *et al.* (2011) mostraram que o polissacarídeo sulfatado purificado por cromatografias de troca iônica e exclusão molecular da alga marinha verde *Monostroma latissimum*, de estrutura semelhante a de uma ramnose sulfatada, apresentou uma alta atividade anticoagulante pelos ensaios TTPa e pelo tempo de trombina (TT).

O polissacarídeo sulfatado purificado da alga marinha verde *Chlorella pyrenoidosa* apresentou atividade antitumoral contra células tumorais de pulmão humano (A549) *in vitro* de forma dose-dependente quando comparado ao controle (SHENG *et al.*, 2007).

Uma fração de polissacarídeos sulfatados de *Porphyra haitanesis* (Rhodophyta) obtidos por cromatografia de troca iônica apresentou um efeito inibitório sobre a peroxidação lipídica *in vitro* e um efeito antioxidante *in vivo*. Os autores sugeriram que esta fração polissacarídica (F2) pode ser utilizada para compensar o declínio da capacidade antioxidante total, pelo aumento da atividade de enzimas antioxidantes, que levam a uma redução dos riscos de peroxidação lipídica (ZHANG *et al.* 2003).

Mais recentemente, a atividade antioxidante das galactanas sulfatadas de *Gigartina skottsbergii* e *Schizymenia binderi*, da fucoídiana *Lessonia vadosa* e de uma carragenana comercial foram avaliadas pelo método da capacidade de absorção de radicais livres. A galactana da alga *S. binderi*, e a fucoídiana de *L. vadosa* apresentaram uma maior atividade antioxidante, quando comparadas à carragenana comercial (BARAHONA *et al.*, 2011).

Em modelos animais, estudos mostraram que os polissacarídeos sulfatados totais das algas vermelhas *Bryothamnion seaforthii* e *Bryothamnion triquetrum*, nas doses de 1 e 5 mg/kg, apresentaram um efeito antinociceptivo através do ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos. Os resultados mostraram que os polissacarídeos totais nas doses de 1 e 5 mg/kg, respectivamente, inibiram as contorções em 71 e 79 % (*B. triquetrum*) e em 46 e 69 % (*B. seaforthii*) (VIANA *et al.*, 2002).

Assreuy *et al.* (2008) avaliaram o efeito antinociceptivo de um polissacarídeo da alga marinha vermelha *Champia feldmannii*, isolado por cromatografia de troca iônica, utilizando o modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos. Os resultados demonstraram que o efeito variou com a dose utilizada. Entretanto, a utilização do mesmo polímero em ensaios de inflamação, não se traduziu em efeitos anti-inflamatórios, tendo em vista que foi observado um aumento da permeabilidade vascular nos modelos de edema de pata e de migração de neutrófilos na cavidade peritoneal em ratos.

Ananthi *et al.* (2010) avaliaram que o extrato polissacarídico da alga parda *Turbinaria ornata* apresentou atividade anti-inflamatória por reduzir o edema de pata induzido por carragenana de maneira significativa e dose-dependente em ratos. O polissacarídeo também ocasionou efeito inibitório na permeabilidade vascular em camundongos, além de prevenir o estresse oxidativo das células *in vitro*.

Araújo *et al.* (2011) estudaram os efeitos antinociceptivos e pró-inflamatórios de uma fração polissacarídica sulfatada da alga marinha vermelha *Solieria filiformis*, obtida por cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose. Os autores observaram que a referida fração exerceu efeitos antinociceptivo de ação periférica em camundongos e edematogênico em ratos, por ação de mediadores como prostaglandinas, óxido nítrico e citocinas (IL-1 e TNF- α) e não apresentou sinais visíveis de toxicidade *in vivo*.

Com relação ao gênero *Gracilaria*, diversos metabólitos, distribuídos por 19 espécies, vêm sendo utilizadas como fontes de produtos bioativos (ALMEIDA *et al.*, 2011), dentre eles,

destacam-se as propriedades anti-inflamatórias de constituintes da alga marinha *Gracilaria verrucosa* (DANG *et al.*, 2008)

Silva *et al.* (2011) avaliaram o efeito gastroprotetor em camundongos de um extrato polissacarídico sulfatado isolado da alga vermelha *Gracilaria caudata*. Os resultados demonstraram um efeito inibitório da lesão gástrica, com redução da peroxidação lipídica e ativação da via do óxido nítrico por abertura de canais de potássio (NO/K_{ATP}).

As propriedades antioxidantes dos polissacarídeos sulfatados totais da alga marinha *Gracilaria birdiae* foram avaliados através do método DPPH e os resultados mostraram que este polissacarídeo apresentou um efeito moderado na inibição da formação desses radicais e que o conteúdo de sulfato influenciou de forma significativa na expulsão do radical hidroxila (SOUZA *et al.*, 2012).

1.4. Virologia

A virologia estuda os vírus, que são elementos genéticos incapazes de replicarem-se independentemente de uma célula viva, denominada de célula hospedeira, ou seja, são parasitas intracelulares obrigatórios. Pelo fato de os vírus replicarem-se apenas em células vivas, seu cultivo requer o emprego de hospedeiros apropriados. Dentre os três tipos de hospedeiros virais (procariotos, plantas e animais), os vírus que infectam procariotos são mais facilmente cultivados em laboratório. Os vírus animais e de plantas em sua maioria podem ser cultivados em culturas de tecidos ou celulares, algo que tem facilitado as pesquisas sobre esses vírus. As culturas de células animais são derivadas de células retiradas de um órgão de um animal experimental (MADIGAN *et al.*, 2010).

A fina camada de células, que fica aderida a uma placa de Petri ou de plástico, é denominada monocamada, que é recoberta com meio de cultura adequado e incubada a uma temperatura adequada (MADIGAN *et al.*, 2010).

A cultura de células primárias é obtida pela dissociação de órgãos animais específicos tratados com tripsina ou colagenase. As células primárias podem ser dissociadas com tripsina, diluídas e mantidas para o crescimento em novas monocamadas (repicadas) tornando-se culturas de células secundárias. As células primárias renais de macaco (Vero) são excelentes para o

isolamento de vírus como o herpes simples (HSV), paramixovírus e enterovírus. Células diploides geralmente fibroblásticas permitem crescimento de vírus, como o HSV e os adenovírus. Células HEp-2, uma linhagem de células derivadas de câncer, é excelente para isolamento de vírus respiratório sincicial, adenovírus e HSV (MURRAY, ROSENTHAL, PFALLER, 2010).

Um vírus pode ser detectado inicialmente através da observação de efeitos citopáticos, caracterizados pelo aparecimento de células com dimensões variáveis, arredondadas, (Figura 4A), mais refringentes, algumas vezes separadas e ligadas umas às outras por prolongamentos citoplasmáticos (Figura 4B); regiões com essas mesmas características, mas com aspecto de cachos de uva, recebem o nome de foco de infecção, cujo foco se estende rapidamente pela superfície da célula (Figura 4C) e regiões citoplasmáticas expressas como formações policarióticas (sincícios e células gigantes) que levam a fusão dos citoplasmas de células adjacentes infectadas (Figura 4D) (MURRAY, ROSENTHAL, PFALLER, 2010).

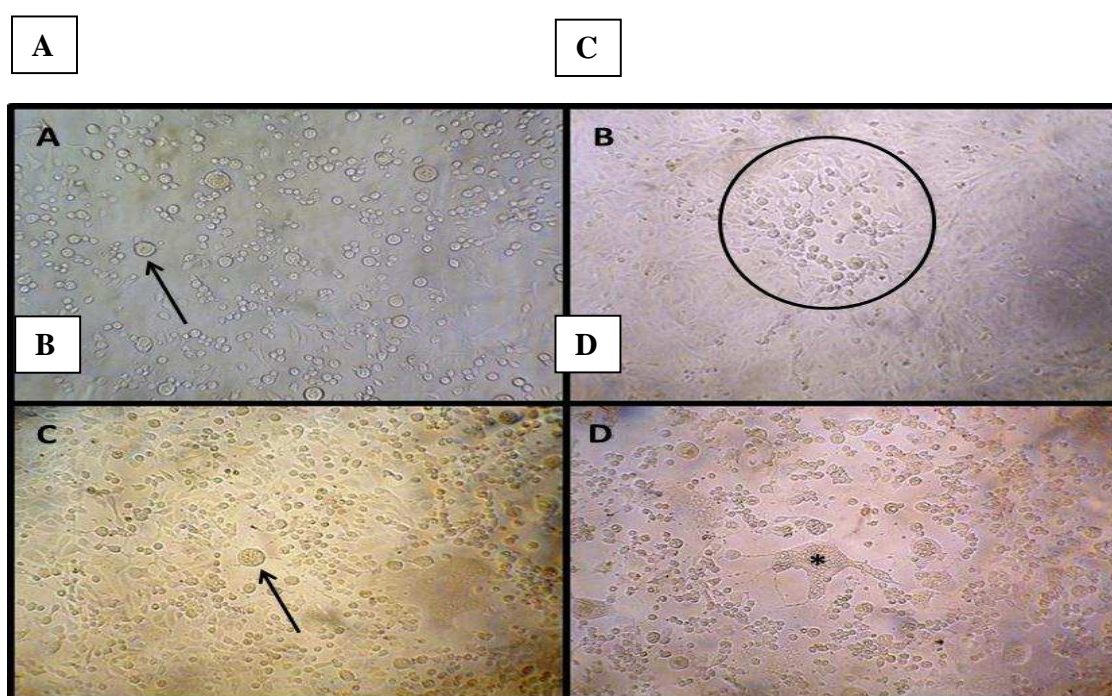


Figura 4: Efeito citopático em células Vero infectadas com vírus herpes tipo 1. (a) Células arredondadas desprendidas da monocamada; (b) Foco de infecção em monocamada de células; (c) Célula arredondada com tamanho superior ao das células normais; (d) Células sinciciais gigantes.

A determinação quantitativa viral é realizada através da dose infecciosa para cultura de tecido (TCID₅₀), que corresponde a uma titulação do vírus que provoca os efeitos citopatogênicos em metade das culturas de células. A concentração viral infecciosa pode também ser determinada pela contagem das placas virais formadas, sendo representada por unidades formadoras de placas (MURRAY, ROSENTHAL, PFALLER, 2010).

Para um vírus replicar-se, ele deve induzir uma célula hospedeira a sintetizar todos os componentes essenciais necessários a produção de novos vírus, divide-se em 5 etapas: adsorção, que consiste na ligação do vírus a célula hospedeira suscetível; internalização do vírus ou do seu ácido nucléico na célula; síntese de ácidos nucléicos e proteínas virais pelo metabolismo da célula de acordo com o redirecionamento determinado pelo vírus; maturação dos capsídeos e dos componentes de membrana e empacotamento do genoma viral em novos vírus e liberação das partículas maduras pela célula (MADIGAN *et al.*, 2010).

Segundo Madigan *et al.* (2010), uma vez que o hospedeiro foi infectado, novas cópias do genoma viral devem ser produzidas, assim como as proteínas virais devem ser sintetizadas para que o vírus se replique. A síntese dessas proteínas requer um RNA mensageiro (mRNA) viral. Pela classificação de Baltimore, são reconhecidas 7 classes de acordo com a estratégia de síntese de mRNA, conforme descritas a seguir:

- 1- DNA de fita dupla: o mecanismo de síntese do mRNA do vírus é o mesmo do genoma da célula hospedeira. Ex: HSV;
- 2- DNA de fita simples: antes de o mRNA do vírus ser produzido, uma fita complementar de DNA é sintetizada para atuar como molde para a RNA polimerase do vírus. Há formação de um intermediário de DNA de fita dupla durante a replicação, sendo esse intermediário usado na transcrição. Ex: Vírus da anemia de galinhas;
- 3- RNA de fita dupla: mesmo contendo RNA de fita positiva, ele é parte do genoma, portanto não tem como ser liberado para atuar como um mRNA. Assim, os virions dos vírus de RNA de fita dupla também contêm RNA polimerases que transcrevem o genoma de fita dupla, originando mRNA de fita positiva ao penetrarem na célula. Ex: Reovírus;
- 4- RNA de fita simples e positiva: é aquele que apresenta no seu genoma de RNA a mesma orientação do seu mRNA. Assim, o próprio genoma pode atuar como mRNA, que sintetiza

fitas RNA negativas complementares, que servirão de molde para novas fitas de RNA positivas. Ex: Poliomielite;

- 5- RNA de fita simples e negativa: é aquele que seu genoma de RNA é complementar a orientação do seu mRNA. Como o vírus tem a polaridade errada para atuar como mRNA, é preciso primeiramente sintetizar esse mRNA, que terá fita positiva e usada como molde para novas fitas negativas. Ex: Paramioxivírus;
- 6- RNA de fita simples envolvendo um intermediário de DNA: é o processo no qual a informação contida no RNA é convertida em DNA por ação da enzima transcriptase reversa. O DNA resultante é usado como molde para síntese de mRNA pelas enzimas celulares normais. Ex: Retrovírus;
- 7- DNA de fita dupla envolvendo um intermediário de RNA: O DNA resultante também é usado como molde para síntese de mRNA diferindo apenas que o genoma é apenas parcialmente de fita dupla e necessita portanto de RNA e transcriptase reversa. Ex: Vírus da hepatite B.

1.4.1. Adenovírus

Os adenovírus compreendem um importante grupo de vírus não envelopados de DNA de fita dupla que infectam animais. Os adenovírus foram primeiramente identificados em 1953. Desde então, foram identificados aproximadamente 100 sorotipos, sendo que pelo menos 51 infectam humanos (MURRAY, ROSENTHAL, PFALLER, 2010).

Os adenovírus humanos estão associados a diferentes doenças, em adultos e crianças, tais como infecções respiratórias, gastroentéricas, urinárias, oculares e doenças no sistema nervoso central, sendo transmitidos por contato direto, por via respiratória ou por via fecal-oral, através de água e alimentos contaminados. Alguns sorotipos de adenovírus possuem baixa patogenicidade, sendo associados a infecções assintomáticas (ADHIKARY *et al.* 2004; EBNER *et al.*, 2006; ERDMAN *et al.* 2002), enquanto que outros sorotipos podem estar relacionados a infecções generalizadas em pacientes imunocomprometidos, como transplantados (HIERHOLZER, 1992; ISON, 2006).

Os adenovírus representam 5 a 15 % dos vírus isolados de crianças menores de 2 anos de idade com insuficiência respiratória aguda (IRA) (MOURA *et al.*, 2007). Em recrutas jovens e adultos, as infecções respiratórias causadas por adenovírus começaram a ser controladas com a introdução de vacinas para os sorotipos 4 e 7, na década de 70, porém em 1996, a vacinação foi descontinuada e novos surtos de IRA em recrutas foram evidenciados. Para monitorar os efeitos da não vacinação, semanalmente, vigilantes acompanhavam os casos de IRA em campos de reclusão militar. Nos anos de 1997-1998, as infecções por adenovírus foram responsáveis por mais de 90 % das IRA, sendo isolados os sorotipos 3, 4, 7 e 21 (GRAY *et al.*, 2000).

Uma infecção causada por adenovírus resulta em uma rápida resposta imune e induzida. Esta resposta ocorre como resultado da interação do vírus com a célula infectada e parece não ser dependente da transcrição de algum gene viral. Inicialmente, a resposta desencadeada varia de acordo com o receptor e tipo de célula infectada, levando a uma complexa sinalização em cascata com diferentes respostas, como por exemplo, produção do fator de transcrição NF-κB e de interferon (RANDALL, GOODBOURN, 2008; RUSSELL, 2009). Muruve (2004) descreve que somente a interação do capsídeo viral com a célula hospedeira é suficiente para desencadear uma resposta inflamatória.

O ciclo infeccioso dos adenovírus é claramente dividido em duas fases: a primeira, chamada precoce, corresponde à entrada do vírus na célula hospedeira, que é seguida da passagem do genoma viral para o núcleo celular e da transcrição e expressão dos genes precoces. Estes eventos precoces modulam as funções celulares para facilitar a replicação do DNA viral e a transcrição e expressão dos genes tardios. Esta fase, em células permissivas, dura aproximadamente de 6-8 horas (RUSSELL, 2000).

O DNA adenoviral é replicado no núcleo e a transcrição precoce é realizada por uma RNA polimerase do hospedeiro. A replicação do genoma adenoviral começa em ambas as extremidades, sendo as 2 fitas replicadas de forma assíncrona. Os produtos de um ciclo de replicação são uma molécula de fita dupla e outra de fita simples. Entretanto, o processo de replicação ocorre após a fita simples ter sido ciclizada através de repetições terminais invertidas, sintetizando, portanto, uma nova fita complementar iniciada a partir da extremidade 5'. Esse mecanismo de replicação é notável, pois não requer a formação de uma fita descontínua, como é normalmente requerida na replicação convencional do DNA. Em vez disso, a síntese do DNA prossegue de maneira contínua nas 2 fitas de DNA recém-sintetizadas (MADIGAN *et al.*, 2010).

1.4.2. Herpes

Pertencente à família *Herpesviridae*, o vírus do herpes foi isolado até o momento em oito tipos em humanos: tipos 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2), tipo 3 (vírus varicela-zoster - VZV), tipo 4 (vírus Epstein-Barr - EBV), tipo 5 (citomegalovírus humano - HCMV) e os tipos 6, 7 e 8 - HHV6, HHV7 e HHV8). Todos são formados por DNA e sua principal propriedade é a capacidade típica de se tornarem latentes no organismo, provocando infecções recorrentes (WITVROUW, DESMYTER, DE CLERCQ, 1994).

A infecção pelos vírus do herpes simples é caracterizada por três fatores, que incluem uma lesão primária localizada, latência e uma tendência a uma recidiva localizada. Os dois agentes etiológicos do vírus herpes simples (HSV-1 e HSV-2) geralmente produzem síndromes clínicas distintas, dependendo da porta de entrada. Eles podem infectar a mucosa oral ou o trato genital (CHIN, 2002).

As etapas iniciais da biossíntese do HSV compreendem a adsorção e a fusão. As cadeias de glicosaminoglicanos (GAGs) na superfície celular, dentre as quais podemos destacar a de heparan sulfato, fornecem sítios de adsorção, uma vez que podem interagir com as glicoproteínas B e C do envelope do HSV (Figura 5A). De acordo com o modelo atual para a entrada do vírus, o heparan sulfato possui um papel importante na ligação das glicoproteínas virais C (gC) e B (gB) na superfície da célula alvo (TIWARI *et al.*, 2005).

Em seguida, ocorre a ligação da glicoproteína viral D (gD) com um de seus receptores da superfície celular (Figura 5B), que em associação com outras 3 glicoproteínas: gB e o complexo gH/gL, leva a fusão do envelope viral com a membrana plasmática da célula alvo (Figura 5C). Vários receptores celulares para a gD do HSV-1 são conhecidos. Estes incluem o mediador de entrada do vírus herpes, de sigla em inglês (HVEM), que é um membro da família do receptor do fator de necrose tumoral (TNF), 2 membros da família de receptores da nectina, e uma isoforma modificada do heparan sulfato: 3-O sulfotransferase (3-OS HS) (TIWARI *et al.*, 2005).

Posteriormente, o nucleocapsídeo desenvolvido é transportado para o núcleo da célula, sendo que proteínas do tegumento parecem estar ainda associadas com o capsídeo. Depois que o nucleocapsídeo alcança os poros do núcleo, o DNA viral é translocado no nucleoplasma. A proteína do tegumento denominada VHS, produto do gene UL41, permanece no citoplasma e interage com uma proteína celular para degradar o RNAm do hospedeiro logo após a infecção. A

α -TIF (VP16), outra proteína do tegumento, é liberada no núcleo juntamente com o DNA viral (Figura 5D) (WHITLEY, ROIZMAN, 2001). α -TIF se complexa com o octâmero 1 e com o fator celular do hospedeiro e dão início à transcrição do genoma viral.

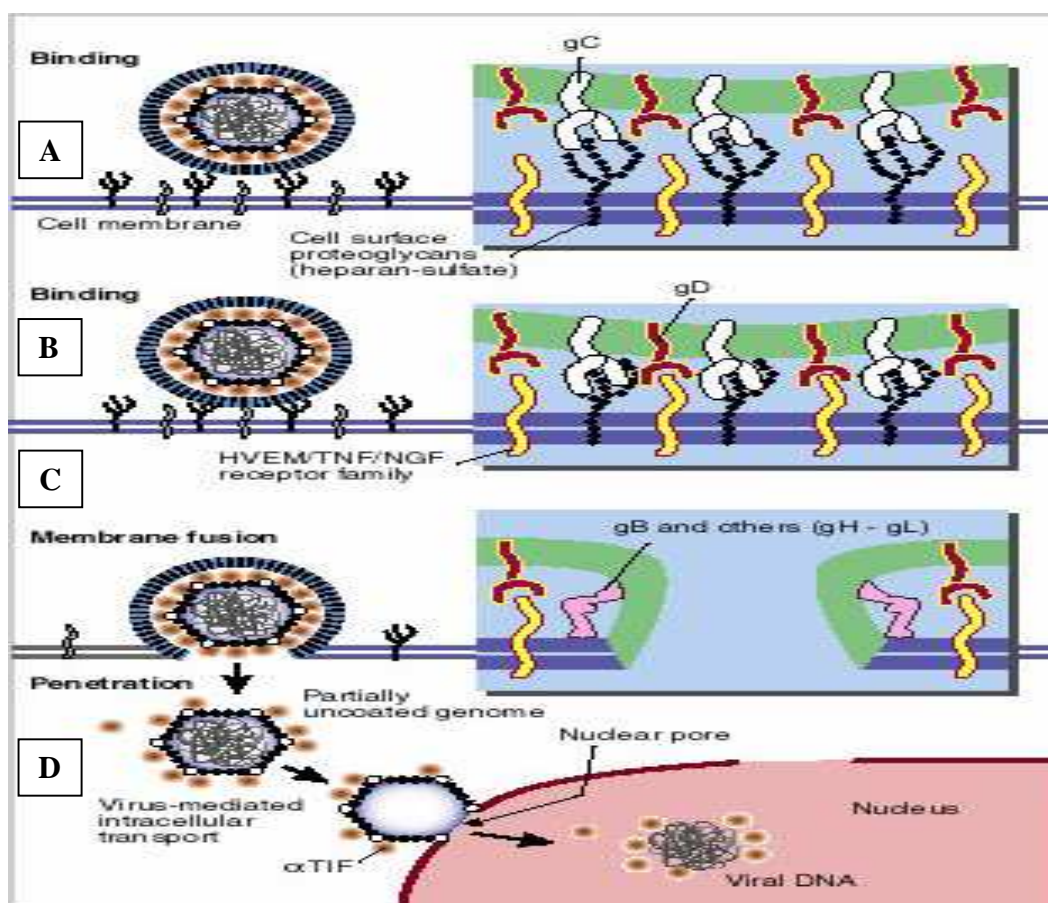


Figura 5: Esquema representativo da entrada do HSV na célula hospedeira.

Fonte: <http://darwin.bio.uci.edu/~faculty/wagner/hsv4f.html>, data de acesso: julho/2012.

Após a montagem das partículas virais no núcleo da célula hospedeira (Figura 6), o nucleocapsídeo viral é envelopado através da fusão com a membrana nuclear interna, havendo o aumento de vírus envelopados no espaço perinuclear. Para que as partículas virais possam ser liberadas do núcleo da célula hospedeira ocorre fusão do envelope viral com a membrana nuclear externa, havendo um acúmulo de capsídeos não envelopados no citoplasma. Os capsídeos são então reenvelopados por vesículas derivadas do complexo de Golgi. Esta última etapa pode estar sendo mediada por interações entre proteínas do tegumento viral e porções citoplasmáticas de

glicoproteínas virais, que já estariam inseridas nas vesículas derivadas do Golgi (Figura 7) (MELANCON, FOSTER, KOUSOULAS, 2004).

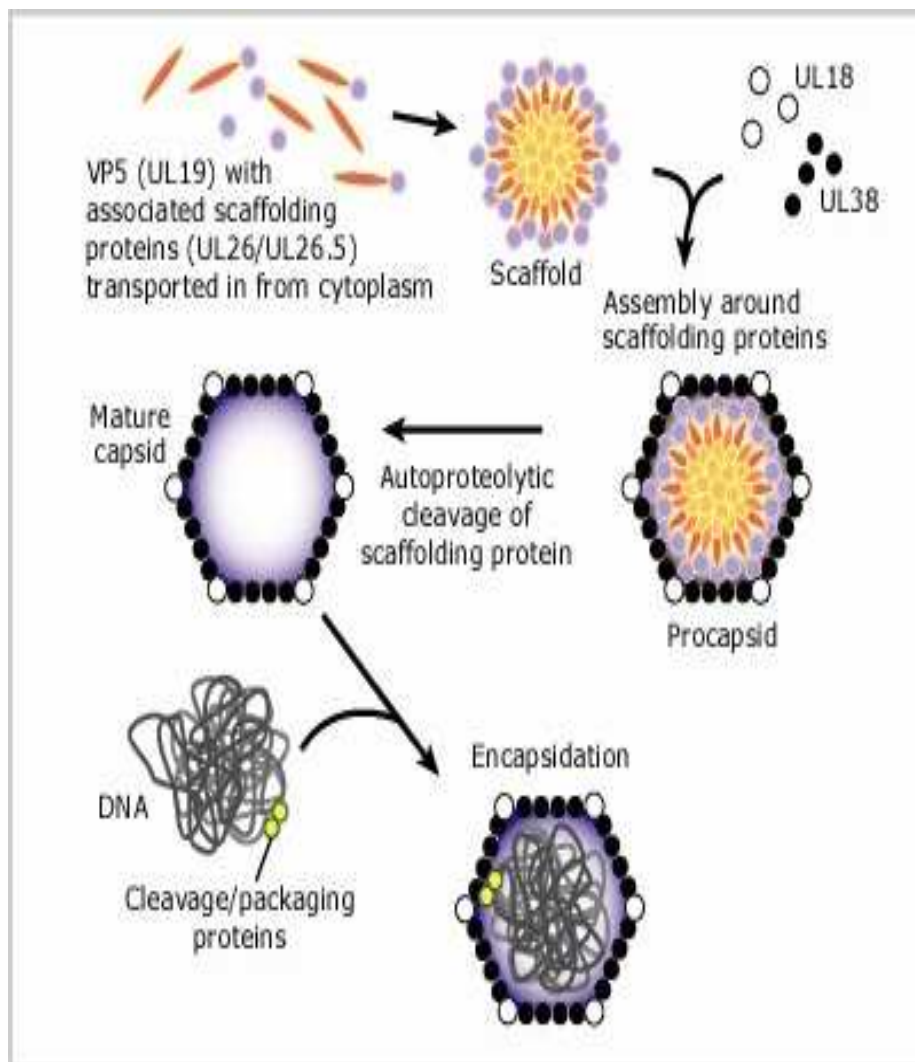


Figura 6: Esquema representativo da montagem do nucleocapsídeo viral.
Fonte: <http://darwin.bio.uci.edu/~faculty/wagner/hsv4f.html>, data de acesso: julho/2012.

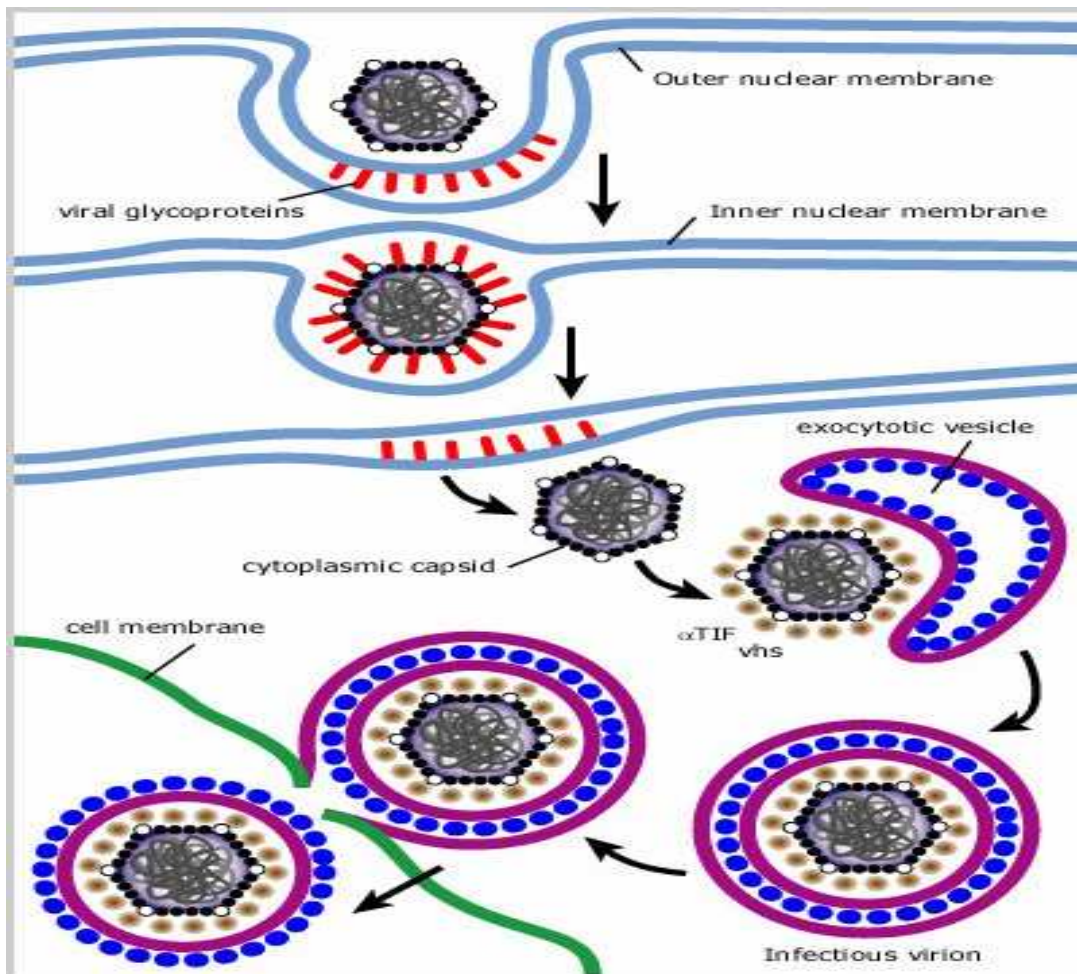


Figura 7: Esquema representativo da liberação das partículas virais de HSV da célula hospedeira. Fonte: <http://darwin.bio.uci.edu/~faculty/wagner/hsv4f.html>, data de acesso: julho/2012.

Os tipos de HSV-1 e 2 podem ser diferenciados imunologicamente por anticorpos e diferem em seus padrões de crescimento em cultura de células e em animais experimentais. O contato com o vírus HSV-1 na saliva dos portadores é o meio mais importante de disseminação. A transmissão do HSV-2 geralmente ocorre por contato sexual. A infecção primária por HSV-1 pode ser leve e inaparente e ocorrer no início da infância. A reativação da infecção latente comumente resulta em herpes labial, manifestado por vesículas claras superficiais em uma base eritematosa, geralmente na face ou nos lábios formando crostas e cicatrizam em poucos dias. O herpes genital, geralmente causado por HSV-2, ocorre principalmente em adultos e é transmitido sexualmente. A infecção primária e as recidivas ocorrem com ou sem sintomas. Como

tratamento, o aciclovir mostrou-se eficiente em reduzir a dor e a disseminação do vírus, acelerando a cicatrização da infecção pelos vírus herpes, além de reduzir as recidivas em adultos (CHIN, 2002).

1.4.3. Dengue

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a dengue é uma infecção arboviral causada por um Flavivírus e transmitida ao homem por fêmeas de mosquitos infectados (*Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*). O vírus da dengue é um membro da família *Flaviviridae* e tem 4 sorotipos antígenicamente distintos (DENV 1, 2, 3 e 4).

Ainda segundo a OMS, a dengue é a doença viral mais comum transmitida por mosquitos aos seres humanos e nos últimos anos tornou-se um grave problema de saúde pública internacional. Estima-se que 2,5 bilhões de pessoas vivam em áreas de riscos, distribuídas por 100 países endêmicos. Cerca de 50 milhões de pessoas que vivem em regiões tropicais e subtropicais são infectadas anualmente com dengue e até 500 mil pessoas desenvolvem febre hemorrágica da dengue (FHD) ou síndrome do choque da dengue (SCD) (KYLE, HARRIS, 2008; CHEN *et al.*, 2010).

Segundo dados do Ministério da Saúde, no primeiro semestre de 2011, foram notificados 715.666 casos de dengue no país, tendo aproximadamente 75 % (537.431) dos casos de dengue no país concentrado em oito estados: Rio de Janeiro (19 %), São Paulo (15 %), Amazonas (8 %), Ceará (8 %), Paraná (8 %), Minas Gerais (7 %), Espírito Santo (6 %) e Bahia (4 %) (BRASIL, 2011).

No Estado do Ceará, nos últimos 25 anos o vírus da dengue vem se manifestando de forma endêmica com o registro de quatro picos epidêmicos nos anos de 1987, 1994, 2001 e 2008. No ano de 2011, os municípios apresentaram um aumento importante no número de casos, devido a recirculação do sorotipo do vírus da dengue tipo 1 (DENV-1) em grande parte do Estado (SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE, 2011). Os fatores de risco mais importantes a serem considerados numa infecção por dengue são: idade, sexo, suscetibilidade genética e a origem geográfica da cepa do vírus (CHIN, 2002).

O Flavivírus é icosaédrico e envelopado, de fita simples de RNA positivo, que se liga ao receptor na célula hospedeira. As partículas entram na célula hospedeira por endocitose mediada

por receptor. O pH ácido do endossomo desencadeia a fusão da membrana viral com a membrana do endossomo e liberação do RNA viral no citoplasma. O genoma viral apresenta uma sequência capaz de codificar um grande polipeptídeo (Figura 8) (BURKE, MONATH, 2001).

Este polipeptídeo sofre modificações pós-traducionais sendo clivado por proteases virais e por proteases das células hospedeiras em pelo menos 10 proteínas. Três dessas proteínas são estruturais (proteína C, localizada no nucleocapsídeo; proteína M, que está associada com a membrana; e a proteína E do envelope, que é a principal proteína estrutural, que está diretamente relacionada com a imunidade e provável virulência da amostra) e sete outras proteínas não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5), que estão relacionadas com a infecção viral (CHAMBERS *et al.*, 1990; DEUBER *et al.*, 1992; LINDENBACH, RICE, 2003).

Em seguida, as partículas virais se agregam à membrana do retículo endoplasmático para formar partículas imaturas. Tais partículas são transportadas numa rota de exocitose, na qual a proteína prM é clivada pela protease *furin-like* do hospedeiro no lado *trans* do Complexo de Golgi. A clivagem da prM e dissociação do peptídeo pr da partícula induz uma mudança conformacional que resulta na maturação da partícula. As partículas maduras originadas serão subsequentemente liberadas (Figura 8) (SÁNCHEZ, DÉSPRES, BARRÓN, 2005).

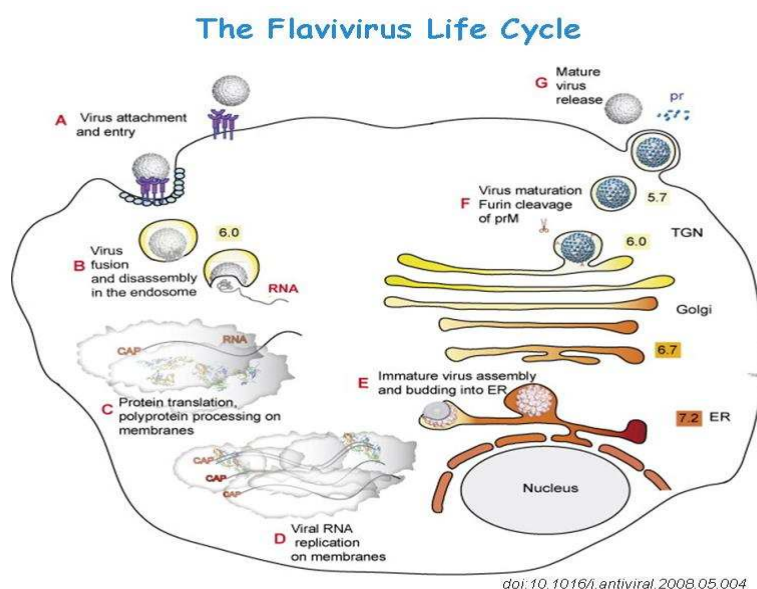


Figura 8: Esquema representativo do ciclo de vida do flavivírus na célula hospedeira.

Fonte: www.googleimages.com, data de acesso: julho/2012.

A primeira linha de defesa do hospedeiro é a pele intacta, pela qual a maioria dos vírus é incapaz de penetrar. No entanto, a pele rompida (ferimentos ou picadas de insetos) torna-se mais vulnerável ao ataque do vírus (TORTORELLA *et al*, 2000).

Quando um indivíduo é contaminado pela primeira vez por um dos 4 sorotipos do vírus, ele torna-se imune ao sorotipo infectado pelo fato de o mesmo ser reconhecido e inativado, criando uma memória imunológica (ROTHMAN, ENNIS, 1999). No entanto, apesar de a recuperação da infecção por um sorotipo fornecer imunidade homóloga por toda a vida, não fornece proteção contra outros sorotipos e pode exacerbar as infecções subsequentes (LEE, LIAO, LIN, 2005).

Durante uma infecção secundária, anticorpos provenientes da primeira infecção podem aumentar a infecção dos fagócitos mononucleares pela formação de imunocomplexos infecciosos. Os vírus marcados com anticorpos são internalizados com maior facilidade pelos macrófagos graças a receptores Fc que reconhecem os anticorpos (GUGLANI, KABRA, 2005; CHIN, 2002; LEE, LIAO, LIN, 2005).

Em seguida, os macrófagos entram em processo de ativação. Entretanto, até que se tornem maduros, há uma liberação exagerada de TNF- α , o que leva à morte celular programada (apoptose) não só de células infectadas, mas, também, de células endoteliais sadias causando, assim, trombocitopenia e choque (LEE, LIAO, LIN, 2005).

O vírus da dengue pode se manifestar clinicamente a partir de uma infecção assintomática como uma simples doença febril, que caracteriza a dengue clássica (DC), até complicações mais graves como trombocitopenia, hemorragia e choque, que caracterizam a febre hemorrágica da dengue ou síndrome de choque da dengue (FHD / SCD) (TALARICO, DAMONTE, 2007).

A enfermidade apresenta um ciclo de transmissão que tem início no homem infectado pelo mosquito *Aedes aegypti*. Após a ingestão de sangue infectado, transcorre, no inseto, um período de incubação intrínseca que pode variar de 8 a 12 dias. Após esse período, o mosquito torna-se apto para transmitir o vírus e assim permanece durante toda sua vida (HENCHAL, PUNTNAK, 1990).

No homem, o período entre a picada infectante e o aparecimento de sintomas (período de incubação) pode variar de 3 a 15 dias, sendo, em média, de 5 a 6 dias e posteriormente ocorre o período de transmissibilidade, enquanto ainda existir vírus no sangue (período de viremia). Este

período começa um dia antes do aparecimento dos sintomas e vai até o 6º dia da doença (HENCHAL, PUNTNAK, 1990).

A maioria das infecções por dengue é relativamente amena, caracterizada por um rápido início de febre e sintomas não específicos, incluindo dor de cabeça frontal, dor retro-orbital, dores no corpo, náuseas e vômitos, dores nas articulações, fraqueza e erupções na pele (GUBLER, 1998). Com a redução da contagem de plaquetas, há agitação intensa, palidez facial e cianose. O fígado pode também estar aumentado, levando a um aumento das transaminases (CHIN, 2002).

Na dengue clássica, a resolução da infecção ocorre dentro de 4-7 dias e está associada com uma resposta imunológica inata e adaptativa gerada pelo hospedeiro. No momento do diagnóstico, que é em grande parte clínico, o tratamento é mantido e o controle da doença é limitado para combater o vetor (WHITEHORN, SIMMONS, 2011).

Na febre hemorrágica da dengue, os sintomas iniciais são semelhantes aos da dengue clássica, porém rapidamente evoluem para manifestações hemorrágicas. A definição de caso de FHD, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), consiste nos seguintes critérios: febre, manifestações hemorrágicas e hemoconcentração (hematócrito aumentado em 20 % ou evidência objetiva de aumento da permeabilidade vascular) (FIGUEIREDO, 2000).

Apesar de a incidência e emergência da infecção de dengue mundial, não existe nenhuma vacina disponível e pouco é conhecido sobre o ciclo de replicação completo do vírus tanto no mosquito quanto nas células de vertebrados (WIJESEKARA, PANGESTUTI, KIM, 2011).

O desenvolvimento de uma vacina seria um grande avanço no controle da doença, mas os esforços têm sido dificultados pela falta de um modelo animal da doença e as preocupações sobre o papel do sistema imunológico na patogênese da doença, o que dificulta ainda mais a nossa compreensão da imunopatogenia (WEBSTER, FARRAR, ROWLAND-JONES, 2009).

A dengue é uma síndrome, e sua patogênese é um jogo entre vírus e fatores do hospedeiro que ainda permanece não compreendida (HALSTEAD, 2007; GUZMAN, KOURI, 2008). Explicar a heterogeneidade entre as apresentações clínicas semelhantes dentro de uma seção transversal da população continua sendo uma área vital da pesquisa. Uma melhor compreensão da patogênese da doença seria de grande ajuda para o desenvolvimento de vacinas, abordando questões específicas sobre a segurança da vacina e eficácia, levando em conta o papel do sistema imune no desenvolvimento da doença clínica (STEPHENSON, 2005).

Para que uma substância possa ser considerada um agente antiviral, ela terá que possuir seletividade e ser capaz de inibir a replicação viral sem alterar as funções do hospedeiro (TALARICO, DAMONTE, 2007). Diante deste quadro, estratégias alternativas de pesquisa vêm sendo estudadas para o tratamento e controle de patologias como o herpes e a dengue.

1.5. Inflamação

A resposta primária dos tecidos vascularizados a uma infecção ou lesão é denominada de inflamação, que tem como função reconhecer o dano e preparar o organismo para repará-lo. É caracterizada pela exsudação de fluidos e proteínas do plasma derivadas do aumento da permeabilidade vascular e pela migração de leucócitos, principalmente neutrófilos para a área lesionada. Esta resposta inflamatória aguda é um mecanismo de defesa do organismo, destinado a matar bactérias, vírus, parasitas ou substâncias estranhas ao organismo (IWALEWA *et al.*, 2007).

A inflamação é essencialmente uma resposta que normalmente cessa após a restauração normal da estrutura e função do tecido lesado. Porém, quando a inflamação persiste (inflamação crônica), pode causar dano tecidual e perda de função (RODRIGUES-VITA, LAWRENCE, 2010). Quando aguda, a inflamação caracteriza-se pela curta duração e apresenta os sinais cardinais que são a dor, o calor, o rubor, edema e a perda da função (LEES *et al.*, 2004). Já na fase crônica, além de perdurar por um período indeterminado, varia de acordo com os tipos de mediadores celulares e humorais envolvidos (SPINOSA, GÓRNIK, BERNARDI, 2006; GILMAN *et al.*, 2006).

O processo inflamatório é controlado por um grupo de substâncias chamadas mediadores químicos que, no local da inflamação, promovem a vasodilatação, a estase vascular e o aumento da permeabilidade capilar, permitindo também a migração de leucócitos da circulação para o tecido inflamado e ainda coordenam as variadas respostas de defesa local (FAUSTO *et al.*, 2010). Alguns desses mediadores têm a capacidade de estimular neurônios sensoriais locais. Em alguns casos, quando a inflamação excede certos níveis, quantidades suficientes desses mediadores endógenos entram na circulação sistêmica e são disseminados pelo sangue a diferentes órgãos. Isso resulta numa complexa variedade de reações sistêmicas, coletivamente chamadas de resposta de fase aguda, que é definida como uma resposta multifatorial do organismo a infecções, lesões ou traumas (ROTH *et al.*, 2009).

Portanto, a resposta inflamatória é um fenômeno complexo que envolve eventos vasculares e celulares. Dentre as células envolvidas na inflamação, algumas estão presentes nos tecidos como as células endoteliais vasculares, mastócitos e macrófagos, enquanto plaquetas e leucócitos têm acesso à área de inflamação a partir do sangue. Os mediadores são produzidos tanto no plasma quanto nas células, e eles, por sua vez modificam e regulam as reações vasculares e celulares (RANG *et al.* 2007).

1.5.1. Eventos Vasculares

Logo após uma lesão tecidual, os vasos sanguíneos locais sofrem uma vasoconstrição transitória seguida de vasodilatação por ação de uma variedade de mediadores inflamatórios produzidos no plasma e/ou pela interação do microrganismo com células teciduais. A princípio, desenvolve-se a fase vascular da inflamação, que se caracteriza por vasodilatação, que confere o aspecto avermelhado ao tecido (rubor) e o calor a região. Tais eventos facilitam a passagem de proteínas plasmáticas para o tecido, carreando, conseqüentemente, uma grande quantidade de líquido, dando origem ao edema. Devido a esta alteração no fluxo vascular e no calibre dos vasos, ocorre um aumento de permeabilidade vascular e conseqüente extravasamento de líquido e proteínas para o interstício, gerando um processo denominado estase sanguínea (FAUSTO *et al.*, 2010).

Os capilares sanguíneos são revestidos por células endoteliais que possuem junções intercelulares. Apresentam também função ativa na inflamação, por secretarem óxido nítrico, que promove vasodilatação, aumento da liberação de plasma e de células sanguíneas para a área da inflamação (BROWN, 1997; RANG *et al.*, 2007).

Ocorre um aumento no transporte vesicular através do endotélio, facilitando a entrada de sistemas enzimáticos do plasma (sistema de coagulação, fibrinolítico e das cininas) no local da inflamação. Este aumento do líquido no local da inflamação leva a um aumento da drenagem linfática, que pode ser benéfico, por permitir que o agente agressor seja retirado e levado até os linfonodos onde entra em contato com as células do sistema imune adaptativo (BROWN, 1997).

Esses eventos são causados pela ligação de vários mediadores inflamatórios tais como a serotonina, a histamina e bradicinina, produzidos pela interação do microrganismo com o tecido.

Esses mediadores atuam juntamente com algumas citocinas no aumento da permeabilidade vascular (YAMASAKI *et al.*, 2007; RANG *et al.*, 2007).

A histamina exerce uma série de efeitos em muitos processos patológicos e fisiopatológicos. Durante a inflamação, a mesma é liberada através da degranulação dos mastócitos e basófilos. Os principais papéis da histamina são aqueles envolvidos na inflamação, secreção gástrica e como neurotransmissor. A histamina atua nas células musculares lisas vasculares e células endoteliais, causando a vasodilatação e um aumento na permeabilidade vascular (THURMOND, GELFAND, DUNFORD, 2008).

A serotonina (5-hidroxitriptamina ou 5-HT) é outro mediador vasoativo pré-formado com ações semelhantes às da histamina. É um neurotransmissor sintetizado no sistema nervoso central e também é encontrado em células da mucosa gastrointestinal e plaquetas do sangue (JØRGENSEN, 2007).

A maior parte da 5-HT liberada da mucosa intestinal na circulação hepática é rapidamente eliminada pelo fígado e pulmões, enquanto pequena porção de amina livre é ativamente retomada em sangue pelas plaquetas (MOHAMMAD-ZADEH, MOSES, GWALTNEY-BRANT, 2008, BALIJA, 2011).

As plaquetas são os principais locais de armazenamento de 5-HT fora do SNC. É depositada nos grânulos densos, semelhante a 5-HT vesicular nos neurônios. Diferente dos neurônios, as plaquetas não sintetizam 5-HT e seu conteúdo de amina é, no todo, um resultado de um transportador mediando a absorção no plasma circundante. Uma vez que outras células sanguíneas, assim como o plasma sanguíneo, contenham apenas quantidades insignificantes desta amina, em comparação com as plaquetas, o nível de 5-HT no sangue diretamente reflete o conteúdo de 5-HT das plaquetas (BALIJA, 2011).

O fator de ativação plaquetária (PAF) é um potente e versátil mediador da inflamação que é produzido por vários tipos de células e tecidos, e particularmente por leucócitos. Atua em um único receptor (PAFR) que pode ser expressado na membrana plasmática ou na porção externa do núcleo de vários tipos de células, mas especialmente de leucócitos, plaquetas e células endoteliais. A liberação endógena de PAF pode ser responsável por várias das manifestações de inflamação aguda (ISHII, SHIMIZU, 2000; STAFFORINI *et al.*, 2003).

A bradicinina (BK) é conhecida por apresentar um potente efeito pró-inflamatório e é um dos mais potentes peptídeos alogênicos endógenos. BK é formada no plasma de tecidos

inflamados e, pela ativação de receptores B₂ presentes na membrana de vários tipos de células, inicia muitas fases do processo inflamatório, tais como vasodilatação, extravasamento de plasma, ativação de células imunológicas, além da indução da quimiotaxia dos leucócitos e ativação dos neurônios nociceptivos (MEINI, MAGGI, 2008).

1.5.2. Eventos Celulares

Junto com o desenvolvimento da estase, começa a aparecer uma disposição periférica dos leucócitos, principalmente neutrófilos, ao longo do endotélio vascular (FAUSTO *et al.*, 2010).

Os leucócitos podem sair do interior do vaso para o foco infeccioso atraídos por agentes quimiotáticos tanto de origem endógena (produtos liberados pelas próprias células através da cascata do sistema do complemento, da lipoxigenase, citocinas, etc.) quanto de origem exógena (agentes liberados pelo microrganismo invasor). O recrutamento de neutrófilos no tecido inflamado obriga-os a aderir à superfície do lúmen do endotélio vascular, e migrar através da monocamada de células endoteliais e da membrana basal subendotelial, mediante ação de moléculas de adesão e agentes quimiotáticos que regulam a fase inicial da adesão e migração de neutrófilos (Figura 9) (BUTLER *et al.*, 2008).

Após a migração, os neutrófilos continuam a migrar em direção ao foco inflamatório pelo processo de quimiotaxia, que tem como objetivo reconhecer a partícula ou célula causadora da infecção com subsequente fagocitose, degradação e destruição deste agente, para ser promovido o restabelecimento do tecido lesado (DEKKER, SEGAL, 2000).

O tipo celular predominante nesta fase inicial pode ser de células polimorfonucleares, também denominadas de granulócitos, que são células com núcleos constituídos por múltiplos lóbulos, são subdivididos em neutrófilos, eosinófilos e basófilos de acordo com as propriedades de coloração dos grânulos em seu citoplasma (RANG *et al.*, 2007).

Alguns autores usam o termo polimorfonuclear para se referirem apenas aos neutrófilos, já que os eosinófilos e os basófilos constituem juntos apenas 1-5 % de células nucleadas do sangue. Os eosinófilos desempenham um papel importante na defesa do hospedeiro contra infecções parasitárias, e os basófilos são importantes efetores em uma variedade de reações alérgicas, atuando de forma semelhante aos mastócitos (ROTHENBERG, HOGAN, 2006; SULLIVAN, LOCKSLEY, 2009).

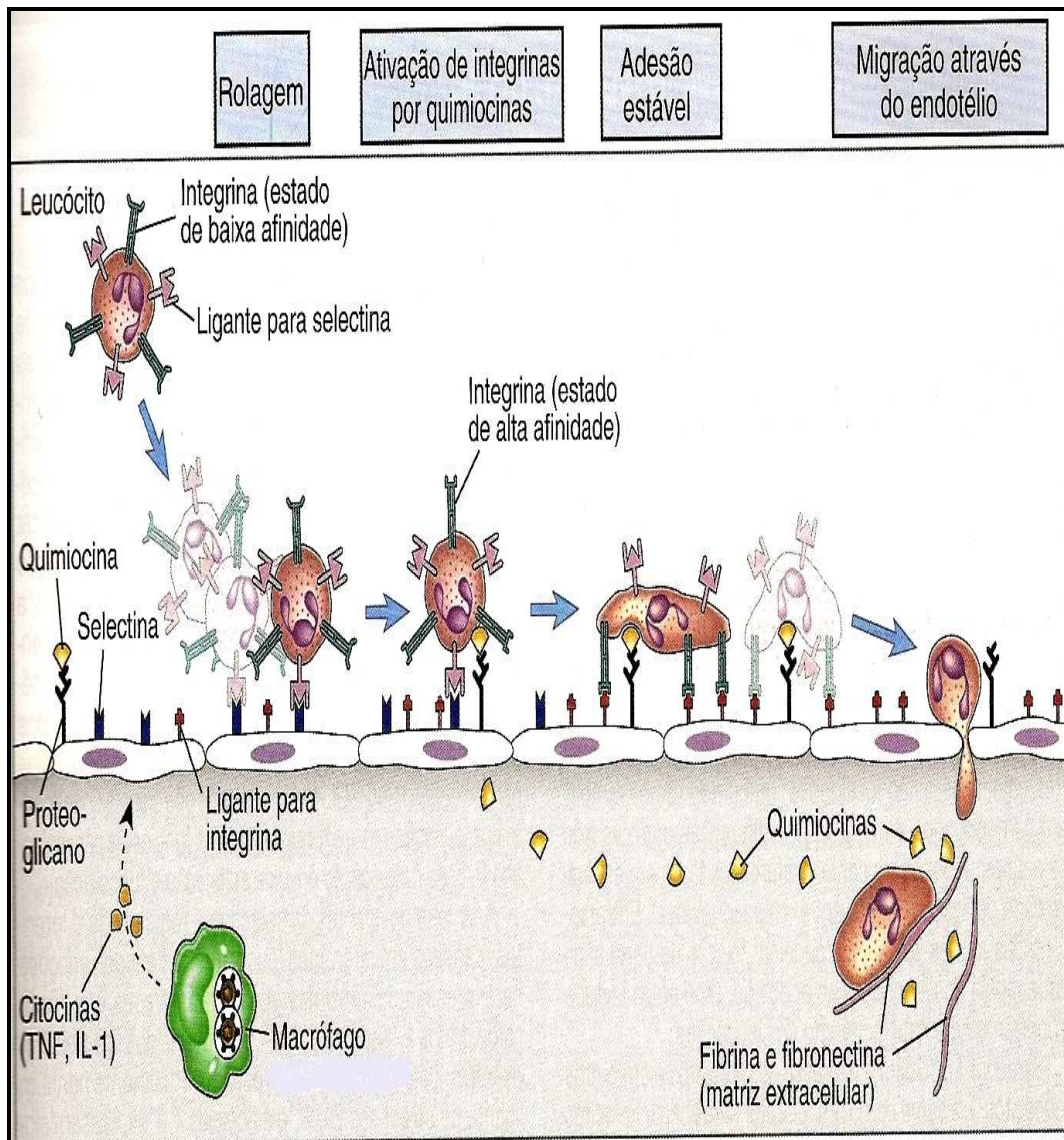


Figura 9: Migração de leucócitos através do endotélio vascular.

Fonte: ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008.

Uma vez presente no sítio inflamatório, os neutrófilos são capazes de fagocitar, destruir e degradar os microrganismos, sendo a destruição destes realizada por mecanismos dependentes de oxigênio, nitrogênio e enzimas proteolíticas. Em geral, as quantidades de peróxido de hidrogênio formado não são capazes de induzir uma destruição eficaz desses patógenos. No entanto, os grânulos azurófilos (lisossomos verdadeiros ou primários) dos neutrófilos contêm a enzima mieloperoxidase (MPO) que, na presença de íons Cl⁻, converte o peróxido de hidrogênio em hipoclorito, sendo este importante para a destruição do agente lesivo (GRESPLAN, 2006).

Os neutrófilos possuem em seu interior três tipos de grânulos: os grânulos azurófilos que contêm proteases e enzimas hidrolíticas, defensinas, MPO, entre outras; os grânulos específicos, que contêm entre outros elementos, apolactoferrina, colagenase e enzimas que ativam a função do quinto fator do sistema complemento e finalmente os grânulos que contêm gelatinase e exibem o receptor CD11/18 na membrana, que são essenciais para a adesividade da célula (BOXER, 2001).

Durante o metabolismo oxidativo, que é produzido por neutrófilos ativados, a MPO, situada nos grânulos azurófilos dos neutrófilos converte, na presença de íons Cl⁻, o peróxido de hidrogênio em hipoclorito, gerando ácido hipocloroso (HOCl) que está implicado na fagocitose, sendo considerado importante para a destruição do agente lesivo (MUTZE *et al.*, 2003).

Quando a lesão torna-se persistente, ocorre um infiltrado de células mononucleares, que são células constituídas de um só lóbulo e que são divididas em monócitos e linfócitos. Quando o monócito atinge o tecido extravascular, ele sofre uma transformação em uma célula muito maior, o macrófago (FAUSTO *et al.*, 2010).

No processo inflamatório agudo, se o agente lesivo for eliminado, os macrófagos tendem a desaparecer, porém se o agente persistir, os macrófagos persistem por um período prolongado de tempo. Em adição, ocorre mobilização de linfócitos para combater a lesão, tanto para formação de anticorpos (linfócitos B), como para reações mediadas por células (linfócitos T) (FAUSTO *et al.*, 2010).

Dentre os mediadores envolvidos nos eventos celulares, as citocinas representam um grupo diversificado de pequenas proteínas solúveis que quando secretadas por uma célula pode agir sobre a mesma célula, de forma autócrina, ou em outra célula, de forma parácrina. Através da ligação a receptores de superfície celular específicos, elas iniciam sinais que são essenciais para um amplo espectro de funções, incluindo a indução de respostas imunes, diferenciação e proliferação celular e apoptose (WANG *et al.*, 2009).

Em uma lesão tecidual, as células liberam uma citocina denominada fator de necrose tumoral (TNF- α) que, por sua vez, induz a liberação de outras citocinas, podendo se destacar a interleucina 1-beta (IL-1 β) a interleucina-6 (IL-6) e a interleucina-8 (IL-8). A IL-1 β promove a ativação da enzima cicloxigenase (COX) responsável pela produção de prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos e a IL-8 atua na liberação local de aminas simpatomiméticas (CUNHA *et al.*, 1992; BASBAUM, JULIUS, 2006; FERREIRA, 2009).

A via dos eicosanóides representa outro sistema que também passa a atuar quando as células inflamatórias são estimuladas ou lesadas, desempenhando um papel crítico em quase todas as etapas do processo inflamatório. O ácido araquidônico, principal fonte dos eicosanóides, servirá como substrato para duas vias enzimáticas distintas: a via das cicloxigenases (COX), que dá origem a formação de prostaglandinas (PGs), prostaciclina (PGI₂) e tromboxanos (TXs), ou a via das lipoxigenases que levam à síntese dos leucotrienos e lipoxinas e outros compostos (RANG *et al.*, 2007).

A COX-1 está presente em quase todos os tipos de células, sendo, portanto chamada de constitutiva, pois é importante na manutenção da função renal, função plaquetária e epitélio gastrointestinal, já a COX-2 é a isoenzima indutiva que é expressa na inflamação dos tecidos, levando, principalmente, à formação de prostaglandinas que participam de eventos inflamatórios, álgicos e térmicos, mas também tem funções homeostáticas nos rins, no sistema cardiovascular e no cérebro (KAM, SO, 2009).

Além das duas isoformas de cicloxigenases (COX) existentes, que são representadas pela COX-1 e COX-2, alguns estudos têm demonstrado a existência de uma terceira isoforma, a COX-3. Esta seria uma variante da COX-1. A COX-3 foi isolada pela primeira vez em caninos e quando isolada em humanos, mostrou-se presente no córtex cerebral e no coração. A inibição da COX-3 por fármacos específicos pode representar um mecanismo central que possibilite diminuir a dor e possivelmente a febre (CHANDRASEKHARAN *et al.*, 2002).

1.5.3. Via da heme oxigenase

Em todos os organismos, a biossíntese do produto heme inicia-se com a formação de duas moléculas de σ -aminoenolevulnato, obtidas a partir da relação entre a glicina e o Succinil-CoA.

São condensadas para formar porfobilinogênio e, por meio de uma série de reações enzimáticas complexas, quatro moléculas de porfobilinogênio reúnem-se formando protoporfirina. O átomo de ferro é incorporado após a protoporfirina ter sido formada, em um passo catalisado pela enzima ferroquelatase (NELSON, COX, 2011).

O grupo ferro-protoporfirina (heme) da hemoglobina, liberado no baço a partir de eritrócitos é degenerado, produzindo ferro livre e por fim, bilirrubina. O primeiro passo nessa via de duas etapas é catalisada pela enzima heme oxigenase (HO), que converte o heme em biliverdina (BVD). Os demais produtos da reação são ferro livre e monóxido de carbono (CO) (Figura 10). A atividade dessa enzima é dependente de NADPH e oxigênio molecular (TENHUNEN, MARVER, SCHMID, 1968; MAINES, 1997).

A biliverdina é convertida a bilirrubina no segundo passo, catalisado pela biliverdina-redutase. Essas vias de degradação do heme desempenham papéis significativos na proteção de células contra dano oxidativo e na regulação de certas funções celulares (Figura 10) (PAINE *et al.*, 2010).

O monóxido de carbono liga-se a hemoglobina e sua produção pela heme oxigenase assegura que, mesmo na ausência de exposição ambiental, cerca de 1 % da constituição química de um indivíduo se apresente complexada ao CO. Quando produzido pela heme oxigenase, é tóxico em altas concentrações, mas em concentrações muito baixas, como as resultantes da degradação do heme, apresenta algumas funções reguladoras ou de sinalização. O CO atua como vasodilatador, com característica semelhante a do óxido nítrico, embora com menor potência. Regula as funções vasculares por induzir a atividade da enzima guanilato ciclase, que leva ao relaxamento dos vasos sanguíneos e inibe a agregação plaquetária (Figura 10) (GROCHOT-PRZECZEK, DULAK, JOZKOWICZ, 2010; NELSON, COX, 2011). Esta enzima, promove bloqueio de mediadores inflamatórios e inibição da hipernocicepção por abertura de canais de potássio por estimulação da proteína quinase G (SACHS, CUNHA, FERREIRA, 2004).

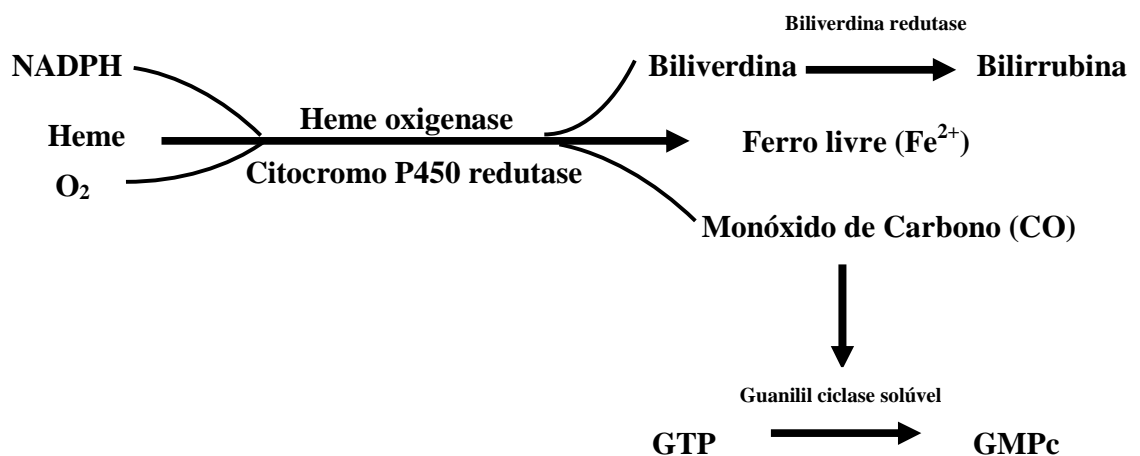


Figura 10: Via do catabolismo da heme oxigenase. A molécula do heme é degradada pela heme oxigenase-1 em três compostos: íon ferro, monóxido de carbono e biliverdina, que é subsequentemente reduzida a bilirrubina pela biliverdina redutase (BVR). Bilirrubina elimina espécies reativas de oxigênio e pode ser reoxidada a biliverdina. O monóxido de carbono estimula a guanilato ciclase para formar GMPc.

Fonte: <http://cardiovascres.oxfordjournals.org>, data de acesso: julho/2012.

Além disso, o CO exerce efeitos citoprotetores, prevenindo apoptose em diversos tipos de células, incluindo células endoteliais, musculares lisas vasculares, fibroblastos, osteoblastos e pancreáticas do tipo β . Também estimula a proliferação das células endoteliais por induzir a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) nas células vasculares, macrófagos e no endotélio microvascular (GROCHOT-PRZECZEK, DULAK, JOZKOWICZ, 2010).

A presença de ferro livre nos sistemas biológicos pode levar à rápida formação de metabólitos reativos de oxigênio danosos como os radicais hidroxila ou superóxido. É sugerido que as tendências oxidantes do ferro livre sejam neutralizadas pela síntese de ferritina, um sistema de estoque celular para o ferro (GALBRAITH, 1999).

Células tratadas com heme (composto de estrutura semelhante à do heme) têm apresentado níveis aumentados de ferritina e aumento de resistência ao estresse oxidativo (LIN, GIROTTI, 1998). No tecido pulmonar, a hiperóxia leva à indução de HO-1, mas na presença de ferro livre, a indução da HO-1 é aumentada com maior intensidade (FOGG *et al.*, 1999). No entanto, a ação da heme oxigenase induzida levaria à acumulação de mais ferro (GALBRAITH, 1999).

A bilirrubina é insolúvel, sendo transportada na corrente sanguínea complexada com a albumina sérica. No fígado, a bilirrubina é transformada no pigmento da bile, a bilirrubina-diglicuronato. Este produto é suficientemente hidrossolúvel para ser secretado com outros componentes da bile para o intestino delgado (NELSON, COX, 2011).

A bilirrubina é o antioxidante mais abundante nos tecidos dos mamíferos, sendo responsável pela maior parte da atividade antioxidante no plasma. Seus efeitos protetores parecem especialmente importantes no desenvolvimento do encéfalo de recém-nascidos. Em casos de insuficiência hepática ou bloqueio da secreção de bile determina-se o extravasamento da bilirrubina do fígado para o sangue, resultando numa coloração amarelada da pele e da esclera dos olhos, uma condição denominada icterícia. Neste caso, a determinação da concentração de bilirrubina no sangue pode ser útil para o diagnóstico da doença hepática subjacente (NELSON, COX, 2011).

No entanto, a bilirrubina pode também ser prejudicial aos organismos. A faixa prejudicial provém da inconveniência relativa apresentada na icterícia até lesões cerebrais profundamente incapacitantes e irreversíveis no recém-nascido (GALBRATH, 1999).

A toxicidade celular associada à icterícia pode ser devido o fato de os níveis de bilirrubina excederem os níveis de albumina sérica necessários para solubilizar esse composto (NELSON, COX, 2011).

Claramente, a concentração e a localização da bilirrubina são de grande importância, mas outros fatores tais como ligantes e proteínas de transporte e excreção, irão modular o balanço entre os efeitos antioxidantes e tóxicos da bilirrubina (GALBRATH, 1999).

Dentre esses vários papéis para os produtos da degradação do heme, a via de degradação está sujeita à regulação, principalmente em seu primeiro passo. Três isoenzimas de HO geneticamente distintas são conhecidas: HO-1, HO-2 e HO-3. HO-1 é induzida, enquanto HO-2 e HO-3 são constitutivamente expressas (McCOUBREY, HUANG, MAINES, 1997).

De acordo com a literatura, o zinco protoporfirina (ZnPP) IX tem sido usado como um reagente farmacológico que seletivamente bloqueia a ação da HO pelo fato de, assim como o heme, apresentar um grupo de protoporfirina em sua estrutura, atuando como um inibidor competitivo. Consequentemente, por inibição da HO, ocorrerá inibição da liberação dos produtos do heme (BVD, CO e ferro), que protegem contra o dano celular e estresse oxidativo (OKADA, 1996; YANG *et al.*, 2001).

Geralmente, a indução de HO-1 tem sido considerada como uma resposta adaptativa celular contra a toxicidade gerada por estresse oxidativo (GOZZELINO, JENEY, SOARES, 2010). Mais recentemente, HO-1 também foi reconhecida por apresentar importantes funções, tais como imunomoduladora e anti-inflamatória (PAINE *et al.*, 2010).

É sabido que a enzima HO-1 é uma isoforma induzida pelo estresse que também tem funções anti-inflamatórias. Acredita-se que com o estresse oxidativo, a HO-1 seja rapidamente induzida e que atue como um potente fator endógeno para a resolução de lesões inflamatórias induzidas por estresse (TAKAO *et al.*, 2011).

Esta enzima tem desempenhado um papel regulador, sendo considerada um potencial alvo terapêutico no tratamento de doenças inflamatórias (ABRAHAM; KAPPAS, 2008). HO-1 e seus produtos são conhecidos por funcionarem em uma ampla gama de processos que poderiam ser importantes durante a fase de resolução da inflamação, atuando sobre os macrófagos (OTTERBEIN, MANTELL, CHOI, 1999; RYTER, ALAM, CHOI, 2006).

Estudos têm demonstrado que a expressão da HO-1 ou o tratamento com CO inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, como o fator de necrose tumoral (TNF)- α , interleucina (IL)-1 β e IL-6 nos macrófagos ativados (JEONG, LEE, KIM, 2009).

Além disso, a regulação de uma maior expressão da HO-1 ou administração de CO suprime a expressão pró-inflamatória da COX-2 e da óxido nítrico sintetase (iNOS), reduzindo desta maneira, a produção de prostaglandina E₂ (PGE₂) derivada da COX-2 e a produção de óxido nítrico (NO) derivada da produção de iNOS (SUH *et al.*, 2006; OH *et al.*, 2006).

Também é sabido que a HO-1 e/ou CO pode inibir a expressão da iNOS e a produção de NO em macrófagos ativados pela inativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B). Devido a esses estudos, um número de agentes terapêuticos têm sido relatados para a regulação da expressão da HO-1 e exercer atividades anti-inflamatórias através da indução de HO-1 (JEONG, LEE, KIM, 2009).

1.5.4. Agentes inflamatórios

O processo inflamatório pode ser induzido quimicamente em animais através de agentes como a carragenina e a dextrana. O termo carragenina, segundo o dicionário digital de termos médicos de 2007, é um extrato solúvel em água derivado da carragenana. Esta carragenana é do tipo lambda que, pela sua conformação, é a única capaz de se dissolver a baixas temperaturas, enquanto que a kappa e a iota carragenana só se dissolvem a temperaturas mais elevadas, pois formam gel (CAMPO *et al.*, 2009).

A carragenina induz migração de neutrófilos na cavidade peritoneal por um mecanismo indireto, via ativação de macrófagos (SOUZA *et al.* 1988). O processo inflamatório induzido por carragenina pode ser caracterizado por 3 fases. Na primeira fase ocorre liberação de mediadores como histamina e serotonina. A segunda fase envolve liberação de citocinas, enquanto as prostaglandinas estão envolvidas na terceira fase (LO, ALMEIDA, BEAVEN, 1982).

A dextrana é um agente pró-inflamatório que promove liberação de aminas vasoativas tais como histamina e serotonina causando edema osmótico, caracterizado por um aumento na permeabilidade vascular com baixos níveis de proteínas e neutrófilos (LO, ALMEIDA, BEAVEN, 1982).

1.5.5. Fármacos utilizados no controle da inflamação

Os principais grupos de fármacos que são usados nos distúrbios inflamatórios são os antiinflamatórios não-esteroidais (AINEs) e os glicocorticóides. Os AINEs são fármacos que possuem um amplo espectro de indicação terapêutica, tendo três principais ações: anti-inflamatória, analgésica e antipirética (RANG *et al.*, 2007). Estas drogas exercem suas ações principalmente através da inibição da ciclooxigenase (BRUM-JÚNIOR, 2006). Os AINEs suprimem a dor, o edema e o aumento de fluxo sanguíneo associado à inflamação, mas têm pouca ou nenhuma ação sobre a evolução da doença. Ou seja, em geral, não têm efeito sobre outros aspectos da inflamação, tais como migração de leucócitos, liberação de enzimas lisossômicas e produção de radicais de oxigênio tóxicos que contribuem para lesões teciduais crônicas, como artrite reumatóide (RANG *et al.*, 2007).

Os glicocorticóides mais utilizados são a hidrocortisona, a prednisolona e a dexametasona. São anti-inflamatórios por excelência e, quando administrados terapêuticamente, apresentam efeitos potentes, pois inibem tanto as manifestações iniciais quanto tardias da inflamação. Suas ações nas células inflamatórias incluem uma menor liberação de neutrófilos dos vasos sanguíneos, redução da ativação de neutrófilos e macrófagos e menor produção de fibroblastos, diminuindo a cicatrização e o reparo. Nos mediadores, há uma diminuição de prostanoídes devido à inibição da expressão da COX-2, produção diminuída de várias citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-8, TNF- α) e aumento de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 (RANG *et al.*, 2007).

Dentre esses glicocorticóides, a dexametasona tem sido amplamente utilizada, devido sua baixa atividade mineralocorticóide, ação prolongada e facilidade de administração e também de baixo custo (ALBINO JÚNIOR *et al.*, 2004; CUPOLILO *et al.*, 2007), por isso é escolhida como controle para experimentos em modelos de inflamação em animais (VANDERLEI *et al.*, 2010; ARAÚJO *et al.*, 2011). Porém, a toxicidade associada à terapia crônica com os glicocorticóides limita o seu uso (CUPOLILO *et al.*, 2007).

Dentre os efeitos indesejáveis dos glicocorticoides, destacam-se as alterações da distribuição de gordura (obesidade centrípeta, face em lua cheia), osteoporose, alterações menstruais e da libido, manifestações cutâneas, endócrinas, hematopoéticas, imunológicas, dentre outras (LONGUI, 2007).

Assim, observa-se que grande parte das drogas anti-inflamatórias disponíveis comercialmente exerce uma ampla gama de efeitos indesejáveis significativos que podem restringir seu uso. Neste sentido, a busca de alternativas eficazes e seguras ainda representa um desafio da pesquisa pré-clínica e clínica.

1.6. Parâmetros toxicológicos

1.6.1. Parâmetros hematológicos

O sangue humano é um tecido vivo formado por uma porção celular que circula em suspensão no meio líquido, o plasma. Esta porção celular é composta pelas hemácias (células vermelhas), leucócitos (células brancas) e plaquetas (LORENZI, 2006).

A hematologia compreende o estudo das células do sangue e da coagulação, estrutura e função das células, além dos seus precursores na medula óssea, constituintes químicos do plasma intimamente ligados à estrutura e função das células sanguíneas, bem como a função das plaquetas envolvidas na coagulação sanguínea (MORRIS, DAVEY, 1999).

O hemograma avalia os elementos celulares do sangue (hemácias, leucócitos e plaquetas), de forma quantitativa e qualitativa, em que é feita a contagem de todos os elementos do sangue, incluindo uma avaliação do número, tamanho e aparência dos mesmos (MANSON, 2004).

Constitui um importante auxílio diagnóstico para doenças hematológicas e sistêmicas, tais como a avaliação de anemias, neoplasias hematológicas, reações infecciosas e inflamatórias, acompanhamento de terapias medicamentosas, como a quimioterapia e ainda avaliação de distúrbios plaquetários. Fornece dados para a classificação de anemias, de acordo com as alterações na forma, tamanho, cor e estrutura das hemácias e consequente direcionamento diagnóstico e terapêutico. Além disso, permite fazer a diferenciação entre infecções virais e bacterianas, parasitoses, inflamações, intoxicações e neoplasias através das contagens global e diferencial dos leucócitos e sua avaliação morfológica. A partir da avaliação quantitativa e morfológica das plaquetas, é possível sugerir o diagnóstico de patologias congênitas e adquiridas (HENRY, 1999).

O hemograma é composto pelo eritrograma, leucograma e contagem de plaquetas. O eritrograma é composto pela contagem de eritrócitos (CE), valor da hemoglobina (HGB), valor

do hematócrito (HCT) e os índices hematimétricos, que são: volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM) (FAILACE, 2003).

O número de eritrócitos por milímetro cúbico fornece uma estimativa indireta do conteúdo de hemoglobina no sangue (RAVEL, 1997). Os eritrócitos formados na medula óssea transportam oxigênio para todas as partes do corpo e têm seu período de vida estimado em 120 dias. A contagem de eritrócitos é diminuída nos casos de anemia, falta de células de hemocitopoiese é aumentada em casos de hemoconcentração, como na desidratação, hipertensão arterial, intoxicação por CO e feocromocitoma. Um grande aumento no número de eritrócitos é indicativo de policitemia (SOARES *et al.*, 2002, MANSON, 2004).

A hemoglobina é o principal componente do eritrócito e constitui cerca de um terço do volume do mesmo. É uma proteína conjugada que serve como veículo para o transporte de oxigênio e gás carbônico do sangue (MORRIS, DAVEY, 1999). A concentração de hemoglobina é diminuída na anemia e aumentada na policitemia, hipóxia e em condições renais, onde há um excesso na produção de eritropoetina e desidratação (MANSON, 2004).

O hematócrito de uma amostra de sangue é expresso como a percentagem do volume total de sangue ocupado pelos elementos figurados. O valor do hematócrito é baixo em todas as anemias e pode também indicar uma hemorragia interna antes de qualquer sintoma tornar-se aparente. Sua elevação, acima dos valores normais, pode depender do aumento do número de hemácias (policitemia) ou da diminuição do volume plasmático (hemoconcentração), como ocorre nas desidratações, no choque e nas queimaduras (MILLER, 1999, MANSON, 2004).

Segundo Bain (1997), a partir das determinações relativas dos valores de contagem de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito, podem ser calculados os índices hematimétricos: volume corpuscular médio, dado em fentolitro (fL ou 10^{-15} litro), que é a razão entre o hematócrito em valor percentual x 10 pela contagem de eritrócitos, ou seja, **VCM (fL) = HCT (%) x 10 / CE** ($10^6/\mu\text{L}$); a hemoglobina corpuscular média, dada em picogramas (pg ou 10^{-12} gramas), que é calculada pela seguinte fórmula: **HCM (pg) = HGB (%) x 10 / CE** ($10^6/\mu\text{L}$) e a concentração hemoglobínica corpuscular média, dada em grama por decilitro, é calculada por: **CHCM (g/dL) = HGB (%) x 10 / HCT (%)**.

O leucograma é composto pela contagem total e contagem diferencial de leucócitos. Na contagem total, não é feita qualquer diferenciação entre os tipos celulares normais (polimorfonucleares, monócitos e linfócitos) (MORRIS, DAVEY, 1999).

Segundo Latimer e Meyer (1992), os leucócitos participam da defesa do hospedeiro contra os patógenos e da vigilância e remoção dos antígenos não-próprios. São formados em parte, na medula óssea (os granulócitos, monócitos e alguns linfócitos) e no tecido linfóide. É sabido que o timo desempenha um papel importante no desenvolvimento e manutenção de um sistema imunológico competente, porque as células imunes (os linfócitos) se originam na medula óssea e saem na forma de pré-T e B para o sangue. Os pré-T vão ao timo e adquirem a imunocompetência. Estes órgãos que dão origem aos linfócitos T (timo) e B (medula óssea) são denominados órgãos linfóides primários (WINDMILL, LEE, 1998).

Após sua formação, são transportados pelo sangue para diferentes partes do corpo, onde serão utilizados. Os granulócitos e os monócitos desenvolvem-se exclusivamente na medula óssea, já os linfócitos desenvolvem-se principalmente nos linfonodos e no baço (KERR, 2003).

Um aumento na contagem dos leucócitos (leucocitose) ocorre comumente como resultado de infecções, inflamação ou de qualquer injúria tissular no organismo. A redução dessas células (leucopenia) é menos comum do que o aumento. Contudo, a leucocitose pode ser benigna, enquanto que a leucopenia sempre indica que um problema está presente (MANSON, 2004).

As plaquetas são discos delgados que têm funções na homeostase, na manutenção da integridade vascular e no processo de coagulação do sangue. Com os recentes avanços na contagem automática de células sanguíneas, pode ser feita numa rápida determinação. Vêm sendo estudadas em doenças causadas por injúria vascular (MORRIS, DAVEY, 1999; GIACOMINI *et al.*, 2001).

1.6.2. Parâmetros bioquímicos

1.6.2.1. Transaminases glutâmico-oxalacética e pirúvica (TGO e TGP)

A transaminase glutâmico-oxalacética (TGO), também chamada aspartato amino-transferase (AST) e a transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) ou alanina amino-transferase

(ALT) participam de reações do catabolismo protéico, denominadas de transaminação, em que o grupo α -amino é removido dos L-aminoácidos e transferidos para um α -cetoácido, para que eles alcancem o fígado. São importantes para o diagnóstico de lesões cardíacas ou hepáticas causadas por infarto, toxicidade por drogas ou infecções. Numa lesão cardíaca, as transaminases extravasam das células cardíacas para a corrente sanguínea, portanto os resultados obtidos relacionados a essas enzimas podem fornecer informações importantes sobre a gravidade da lesão. Em casos de exposição a solventes industriais, a atividade dessas enzimas é alta no fígado e provavelmente elas estarão entre as proteínas que são liberadas dos hepatócitos lesionados (NELSON, COX, 2011).

1.6.2.2. Fosfatase alcalina

A fosfatase alcalina é uma isoenzima óssea, que é expressa em um dos vários membros da família de mamíferos, apresentando níveis séricos mais elevados no fígado, ossos, rins e na placenta durante o primeiro trimestre da gravidez, e em níveis mais baixos em vários outros tecidos (MILLÁN, 2006a). É uma enzima que catalisa a hidrólise de monoésteres de ácido fosfórico e também catalisa uma reação de transfosforilação na presença de grandes concentrações de aceptores de fosfato, incluindo nucleotídeos e proteínas (MILLÁN, 2006b). Pouco é conhecido sobre a rota da fosfatase alcalina em doenças hepáticas, mas sabe-se que sua concentração é elevada em patologias como colestase e icterícia (XU, LU, ZHANG, 2002).

1.6.2.3. Uréia

A amônia depositada no fígado é convertida em uréia através do ciclo da uréia, que tem seu início na mitocôndria hepática, em seguida, enviada para os rins através da circulação sanguínea, sendo posteriormente excretada na urina. Dessa forma, é considerado um marcador de função renal muito utilizado (NELSON, COX, 2011).

Em condições normais, o rim é o órgão principal para eliminar uréia e seus metabólitos. No entanto, em condições patológicas, tais como uremia, o intestino pode substituir os rins na depuração de metabólitos (LONG *et al.*, 2009).

A uréia sérica é originada principalmente por decomposição de proteínas e absorção intestinal. Muitas doenças, tais como distúrbio renal agudo, doenças infecciosas, hipertireoidismo grave podem causar um aumento nos níveis séricos de uréia. Conseqüentemente, o aumento da uréia provoca uremia, que é a mais comum desordem caracterizada por concentrações aumentadas de uréia, ácido úrico e creatinina no sangue (YANG *et al.*, 2004; LONG *et al.*, 2009).

1.6.2.4. Creatinina

É uma substância provinda do metabolismo muscular, que pode ser elevada por um aumento na ingestão diária de proteínas. É dependente da taxa de produção e de eliminação no filtrado glomerular. Quando em repouso, o organismo apresenta taxas de produção e de eliminação de creatinina equivalentes e quando a produção de creatinina é constante, a concentração de creatinina no plasma aumenta quando a excreção renal diminui (HARMONIEN, 2001).

A concentração sérica da creatinina é interpretada como uma medida para a velocidade da filtração glomerular e também usada como índice de função renal. Se os rins não estão conseguindo eliminar a creatinina produzida diariamente pelos músculos, eles provavelmente também estarão tendo problemas para eliminar outras substâncias do metabolismo, incluindo toxinas. Portanto, um aumento da concentração de creatinina no sangue é um sinal de insuficiência renal. Com isso, as determinações de creatinina são executadas para fazer o diagnóstico e monitorização de doenças renais agudas ou crônicas (WHELTON, 1994).

1.6.3. Histologia

A histologia é a ciência que se dedica à investigação da estrutura e funcionamento dos tecidos orgânicos. Os estudos histológicos desenvolvem-se sobre dois campos principais: anatômico, visando obter a completa caracterização estrutural dos tecidos e das células que os compõem, e fisiológica, que procura compreender o modo pelo qual os tecidos desempenham a sua função (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1999).

A obtenção de uma peça histológica se dá em 5 etapas, que são: fixação, que torna as proteínas insolúveis a fim de se evitar a destruição das células por bactérias ou por autólise, mantendo a morfologia e função dos tecidos; desidratação, que remove a água dos tecidos, tornando-os aptos a serem envolvidos por substâncias de consistência firme que facilitará a obtenção dos cortes a serem estudados; clareamento, cuja peça é embebida em uma mistura constituída de parafina e xilol ou benzol; impregnação, onde a parafina penetra nos vasos, nos espaços intercelulares e no interior das células, impregnando o tecido e tornando mais fácil a obtenção dos cortes pelo micrótomo e, inclusão, que é a obtenção do bloco de parafina de forma regular, que em seguida deverá ser cortado em micrótomo e submetido ao coramento. A maioria dos corantes usados na histologia comporta-se como ácidos ou bases e tendem a formar ligações salinas com radicais ionizáveis presentes nos tecidos. Os componentes dos tecidos que se coram com corantes básicos são chamados basófilos e os que se coram com corantes ácidos são chamados acidófilos. A coloração dupla por hematoxilina e eosina é a mais usada, pelo fato de a hematoxilina corar em azul os núcleos celulares e outras estruturas de natureza ácida, enquanto a eosina cora o citoplasma e o colágeno do material extracelular em diversas tonalidades do vermelho (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1999).

Para Junqueira e Carneiro (1999), várias outras técnicas de estudo contribuíram para ampliar ainda mais o campo da histologia, que atualmente é estudada no conceito de histofisiologia, histoquímica, imuno-histoquímica e histopatologia. A histoquímica indica reações químicas específicas ou interações macromoleculares de alta afinidade, possibilitando a visualização inclusive de íons como ferro e fosfato. A imuno-histoquímica tem como objetivo utilizar marcadores nos anticorpos, que se combinam a antígenos específicos, possibilitando localizar certas macromoléculas com precisão. Esses anticorpos podem ser marcados através de conjugação a um composto fluorescente, ou a uma enzima ou a uma substância que não se deixa atravessar pela luz e que dispersa elétrons.

A histopatologia descreve as alterações histológicas em lesões celulares reversíveis e nas células mortas. As alterações reversíveis são também denominadas de degenerações, que são resultantes de lesões não-letais para as células. Dois aspectos podem ser reconhecidos sob o microscópio óptico: a tumefação celular e a metamorfose gordurosa. A tumefação aparece quando a célula é incapaz de manter a homeostase iônica e fluida, que se deve a falha no transporte ativo dentro da membrana da célula (bomba de sódio), gerando um aumento no

tamanho da célula pela entrada de água do meio extracelular para o interior da célula. É um indicador de lesão discreta sem efeito funcional importante e sua principal importância é que pode anteceder lesões mais graves. Já a metamorfose gordurosa também indica lesão reversível, menos universal, estando mais presente em células do metabolismo gorduroso como as dos hepatócitos e do miocárdio. Quando a célula está em processo de morte celular, é denominada de célula necrótica, onde há uma liberação aumentada de enzimas dos lisossomos, gerando o processo de autólise, que provoca uma reação inflamatória, que leva leucócitos e proteínas plasmáticas para a área da infecção. As enzimas lisossomiais liberadas pelos leucócitos, assim como os fatores ativados do plasma, contribuem para uma maior degradação das células mortas, denominada heterólise (FAUSTO *et al.*, 2010).

O fígado é o principal órgão para metabolização de drogas e detoxificação, portanto a hepatotoxicidade em estudos pré-clínicos é um desafio para uso terapêutico de novas drogas, uma vez que as lesões neste órgão vital inviabilizam a adoção de novas terapias (FOLGUEIRA, BRENTANI, 2004). Os rins são órgãos responsáveis pela excreção de resíduos metabólicos e controle da homeostase que, por sua vez, consiste em regular o volume extracelular, metabolismo do cálcio, balanço eletrolítico e controle do balanço ácido-básico. Lesões severas nestes órgãos promovem hipotensão e falência irreversíveis (MIDDENDORF, WILLIAMS, 2000). No coração, a toxicidade causa em nível histológico, infiltrado inflamatório, necrose coagulativa e arteriosclerose (MORAES, 2009).

Diante do exposto, observa-se que o estudo toxicológico pré-clínico de um determinado composto é de fundamental importância, pois caracteriza os efeitos deletérios produzidos a partir de sua administração numa concentração capaz de provocar efeitos tóxicos em animais de experimentação (EATON, KLAASSEN, 1996). Conseqüentemente, diversas pesquisas se propõem obter novos fármacos, através da modificação molecular de substâncias naturais e/ou sintéticas com propriedades farmacológicas definidas, representando uma fonte ampla e inesgotável de substâncias potencialmente ativas a serem testadas (DI STASI, 1996).

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar as atividades antiviral e anti-inflamatória de uma fração polissacarídica sulfatada da alga marinha vermelha *Gracilaria birdiae*.

2.2. Específicos

- Extrair os polissacarídeos sulfatados totais (PST) da alga marinha vermelha *Gracilaria birdiae* e fracioná-los por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose;
- Avaliar os PST e as frações polissacarídicas sulfatadas obtidas do procedimento cromatográfico (DEAE-celulose) por eletroforese em gel agarose;
- Determinar os teores de carboidratos totais, proteínas contaminantes e de grupos sulfato dos PST e das frações polissacarídicas sulfatadas obtidas;
- Determinar a massa molecular das frações polissacarídicas sulfatadas por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC);
- Determinar as características estruturais das frações polissacarídicas sulfatadas por espectroscopia de absorção no infravermelho;
- Avaliar a atividade antiviral *in vitro* da fração polissacarídica sulfatada de maior rendimento (FI) contra vírus do herpes simples (HSV-1 e HSV-2), da dengue (DENV-1) e adenovírus;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória *in vivo* da FI utilizando os ensaios de migração celular induzido por carragenina, do edema de pata induzido por carragenina e dextrana e pela da enzima mieloperoxidase em ratos;
- Investigar o envolvimento da via heme oxigenase na atividade anti-inflamatória da fração FI em ratos;
- Avaliar a toxicidade sistêmica da FI por dose única e os parâmetros bioquímicos, hematológicos e histológicos por dose repetida durante 14 dias em camundongos.

3. MATERIAIS

3.1. Alga marinha

A alga marinha vermelha *Gracilaria birdiae* (Figura 11) (registrada sob n° 40781 no herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará, UFC) foi coletada na Praia de Flecheiras, município de Trairi–CE em agosto/2008, durante a maré baixa de sizígia e conduzida ao Laboratório de Carboidratos e Lectinas (CarboLec) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC. No laboratório, a alga foi limpa para a retirada de epífitas e/ou outros organismos incrustantes, lavadas com água destilada e armazenadas (-20 °C) até o uso.

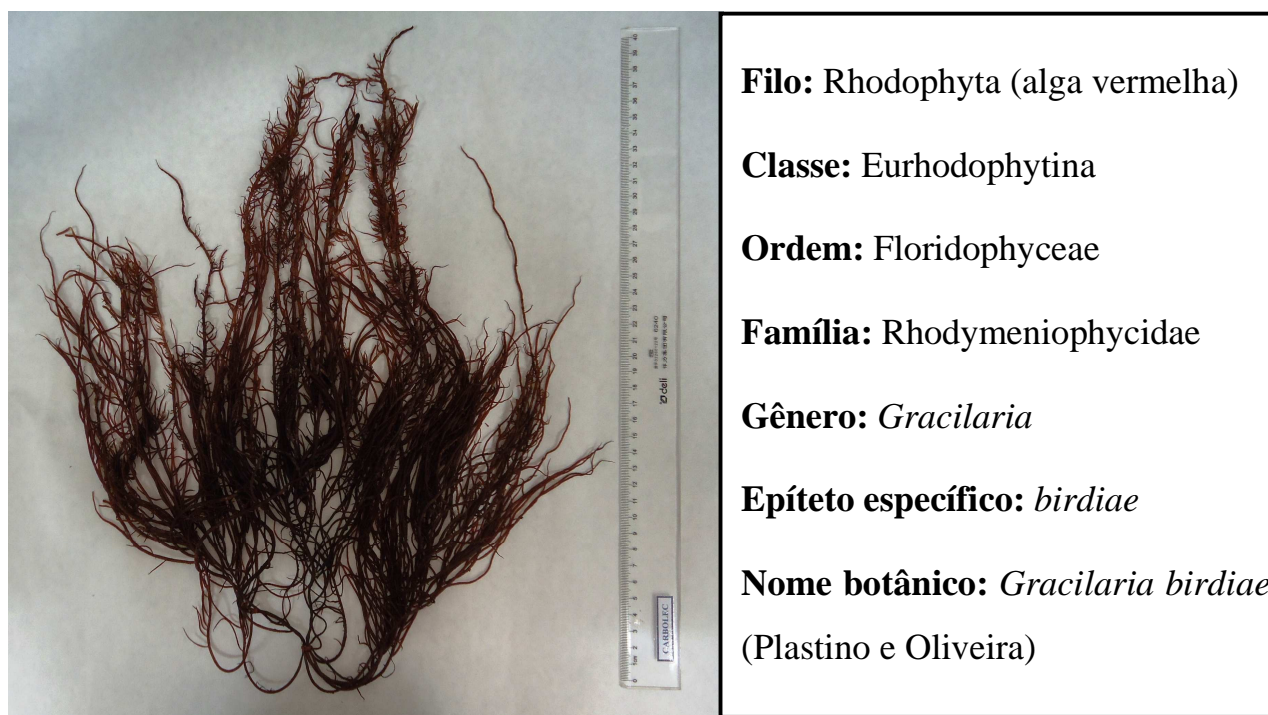


Figura 11: Aspecto macroscópico da alga marinha vermelha *Gracilaria birdiae* e sua classificação taxonômica. Fonte: Fotografia retirada por Ianna Araújo, 2011.

3.2. Animais

Foram utilizados camundongos Swiss (20-25g) e ratos Wistar (160-220g), no total de seis animais por grupo, fornecidos pelo biotério central do Campus do Pici-UFC. Os animais receberam água e alimentação *ad libitum*. Todos os esforços foram feitos para minimizar o número e o sofrimento dos animais utilizados.

Ao final de cada experimento, os animais foram eutanasiados por overdose de hidrato cloral e suas carcaças congeladas para posterior incineração. Os ensaios com os animais seguiram os padrões exigidos de ética e biossegurança, respeitando os princípios dos 3 R's da experimentação animal ("reduction, replacement and refinement"). Considerou-se este trabalho como parte integrante do projeto intitulado "Bioprospecção de polímeros de algas marinhas com potencial biotecnológico", sendo aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa com Animais de laboratório da UFC (CEPA nº 80/10) (em anexo).

3.3. Células e Vírus

As células necessárias para os ensaios antivirais foram as células HEp-2 (linhagem de células provenientes de carcinoma de laringe humana) que foram mantidas em meio mínimo essencial de Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM) e incubadas a 37 °C; células Vero [linhagem de células de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*)], mantidas em meio mínimo essencial de Eagle e incubadas a 37 °C; células LLC-MK2 (linhagem de células de rim de macaco *Macaca mulata*; 5×10^5 células/mL), crescidas em meio mínimo essencial de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM-Eagle). e mantidas a 37 °C e células C6/36 do mosquito *Aedes albopictus*, mantidas em meio L-15 (Leibovitz) + RPMI (1:1; v/v) a 27 °C.

Todos os meios foram suplementados com L-glutamina 3mM, 50mg/mL de gamicina, 2,5 mg/mL de fungizona, bicarbonato de sódio a 0.25 % e 10 % de soro fetal bovino (SFB) em atmosfera contendo 5 % de CO₂.

Todos os meios de cultura foram submetidos à filtração em membrana Millipore (0,22 µm), transferidos para recipientes previamente estéreis e mantidos a 4 °C, para estocagem.

As células foram crescidas em garrafas de vidro especializadas em cultura celular, contendo meio de cultura, até que uma das faces da garrafa de cultivo celular preenchesse pelo

menos 80% de confluência, formando uma monocamada. Em seguida, a suspensão celular foi transferida para placas de 96 poços, mantidas em confluência superior a 80 %, para alcançar as condições ideais necessárias ao tratamento com a fração polissacarídica da alga *Gracilaria birdiae*, utilizada neste estudo.

As amostras de adenovírus tipo 19 e 41 (Ad-19 e Ad-41) foram cedidas pelo Laboratório de Virose Respiratórias, Entéricas e Oculares e as amostras dos vírus herpes simples 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2) e do sorotipo viral 1 da dengue (DENV-1) foram cedidas pelo Laboratório Experimental de drogas Antivirais e Citotóxicas, ambos do Departamento de Virologia/IMPG/UFRJ.

Os vírus foram mantidos em freezer -20 °C. As condições de trabalho foram realizadas de acordo com as normas de biossegurança, na qual todos os experimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar.

3.4. Material testado

A fração polissacarídica da alga em estudo foi solubilizada em dimetil sulfóxido (DMSO) para uma concentração final de 1 %, seguida da solubilização em água destilada, sendo obtida uma solução estoque de concentração de 1000 µg/mL. Em seguida, a solução foi filtrada em membrana Millipore (0,22 µm), armazenada em tubo rosqueado previamente esterilizado e mantido a -20 °C até sua utilização.

4. MÉTODOS

4.1. Extração dos polissacarídeos sulfatados totais

A extração dos polissacarídeos sulfatados totais (PST) da alga *Gracilaria birdiae* foi realizada segundo FARIAS *et al.* (2000), com algumas modificações. Inicialmente, a alga foi seca à temperatura ambiente, macerada com N₂ líquido e colocada em contato com o tampão de extração acetato de sódio 0,1 M e pH 5,0 (proporção 1:50, m/v) contendo EDTA 5 mM e cisteína 5 mM e digerida com 510 mg de uma solução de papaína bruta (30 mg/mL) durante 6 horas a 60 °C em banho-maria. Em seguida, o homogenato foi filtrado e os polissacarídeos sulfatados

presentes no filtrado foram precipitados através da adição de 16 mL de cloreto de cetilpiridínio (CCP) a 10% (24 h; 25 °C), seguido de centrifugação a 2500 x g, 20 °C, 30 min. O precipitado obtido foi lavado com 200 mL de CCP 0,05 %, centrifugado nas mesmas condições acima descritas e o precipitado obtido foi dissolvido em 174 mL de uma solução de NaCl 2 M: etanol comercial (100: 15; v/v) e novamente precipitado através da adição de 200 mL de etanol comercial (24 h; 4 °C). Após centrifugação nas mesmas condições acima descritas, o precipitado obtido foi lavado duas vezes com 200 mL de etanol a 80 % e uma vez com 200 mL de etanol comercial, sempre seguidas de centrifugação. O precipitado final obtido após diálise contra água destilada, foi liofilizado e denominado de PST (Figura 12).

4.2. Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose

Inicialmente, os PST (30 mg) foram dissolvidos em 15 mL de tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,0 e submetidos à cromatografia de troca iônica em matriz de DEAE-celulose (28 cm x 2,0 cm).

A matriz foi previamente equilibrada com o mesmo tampão até a completa remoção dos polissacarídeos não retidos, seguido do fracionamento dos PST por eluição com o mesmo tampão de equilíbrio, contendo cloreto de sódio em diferentes concentrações (0,5; 0,75 e 1 M) utilizando um coletor de frações com fluxo ajustado para 2,5 mL/min.

As frações polissacarídicas de 5 mL obtidas foram monitoradas a 525 nm, através da reação metacromática usando o reagente azul de 1,9-dimetilmetileno (ADM) segundo Farndale, Buttle e Barret (1986) e as leituras de absorbâncias realizadas em espectrofotômetro Amersham Biosciences. As frações obtidas foram dialisadas exaustivamente contra água destilada e liofilizadas.

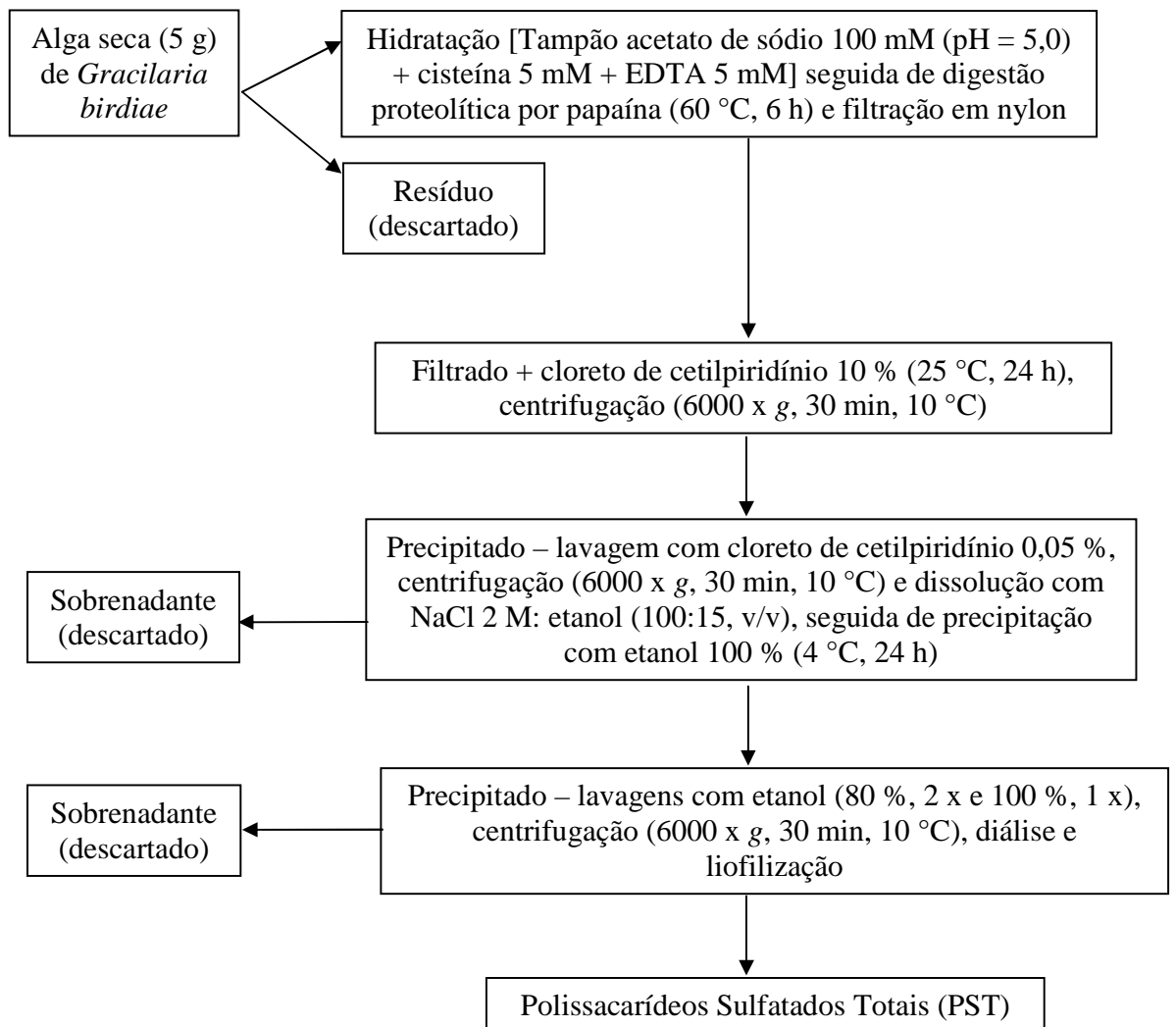


Figura 12: Fluxograma de obtenção dos PST da alga marinha vermelha *Gracilaria birdiae*.

4.3. Eletroforese em gel de agarose

Os PST e as frações obtidas (25 µg) foram analisados quanto a sua densidade de carga, por eletroforese em gel de agarose 0,5 % em tampão 1,3-acetato diaminopropano 0,05 M, pH 9,0. A corrida foi realizada em voltagem constante (110 V) durante 60 min. Após o procedimento, os PST e as frações presentes no gel foram fixados com uma solução de *N*-cetil-*N,N,N*-brometo de trimetilamônio (cetavlon) 0,1 % por 24 horas. Em seguida, o gel foi corado com azul de toluidina 0,1% e descorado com uma solução contendo etanol absoluto, água destilada e ácido acético concentrado (4,95: 4,95: 0,1; v/v/v) como descrito por Dietrich e Dietrich (1976).

4.4. Determinação do teor de carboidratos totais, proteínas e sulfato

O teor de carboidratos totais dos PST e das frações foi determinado pelo método do fenol-ácido sulfúrico em microplaca (MASUKO *et al.*, 2005) utilizando a galactose para a obtenção da curva padrão em leitor de ELISA. O conteúdo de proteínas contaminantes foi estimado pelo método descrito por Bradford (1976), usando albumina sérica bovina como padrão. O teor de sulfato foi determinado pelo método gelatina-bário descrito por Dodgson e Price (1962), usando sulfato de sódio para a obtenção da curva padrão.

4.5. Espectroscopia de absorção por infravermelho

As frações polissacarídicas foram caracterizadas por espectroscopia de infravermelho. O espectro de infravermelho por transformação de Fourier (FT-IR) foi registrado pelo aparelho Shimadzu IR spectrophotometer (modelo 8300) entre 4000 e 500 cm^{-1} . As amostras foram analisadas em pastilhas de KBr.

4.6. Cromatografia de permeação em gel (GPC)

As distribuições das massas molares das frações polissacarídicas, obtidas por cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose, foram estimadas por meio de cromatografia de permeação em gel (GPC), utilizando um equipamento SHIMADZU, com detectores de índice de

refração e UV-visível a 254 nm. Uma coluna ULTRAHYDROGEL de 7,8 x 300 mm foi utilizada, com fase móvel em NaNO₃ 0,1 M e fluxo de 0,5 mL/min.

As frações polissacarídicas (0,5 e 0,75 M) foram dissolvidas em H₂O, seguido da adição de 1 mL de NaNO₃ 0,2 M e injetadas (50 µL) no equipamento. Para construção da curva de calibração foram utilizadas Pululanas de diferentes massas molares ($5,9 \times 10^3$; $1,18 \times 10^4$; $4,73 \times 10^4$; $2,12 \times 10^5$ e $7,88 \times 10^5$ g/mol). A equação obtida a partir da curva de calibração foi $\log Mw = 14,10603 - 0,95109 V_e$, onde V_e é o volume de eluição em mL. O coeficiente de correlação linear obtido para esta equação foi de 0,9907.

4.7. Atividade antiviral

4.7.1. Toxicidade da fração polissacarídica para cultura de células

A toxicidade da fração polissacarídica para cultura de células Vero, HEp-2, C6/36 e LLC-MK2 foi determinada baseando-se na alteração morfológica (De CLERCQ *et al.*, 1980) e na viabilidade celular, utilizando a técnica “dye-uptake” de Borefreund e PuAerner (1985), com pequenas modificações.

4.7.1.1. Verificação da morfologia celular

As células foram tratadas com diluições seriadas da fração polissacarídica, variando de 500 a 7,8 µg/mL, usando meio de cultura sem SFB como diluente, incubadas por 48 horas a 37 °C (células Vero, HEp-2 e LLC-MK2) e por 7 dias para as células C6/36 em ambiente com 5 % de CO₂. Decorridas 48 h ou 7 dias, as células foram observadas em microscópio óptico invertido e comparadas com o controle (apenas meio de cultura). A maior concentração da fração polissacarídica que não mostrou alteração da morfologia celular, foi denominada de Concentração Máxima Não Tóxica (CMNT) e passou a ser utilizada nos experimentos posteriores.

4.7.1.2. Viabilidade Celular

A técnica de viabilidade celular consiste na incorporação do corante vermelho neutro às células vivas e sua posterior quantificação através das medidas de absorção de luz em espectrofotômetro a 492 nm. A percentagem de células viáveis foi obtida pela fórmula: $[(A_{492\text{nm}}$ da fração polissacarídica)-($A_{492\text{nm}}$ do controle de células)]/[$A_{492\text{nm}}$ do corante vermelho neutro]-($A_{492\text{nm}}$ do controle de células)] x 100. A partir dos resultados obtidos, foi calculada a concentração que reduz a contagem de células viáveis em 50 % (CC₅₀).

4.7.2. Atividade Antiviral *in vitro*

Na avaliação da atividade antiviral *in vitro*, foi realizada previamente uma titulação dos vírus presentes em culturas de tecido com o objetivo de se obter as TCID₅₀/mL, que foi calculada de acordo com Reed e Muench (1938).

O ensaio foi realizado em placas de 96 poços, utilizando-se diluições seriadas da fração polissacarídica a partir da sua CMNT, seguido da adição da suspensão viral (100 TCID₅₀/mL). Como controle de vírus (positivo), foram utilizadas células cultivadas na presença da suspensão viral e, como controle negativo, foram utilizadas células cultivadas na ausência do vírus, na ausência da fração polissacarídica. Este procedimento foi realizado para todos os vírus utilizados neste trabalho, variando apenas o período de incubação (adenovírus, HSV-1 e HSV-2 foram incubados por 48 h e DENV-1 durante 7 dias).

Para os HSV e adenovírus, o grau de atividade antiviral foi expresso em índice de inibição viral (IIV) e percentagem de inibição (PI). O IIV foi obtido pela fórmula proposta por Lagrota (1978): $IIV = B - A$; onde B é o título do vírus na cultura de células na ausência da fração polissacarídica (controle) e A é o título do vírus na cultura de células na presença da fração polissacarídica. A PI foi calculada de acordo com a fórmula proposta por Nishimura, Toku e Fukuyashu (1977): $PI = [1 - (\text{antilog } T / \text{antilog } C)] \times 100$; onde T corresponde às unidades infecciosas na cultura de células tratadas com a fração polissacarídica e C corresponde às unidades infecciosas na cultura de células não tratadas (controle).

Para o DENV-1, o RNA viral foi extraído e uma reação de RT-PCR em tempo real realizada para a detecção do genoma do DENV-1. A atividade antiviral foi avaliada comparando

o número de cópias do genoma viral, obtido dos sobrenadantes das culturas de células na presença da fração polissacarídica, com os do controle de vírus, não tratados com a fração.

Para todos os vírus, a dose efetiva capaz de inibir 50% do efeito citopático viral (EC_{50}) foi calculada por regressão linear dose resposta. O índice de seletividade (IS) foi determinado pela razão entre CC_{50}/EC_{50} .

4.8. Atividade anti-inflamatória

4.8.1. Ensaio de migração celular induzida por Carragenina (Cg)

O ensaio de migração celular seguiu a metodologia descrita por Sousa e Ferreira (1985). Os animais (ratos Wistar machos) receberam por via i.p., carragenina tipo λ (Cg) (700 $\mu\text{g}/\text{cavidade}$) dissolvida em 1 mL de salina estéril. Após 4 horas da injeção do estímulo inflamatório, os animais foram eutanasiados por injeção de hidrato cloral (10 %) no volume de 1 mL/100 g; i.p. O líquido da cavidade peritoneal foi coletado após uma lavagem realizada por uma injeção de 10 mL de salina estéril, contendo 5 UI/mL de heparina. Em seguida, os abdomens dos animais foram levemente massageados e, através de uma incisão, foram retirados aproximadamente 7 mL de fluido peritoneal.

Grupos de animais receberam 60 minutos antes do estímulo inflamatório: solução salina estéril (s.c.); Dexametasona (1 mg/kg; s.c.); Fração Polissacarídica da alga marinha *Gracilaria birdiae* nas doses de 5, 10 ou 20 mg/kg; s.c. Um grupo adicional recebeu apenas solução salina estéril, sem Cg.

A contagem total dos leucócitos foi realizada, através da coleta de 20 μL do fluido do peritoneal de cada animal, que foi diluído em 380 μL do reagente de Turk para coramento e posteriormente usado para a contagem total de leucócitos em câmara de Neubauer. A contagem diferencial das células sanguíneas foi realizada através de amostras coradas em lâminas. Para tanto, 50 μL do líquido peritoneal foi centrifugado em uma citocentrífuga (1500 rpm ; 10 min). Após este processo, as amostras foram coradas pelo método de Hematoxilina-Eosina (HE) e as células contadas através de microscopia óptica. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média do número de células $\times 10^3/\text{mm}^3$ de fluido peritoneal.

4.8.2. Edema de pata induzido por Carragenina (Cg)

Os animais (ratos *Wistar* machos) receberam o estímulo inflamatório por Carragenina tipo λ (Cg) (500 $\mu\text{g/pata}$; 100 μL) dissolvida em salina estéril. A solução foi injetada na pata traseira direita do animal, como descrito por Winter, Risely e Nuss (1962).

Grupos de animais receberam 60 minutos antes do estímulo inflamatório: solução salina estéril (s.c.); Dexametasona (Dexa 1 mg/kg; s.c.); fração polissacarídica nas doses de 5, 10 ou 20 mg/kg; s.c. Um grupo adicional recebeu apenas solução salina estéril na pata sem Cg.

O volume da pata foi medido pelo pletismômetro (Panlab, Espanha) antes da injeção de Cg (0h) e 1, 2, 3 e 4 horas após a administração do estímulo.

4.8.3. Avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO)

A infiltração neutrofílica na pata com edema induzida por Cg foi investigada por medida da atividade da MPO como previamente descrita por Bradley *et al.* (1982). O tecido sub-plantar da pata traseira direita foi removido para determinar a atividade da MPO. O tecido da pata (50-70 mg) foi colocado em tampão potássio-fosfato, pH= 6,0, contendo 0,5 % do tampão HTAB (1 mL de tampão/50 mg de tecido) em um homogeneizador de tecido.

O homogenato foi agitado e centrifugado por 5 min a 2500 rpm. A atividade da enzima foi determinada por medida da absorbância (450 nm) em um leitor de ELISA, realizando duas leituras em intervalos de 60 s, usando 1 mM de diidrocloreto de o-dianisidina e 0,0005 % de H_2O_2 em uma microplaca. Uma unidade de MPO foi definida como a que converte 1 μmol de H_2O_2 em água a 22 °C. Os resultados foram expressos como unidades de MPO/mg de tecido.

4.8.4. Edema de pata induzido por Dextrana

Os animais (ratos *Wistar* machos) receberam o estímulo inflamatório de uma solução de Dextrana (400 $\mu\text{g/pata}$; 100 μL) dissolvida em salina estéril. A solução foi injetada na pata traseira direita do animal, como descrito por Maity *et al.* (1998). Grupos de animais receberam 60 minutos antes do estímulo inflamatório: solução salina estéril (s.c.); Dexametasona (Dexa 1 mg/kg; s.c.);

fração polissacarídica nas doses de 5, 10 ou 20 mg/kg; s.c. Um grupo adicional recebeu apenas solução salina estéril na pata sem Dextrana.

O volume da pata foi medido pelo pletismômetro (Panlab, Espanha) antes da injeção da Dextrana (0h) e ½, 1, 2, 3, 4 horas após a administração do estímulo.

4.8.5. Envolvimento da via HO-1 na atividade anti-inflamatória da FI

A análise do envolvimento da via da heme oxigenase (HO-1) na atividade anti-inflamatória da fração polissacarídica, foi realizada segundo metodologia descrita por Freitas *et al.*, 2006, com modificações, na qual os animais foram pré-tratados (s.c.) com ZnPP IX (3 mg/kg). Após 1 h foi injetada a fração polissacarídica (10 mg/kg; s.c.).

Após mais 1 h, carragenina (500 µg/pata; 100 µL) foi injetada na pata direita posterior. O volume da pata foi medido imediatamente antes do estímulo (tempo zero) e nos seguintes intervalos de tempo (1, 2, 3 e 4 h) usando um pletismômetro (PanLab, Espanha). Os resultados foram expressos como a variação no volume da pata (mL), calculado como a diferença para o volume basal (0h).

4.9. Avaliação sistêmica

Taxa de sobrevivência, ereção de pêlos, coçar ou lambar a pata e comportamento geral, foram avaliados durante 48h após uma dose única de fração polissacarídica (10 mg/kg; i.p.) ou salina estéril.

Em adição, perda de massa corporal, alteração no peso dos órgãos, parâmetros bioquímicos e hematológicos foram avaliados em camundongos injetados por uma dose diária de fração polissacarídica (10 mg/kg; i.p.) ou salina estéril por 14 dias consecutivos. A análise histológica também foi realizada.

4.9.1. Parâmetros hematológicos

No 15º dia, todos os animais foram anestesiados com cloral hidratado, e amostras sanguíneas foram coletadas pelo plexo retro-orbitário para a análise hematológica e para

obtenção do plasma para a dosagem bioquímica. A análise hematológica foi realizada usando um analisador automático pocH 100iV DIFF (Sysmex Europe GmbH, Hamburg, Germany).

As amostras sanguíneas (15 μ L) foram aplicadas no analisador automático para medir os seguintes parâmetros: Contagem de eritrócitos (CE), concentração de hemoglobina (HGB), concentração de hematócrito (HCT), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), contagem de plaquetas (PLT), contagem de leucócitos totais e contagem diferencial de leucócitos (leucócitos, monócitos e neutrófilos).

4.9.2. Parâmetros bioquímicos

Para análise bioquímica, o sangue foi centrifugado a 1500 g por 5 min após a obtenção. As amostras séricas foram mantidas em freezer $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a análise. Os parâmetros determinados pelos testes enzimáticos e colorimétricos da LABTEST[®] foram os seguintes: transaminase glutâmico oxalacética (TGO), transaminase glutâmico pirúvica (TGP), creatinina, uréia e fosfatase alcalina.

O procedimento para a dosagem de TGO consistiu em adicionar 50 μ L do substrato TGO em tubos de ensaio (solução de 0,2 M de L-aspartato, 0,002 M α -cetoglutarato, tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4), que foram incubados em banho-maria a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 min, seguido da adição de 10 μ L da amostra (plasma) de cada animal. Após incubação à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos, foram adicionados 50 μ L da solução 0,001 M de 2,4-dinitrofenilhidrazina, homogeneizado e deixado em repouso à temperatura ambiente ($20\text{-}30\text{ }^{\circ}\text{C}$), durante 20 minutos. Em seguida, foram adicionados 500 μ L de hidróxido de sódio 0,4 M e a solução foi deixada em repouso durante 5 minutos, a temperatura ambiente ($20\text{-}30\text{ }^{\circ}\text{C}$). As absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro a 505 nm.

Para a dosagem de TGP, o procedimento consistiu em adicionar 50 μ L de substrato TGP em tubos de ensaios (solução de 0,2 M de L-alanina, 0,002 M α -cetoglutarato, tampão de fosfato 0,1 M, pH 7,4), que foram incubados em banho-maria ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$; 2 min), seguido da adição de 10 μ L da amostra (plasma), homogeneizado e incubado a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos. Posteriormente, foram adicionados 50 μ L da solução 0,001 M de 2,4-dinitrofenilhidrazina, homogeneizado e deixado em repouso à temperatura ambiente ($20\text{ - }30\text{ }^{\circ}\text{C}$), durante 20 minutos. Em seguida, foram

adicionados 500 μL de hidróxido de sódio 0,4 M e a solução foi deixada em repouso durante 5 min, à temperatura ambiente (20 - 30 °C). As absorvâncias foram lidas em espectrofotômetro a 505 nm.

Para a dosagem de uréia, foram utilizados 10 μL de plasma de cada animal para a dosagem de uréia, segundo metodologia descrita pelo fabricante (LABTEST[®]) e utilizando absorvância de 600 nm em espectrofotômetro. Esta metodologia baseia-se em um sistema enzimático-colorimétrico, cuja intensidade da cor formada é proporcional à quantidade de uréia na amostra.

Para a dosagem de creatinina, o procedimento constitui em adicionar 2,0 mL de tampão (solução de hidróxido de sódio 208 mmol/L, tetraborato de sódio 12,7 mmol/L e surfactante), 250 μL da amostra (plasma) e 500 μL de ácido pícrico 44,4 mmol/L, seguida de homogeneização e incubação em banho-maria a 37 °C durante 10 minutos. O teste padrão foi feito utilizando 2,0 mL de tampão, 250 μL da solução padrão (4,0 mg/dL). Em seguida as absorvâncias foram medidas em 510 nm. Posteriormente, foram adicionados 100 μL de acidificante (ácido acético 11,4 mmol/L) na solução contendo o plasma, homogeneizado e deixado em repouso durante 5 minutos em temperatura ambiente. As absorvâncias seguintes foram lidas em 510 nm. A creatinina e outros componentes da amostra reagem com a solução picrato em meio alcalino formando um complexo de cor vermelha. A adição do acidificante diminui o pH para 5,0, promovendo a decomposição do picrato de creatinina, permanecendo inalterado a cor derivada dos cromogênios. A diferença entre as duas leituras fornece o valor da creatinina.

Para a dosagem de fosfatase alcalina, o procedimento constitui em adicionar 50 μL de substrato fosfatase alcalina (timolftaleína monofosfato mmol/L) e tampão de fosfato 300 mmol/L (pH 10,1). Incubar em banho-maria a 37 °C durante 2 minutos, seguido da adição de 50 μL da amostra (plasma), homogeneizado e incubado a 37 °C durante 10 minutos. O teste padrão foi feito utilizando 50 μL de substrato, 500 μL de tampão e 50 μL de solução padrão (45 U/L). Posteriormente, foram adicionados 2,0 mL da solução de carbonato de sódio 94 mmol/L e hidróxido de sódio 250 mmol/L, homogeneizado e as absorvâncias foram lidas em 590 nm. A reação é estável por 120 minutos. A fosfatase alcalina do soro hidrolisa a timolftaleína monofosfato liberando timolftaleína, que tem cor azul em meio alcalino. A cor formada, diretamente proporcional à atividade enzimática. O produto final da reação se constitui de uma mistura de cor azul e a cor própria do substrato.

Após a eutanásia dos animais, os órgãos (fígado, timo, linfonodos, baço, rim e coração) foram removidos e pesados. Possíveis lesões ulcerativas ou hemorrágicas foram quantificadas e medidas macroscopicamente.

4.9.3. Análise histológica

Após a eutanásia dos animais, os órgãos fígado, rim, coração, timo, baço e linfonodos foram removidos para a formação das peças histológicas. Primeiramente, os órgãos foram fixados em formaldeído a 10 % por cerca de 48h. Depois de devida fixação dos tecidos dos órgãos retirados em formol por 48 horas, foram realizados cortes transversais atingindo toda a espessura do fragmento e eleitos dois cortes para serem colocados em cassetes histológicos (PROPHET *et al.*, 1992). O material foi processado rotineiramente para exame histológico em processador automático de tecidos Lupe® modelo PT09 (histotécnico), para ser então desidratado em concentrações crescentes de 70 a 100 % de etanol. Após o processamento, realizou-se a inclusão do material em parafina, utilizando o equipamento para Banho Histológico Modelo BH05. O material nos blocos de parafina foi cortado em 4 µm de espessura e colocado em lâminas histológicas para posterior processo de coloração.

Os cortes histológicos foram obtidos com o auxílio de um micrótomo de impacto (Poycut S, Leica, Alemanha) equipado com navalha de tungstênio de 16 cm, tipo D (Leica, Alemanha), com 5 µm de espessura. Inicialmente foi realizada a coloração pela técnica de hematoxilina e eosina, para avaliação qualitativa dos fragmentos. As lâminas foram montadas utilizando verniz vitral e posteriormente avaliadas em microscópio óptico e examinadas por meio de microscopia de luz (aumento 400 x).

4.10. Análise estatística

Os dados foram apresentados como média ± erro padrão da média (E.P.M.) em triplicata (virologia). Para os testes com atividade anti-inflamatória, foi realizada análise de variância (ANOVA), complementada pelo teste de Bonferroni. Foi também usado o teste t de student para valores não pareados (toxicidade). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Rendimento dos Polissacarídeos Sulfatados Totais

O rendimento dos polissacarídeos sulfatados totais (PST) da alga marinha vermelha *Gracilaria birdiae* obtido a partir da extração enzimática (6 h), seguida de diálise e liofilização foi de 4,66 %. Este rendimento é considerado semelhante aos polissacarídeos obtidos da mesma espécie da alga (*Gracilaria birdiae*) a partir da extração aquosa a frio, que apresentou um rendimento de 6,5 % (MACIEL *et al.*, 2008), porém inferior ao obtido por Souza *et al.* (2012), que realizou extração aquosa quente e obteve rendimento de 27,2 %.

O rendimento dos PST para a alga em estudo foi coerente com o obtido para outras espécies de algas marinhas vermelhas da costa brasileira utilizando a mesma metodologia de extração enzimática, que apresentaram rendimentos que variaram de 2,4 a 46 %, como o das algas *Gelidium crinale* (2,4 %) (PEREIRA *et al.*, 2005) e *Botryocladia occidentalis* (4 %) (FARIAS *et al.*, 2000), *Gracilaria cornea* (18 %) (COURA *et al.*, 2012) e *Solieria filiformis* (19,14 %) (ARAÚJO *et al.*, 2011).

Várias metodologias podem ser empregadas para a extração de polissacarídeos de algas marinhas, tais como aquosa a frio (MACIEL *et al.*, 2008) e a quente (SOUZA *et al.* 2012), enzimática (FARIAS *et al.*, 2000), por tratamento alcalino (STEPHANIE *et al.*, 2010), dentre outras. Porém, a extração por digestão enzimática possui a propriedade de eliminar contaminantes protéicos (PERCIVAL; McDOWELL, 1967). Além disso, o rendimento de polissacarídeos sulfatados de algas marinhas é variável com o protocolo de obtenção e espécie de alga utilizada (MARINHO-SORIANO; BOURRET, 2003).

5.2. Cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose)

O perfil cromatográfico obtido por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose através da propriedade metacromática apresentou duas frações polissacarídicas (F I e F II), eluídas nas concentrações 0,5 e 0,75 M de NaCl, respectivamente. Além disso, o perfil referente ao teor de carboidratos totais das frações eluídas também está representado no cromatograma a seguir (Figura 13).

O maior rendimento (23,6 %) foi obtido com a fração F I, eluída com 0,5 M de NaCl. A fração F II, eluída com 0,75 M de NaCl apresentou rendimento de apenas 6,4 %. A fração F I por ter apresentado maior rendimento, foi escolhida para aos estudos de atividade biológica.

O perfil cromatográfico obtido neste estudo, que mostrou duas frações polissacarídicas eluídas por “stepwise” mostrou-se eficiente e semelhante a outros perfis obtidos para outras espécies de algas descritas na literatura, como por exemplo, o das algas marinhas vermelhas *Solieria filiformis* e *Gracilaria cornea* (ARAÚJO *et al.*, 2011; COURA *et al.*, 2012). Porém, diferentes perfis cromatográficos podem ser obtidos, dependendo da espécie de alga marinha ou dos métodos de extração e secagem utilizados (RODRIGUES *et al.*, 2010; 2011).

5.3. Eletroforese em gel de agarose

O procedimento de eletroforese em gel de agarose 0,5 % mostrou somente uma banda polissacarídica para os PST e para as suas respectivas frações (F I e F II) e exibiu diferentes densidades de carga. Cada fração obtida mostrou uma banda polidispersa, enquanto os PST exibiram uma fraca metacromasia em gel, possivelmente por apresentarem um menor conteúdo de sulfato, como demonstrado na figura 14.

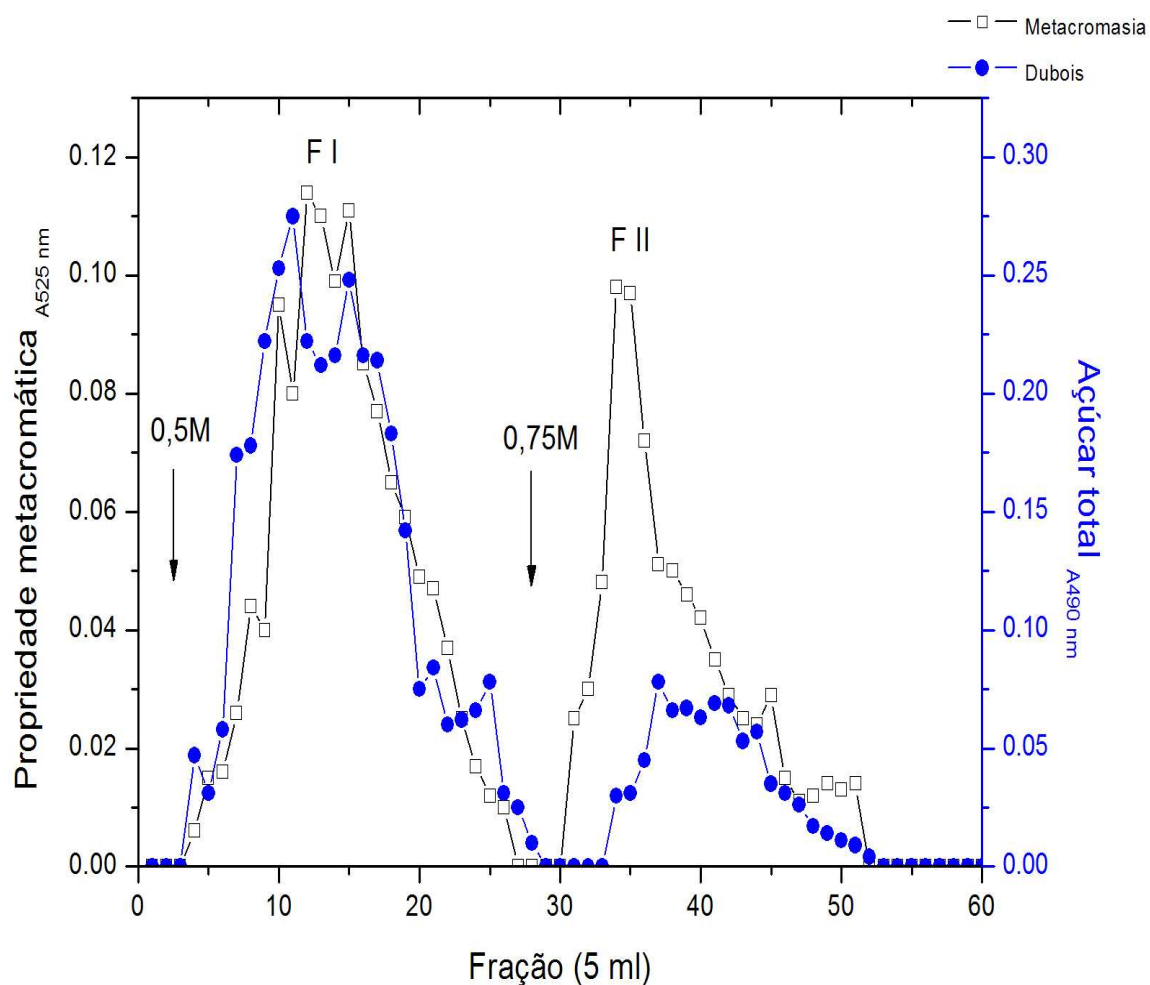


Figura 13. Fracionamento por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose. As frações foram coletadas e checadas por metacromasia usando azul de 1,9-dimetilmetileno (○—○) e pelo teor de carboidrato total, de acordo com o método fenol-ácido sulfúrico (●—●). As setas representam a concentração de NaCl (↓).

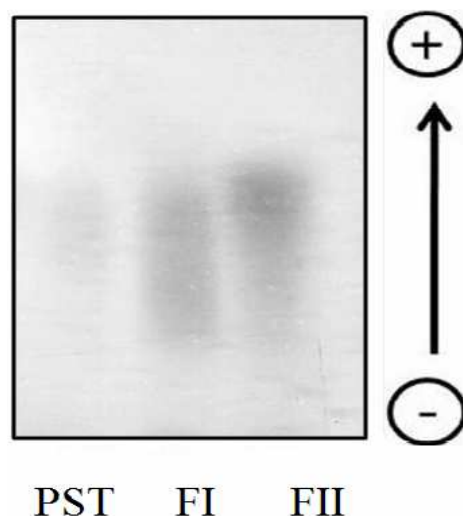


Figura 14. Eletroforese em gel de agarose 0,5% dos polissacarídeos sulfatados totais (PST) e suas frações FI (0,5 M) e FII (0,75 M) reveladas com azul de toluidina a 0,1 %.

O procedimento de eletroforese em gel de agarose pode revelar modelos homogêneos ou polidispersos quando as frações são comparadas entre si ou com os PST (RODRIGUES *et al.*, 2012a). A alga marinha *Gelidium crinale* revelou um perfil eletroforético com três principais frações (F I, F II e F III), sendo que apenas uma fração polissacarídica (F II) apresentou uma banda simples e homogênea (PEREIRA *et al.*, 2005).

Rodrigues *et al.* (2012a) observaram diferenças acentuadas no grau de resolução dos PST e frações da alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresia* por eletroforese em gel de agarose utilizando o método de extração enzimática com papaína e por secagem em estufa. Os autores relataram moléculas polidispersas no gel, similar ao encontrado neste estudo.

5.4. Determinação do teor de carboidratos totais, proteínas e sulfato

Os teores de carboidratos totais solúveis e sulfato dos PST e das frações (F I e F II) de *G. birdiae* estão mostrados na tabela 1.

O teor de carboidratos dos PST (68,2 %) mostrou-se similar ao encontrado por Coura *et al.* (2012) para a alga marinha vermelha *G. cornea* (68,8 %), enquanto que o teor de sulfato da alga em estudo (8,38 %) foi inferior ao da *G. cornea* (15,66 %).

Araújo *et al.* (2011) também avaliaram os teores de carboidratos totais (29,21 %) e sulfato (27,75 %) dos PST da alga marinha *S. filiformis*.

Apesar dos PST de todas as algas descritas acima terem sido obtidos pelo mesmo método de extração, o teor de carboidratos totais solubilizados obtidos para a alga *S. filiformis* mostrou-se inferior aos obtidos para as algas *G. birdiae* e *G. cornea*. Com relação ao teor de grupos sulfato obtido para a alga *S. filiformis* ter se mostrado superior aos das algas *G. birdiae* e *G. cornea*, pode ser justificado pelo fato de os polissacarídeos sulfatados presentes na estrutura da alga *S. filiformis* serem de uma galactana do tipo carragenana, enquanto que os polissacarídeos sulfatados presentes nas estruturas das algas *G. birdiae* e *G. cornea* são galactanas do tipo agarana, que conforme descrita na literatura, as estruturas das agaranas são consideradas menos sulfatadas que as carragenanas (TISCHER, 2006).

No tocante aos conteúdos de carboidratos totais das frações (F I - 37,4 % e F II - 30,8 %) de *G. birdiae*, o maior teor de carboidrato foi observado para a fração F I. Com relação ao teor de sulfato, as duas frações (F I - 14,8 % e F II - 13,22 %), apresentaram valores percentuais semelhantes (Tabela 1).

Araújo *et al.* (2011) também avaliaram os teores de carboidratos totais e sulfato de duas frações eluídas por cromatografia (DEAE-celulose) da alga *Solieria filiformis*. As referidas frações apresentaram teores de carboidratos totais correspondentes a 30,09 e 23,92 % e de sulfato de 12,69 e 22,35 %, respectivamente. Segundo os autores sugeriram, a fração I, corresponde a uma κ -carragenana, de estrutura menos sulfatada e enquanto a fração II corresponde a uma ι -carragenana, que apresenta estrutura mais sulfatada.

Neste trabalho, os PST e as frações obtidas de *G. birdiae* se mostraram isentos de proteínas contaminantes possivelmente pela eficiência do método da digestão enzimática de proteínas utilizando a papaína (RODRIGUES *et al.*, 2010). A mesma eficiência também é reportada para outros estudos com outras espécies de algas vermelhas que utilizaram o mesmo protocolo de extração e/ou de cromatografia deste trabalho (ARAÚJO *et al.*, 2011; COURA *et al.*, 2012).

Tabela 1: Rendimento e composição química dos polissacarídeos sulfatados da alga *Gracilaria birdiae*

<i>Gracilaria birdiae</i>	Carboidrato (%)	Proteína (%)	Sulfato (%)
PST	68,2	-	8,38
F I (0,5 M)	37,4	-	14,81
F II (0,75 M)	30,8	-	13,22

- não detectado

5.5. Espectros de absorção na região do infravermelho

A partir da técnica de espectroscopia de infravermelho (IV), é possível sugerir algumas atribuições de características estruturais para polissacarídeos sulfatados de algas marinhas, sendo a presença de bandas na região de 1400 a 700 cm^{-1} características de galactanas do tipo agarana (Tabela 2).

Os PST da alga *G. birdiae* foram anteriormente caracterizados estruturalmente por técnicas espectrofotométricas de absorção no infravermelho e de ressonância magnética nuclear uni e bidimensional por Maciel *et al.* (2008), que os consideraram como galactanas do tipo agarana.

No presente trabalho, como os PST desta mesma espécie de alga foram fracionados por cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose, conforme descrito anteriormente, resultando em duas frações (FI e FII), estas foram caracterizadas parcialmente pela técnica de infravermelho por espectroscopia transformada de Fourier, no intuito de verificar a ocorrência de alguma modificação estrutural. No entanto, a análise dos espectros de absorção obtidos para as duas frações mostraram-se semelhantes, apresentando 10 sinais na região de 1400 a 700 cm^{-1} (1375, 1258, 1150, 1076, 933, 890, 850, 830, 820, 805 e 775 cm^{-1}) (Figuras 15 e 16).

O sinal 1375 cm^{-1} pode ser atribuído à ligação éster sulfato, os sinais 1258 e 933 cm^{-1} correspondem às vibrações S=O (éster sulfato) e C-O-C (3,6-anidro- α -L-galactopirranose), respectivamente. O sinal de 1076 cm^{-1} está relacionado à forma estrutural de uma galactana. A banda de 890 cm^{-1} corresponde ao sinal de uma agarana. As bandas de 850, 830 e 820 cm^{-1} correspondem à presença de grupos sulfato na estrutura da galactose nas posições C-4, C-2 e C-6,

respectivamente) e a banda 805 cm^{-1} sinaliza a presença do grupo sulfato no C-2 da 3,6-anidro-L-galactose. Estes sinais observados são característicos para agarocolóides, como reportados por Mollet, Rahaoui, Lemoine (1998) e apresentados na Tabela 2. A banda de 770 cm^{-1} é atribuída ao esqueleto do anel piranosídico (MATSUHIRO, 1996) tanto em agaranas quanto em carragenanas. Além disso, a banda de 1150 cm^{-1} pode ser atribuída a vibrações C-O e C-C de estiramento do anel piranosídico, comum a todos os polissacarídeos (GÓMEZ-ORDÓÑEZ, RUPÉREZ, 2011).

A comparação desses resultados aos obtidos para os PST por Maciel *et al.*, (2008) também mostraram-se semelhantes, com exceção dos sinais atribuídos a presença do grupo sulfato no C-2 da galactose (830 cm^{-1}) e no C-2 da 3,6-anidro-L-galactose (805 cm^{-1}), que mostrou-se ausente nos PST da referida alga reportado por Maciel *et al.* (2008).

Tabela 2: Principais sinais característicos de agaranas no infravermelho por espectroscopia transformada de Fourier

Comprimento de onda	Atribuição
1370	Éster sulfato
1250	ν_x S=O (éster sulfato)
1070	forma do esqueleto da galactana
930	vibrações de C-O-C de 3,6-anidro-L-galactose
890	Banda específica de ágar
845	Galactose 4-sulfato
830	Galactose 2-sulfato
820	Galactose 6-sulfato
805	Sulfato no C-2 da 3,6-anidro-L-galactose

Fonte: Melo *et al.*, 2002.

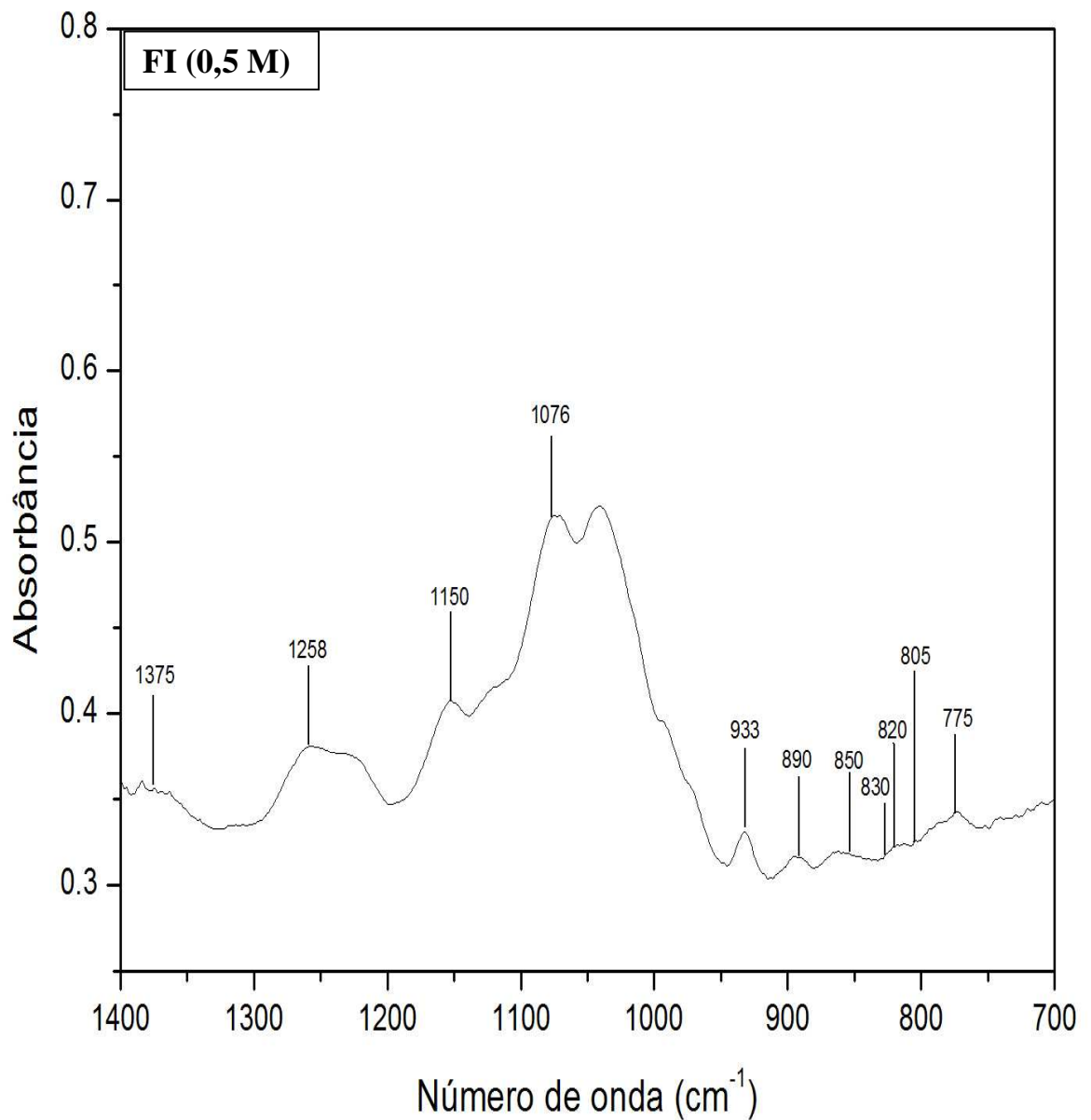


Figura 15: Espectros de IV da fração F I (0,5 M) obtida por cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose) de *G.birdiae*. O espectro na região do IV da fração foi realizado utilizando pastilhas de KBr, com amplificação na região de 1400 a 700 cm⁻¹.

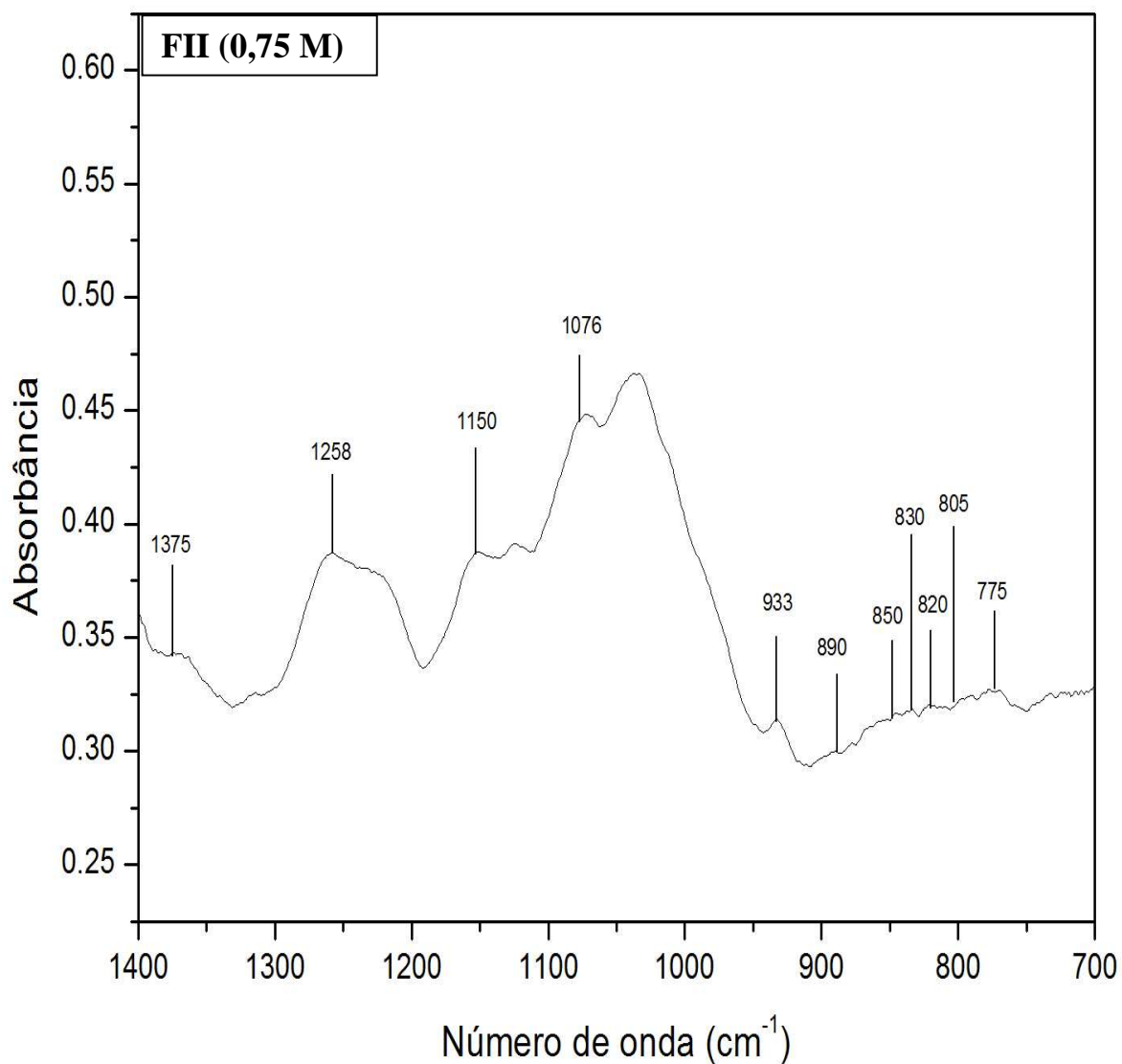


Figura 16: Espectros de IV da fração F II (0,75 M) obtida por cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose) de *G.birdiae*. O espectro na região do IV da fração foi realizado utilizando pastilhas de KBr, com amplificação na região de 1400 a 700 cm⁻¹.

5.6. Cromatografia de permeação em gel (GPC)

A estimativa das massas molares dos picos obtidos por cromatografia de permeação em gel das frações polissacarídicas FI e FII obtidas por DEAE-celulose foi calculada através de uma curva de calibração que foi obtida pelo uso de frações de pululan. A equação obtida a partir dessa curva de calibração foi $\log M_{pk} = 14,10603 - 0,95109 \times V_e$, onde V_e é o volume de eluição em mL. O coeficiente de correlação linear foi de 0,9907 (Figura 17A).

Os cromatogramas obtidos por GPC revelaram uma presença de um pico largo de massa molar para ambas as frações polissacarídicas. A fração FI apresentou um volume de eluição em torno de 9,44 mL, com uma massa molar correspondente a um valor de aproximadamente $1,34 \times 10^5 \text{ g/mol}^{-1}$ (134 kDa) (Figura 17B). De maneira semelhante, a fração FII, também apresentou um pico largo, eluído com um volume de eluição distinto (9,04 mL) e de massa molar mais elevada, de $3,22 \times 10^5 \text{ g/mol}^{-1}$, correspondente a 322 kDa (Figura 17C).

Em estudos realizados com os PST da mesma espécie de alga por Souza *et al.* (2012), foi também mostrado um pico largo, no entanto o volume de eluição foi menor do que o obtido com as frações descritas anteriormente (7,86 mL), que corresponde portanto a uma massa molar mais elevada ($3,7 \times 10^5 \text{ g/mol}^{-1}$; 370 kDa). Os autores justificaram a elevada massa molar obtida ser devido à presença de um agrupamento de cadeias polissacarídicas que, em geral, não têm massas moleculares definidas, mas massas moleculares médias, que representam uma distribuição de espécies moleculares quase idênticas em estrutura, mas de comprimento de cadeia variados.

Com base nestes dados podemos sugerir que as frações (FI e FII) de *G. birdiae* também são consideradas sistemas heterogêneos formados por cadeias polissacarídicas de altas massas molares, tendo em vista, que em estudos de GPC realizados com polissacarídeos de outras espécies de algas marinhas vermelhas, os autores sugeriram que polissacarídeos que apresentassem massas molares acima de 100 kDa, fossem considerados sistemas heterogêneos formados por cadeias polissacarídicas de altas massas molares. Como por exemplo, os polissacarídeos sulfatados obtidos das algas marinhas *Solieria chordalis* (STEPHANIE *et al.*, 2010), *Gracilariopsis persica* (SALEHI *et al.*, 2011) e *Sarconema scinaoides* (KUMAR, GODIYA, SIDDHANTA., 2012) que apresentaram massas molares de 913, 222 e 950 kDa, respectivamente.

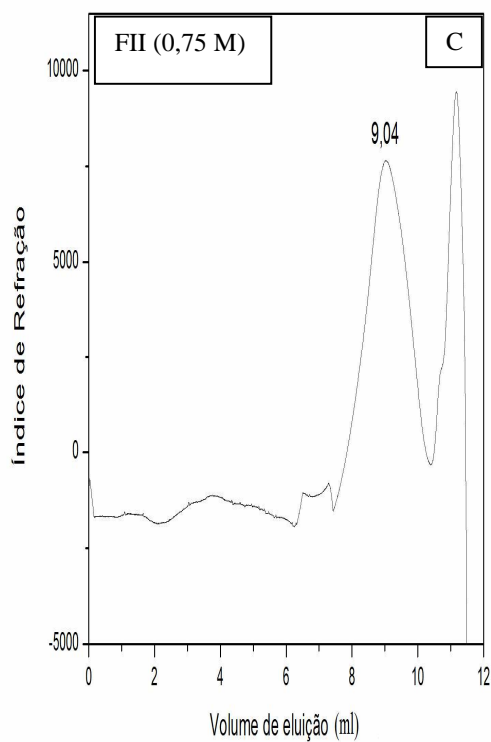
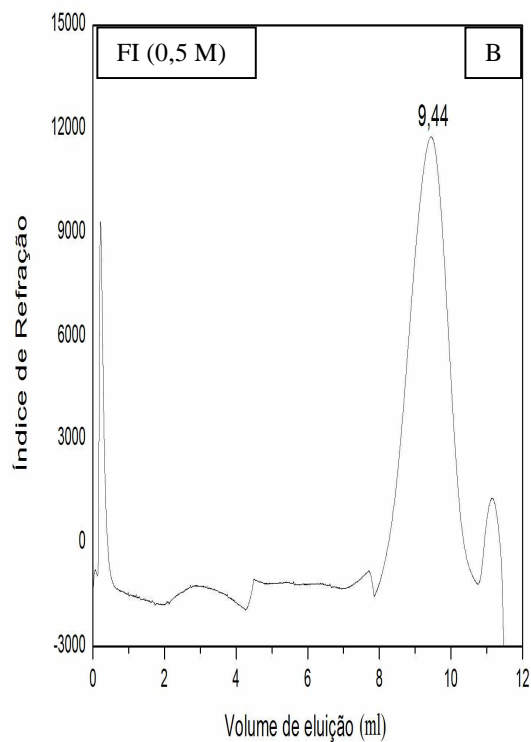
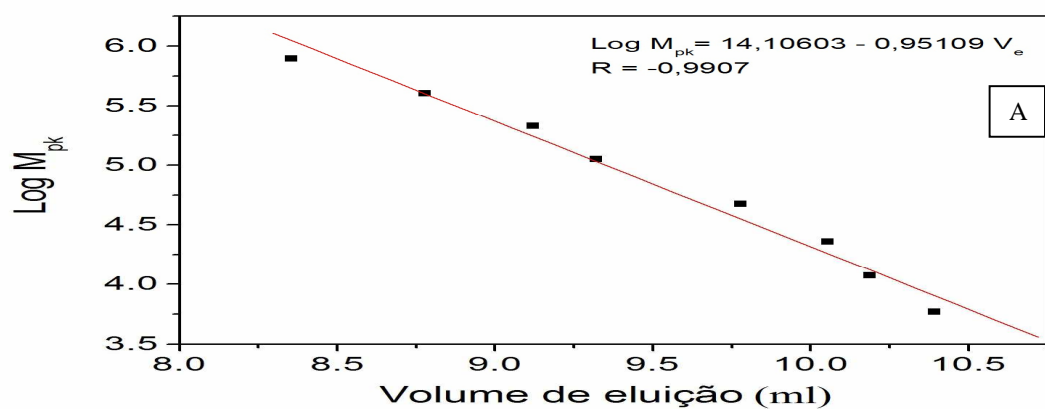


Figura 17: Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) em solução de NaNO_3 0,1 M das frações (FI e F II) de *G.birdiae*. (A) representa a curva de calibração obtida pelo uso de frações de pululanas. O volume de eluição que define a massa molecular está presente em FI (B) e em FII (C).

5.7. Atividade antiviral da fração F I da alga marinha *Gracilaria birdiae*

5.7.1. Citotoxicidade e Viabilidade Celular

De acordo com o Órgão Internacional de Padronização (International Standard Organization), ISO 10993, o ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro teste a ser realizado para avaliação da biocompatibilidade de compostos para uso em dispositivos biomédicos. Após comprovação da atoxicidade do composto, são realizados estudos de biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo* (ROGERO *et al.*, 2003).

O parâmetro mais utilizado para avaliar a toxicidade de um composto *in vitro* é a viabilidade celular, que pode ser evidenciada com auxílio de corantes vitais como o vermelho neutro, que passa através da membrana celular, concentrando-se nos lisossomos, fixando-se por ligações eletrostáticas hidrofóbicas em sítios aniônicos na matriz lisossomal. Entretanto, muitas substâncias, ao serem avaliadas quando em contato com o vermelho neutro, danificam as membranas celulares, resultando no decréscimo de captura e ligação ao corante. Portanto, a utilização deste corante permite distinguir entre células vivas e danificadas ou mortas, pela medida de intensidade de cor da cultura celular através da microscopia de luz (ROGERO *et al.*, 2003).

Neste estudo, as linhagens de células LLC-MK2, HEp-2, Vero e C6/36 (5×10^5 células/poço), cultivadas em meios de cultura apropriados e identificadas por fotomicrografia (Figura 18) foram submetidas a diferentes diluições seriadas da fração FI (1000 $\mu\text{g/mL}$ – 3,9 $\mu\text{g/mL}$) da alga *Gracilaria birdiae*. Os resultados obtidos mostraram que a linhagem de células LLC-MK2, apresentou uma baixa viabilidade celular nas concentrações de 250 a 7,8 $\mu\text{g/mL}$, enquanto que somente para a concentração mais baixa (3,9 $\mu\text{g/mL}$) foi observada uma boa viabilidade, visto que corresponde à concentração máxima não tóxica (CMNT). A CC_{50} obtida para essa linhagem de célula foi de aproximadamente 125 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 3). Com relação aos resultados obtidos para as outras linhagens de células (HEp-2, Vero e C6/36) em todas as concentrações utilizadas, com exceção a concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$, foi observada uma boa viabilidade celular. Como o ensaio foi realizado na concentração a partir de 1000 $\mu\text{g/mL}$, podemos sugerir que a CC_{50} a ser obtida para essas linhagens de células é considerada superior a 1000 $\mu\text{g/mL}$ e que a concentração máxima não tóxica (CMNT) obtida para a fração FI foi de 500 $\mu\text{g/mL}$, tendo em vista que foi obtida uma viabilidade superior a 80 % (Tabela 4).

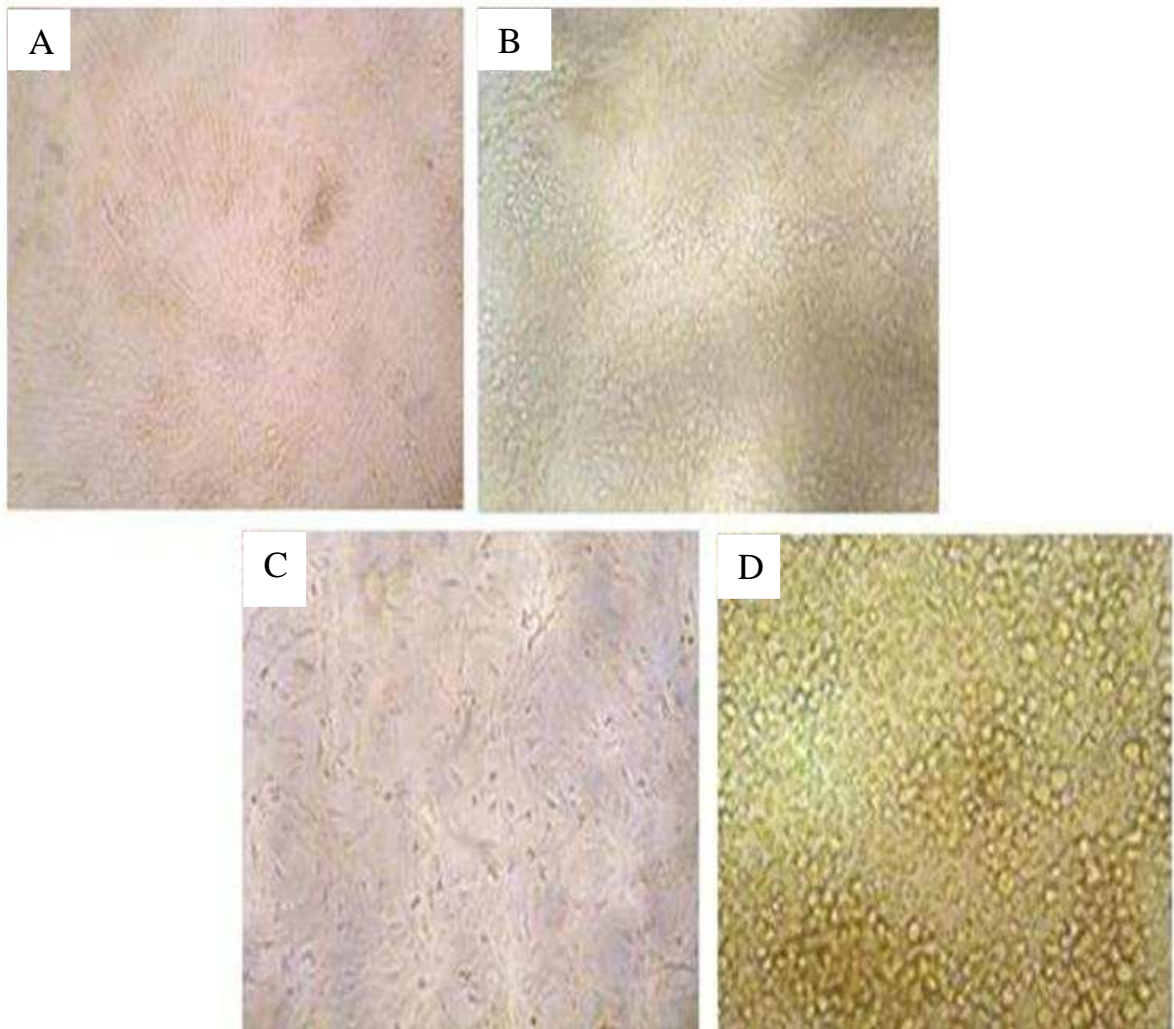


Figura 18: Fotomicrografia das células hospedeiras. A – Células renais de macaco Rhesus [*Macaca mulatta* (LLC-MK2)]; B – Células de carcinoma de laringe humana (HEp-2); C – Células renais de macaco verde africano [*Cercopithecus aethiops* (Vero)]; D – Células de *Aedes albopictus* (C6/36). (Aumento 100 x em microscópio invertido).

Tabela 3: Viabilidade celular da fração FI em diferentes concentrações nas células LLC-MK2

Fração FI ($\mu\text{g/mL}$)	LLC-MK2 (%)
250	46,9
125	51,5
62,5	58,5
31,2	60,3
15,6	61,3
7,8	65,5
3,9*	94,5

*Correspondente a CMNT.

Tabela 4: Viabilidade celular da fração FI em diferentes concentrações nas células Vero, HEp-2 e C6/36

Fração FI ($\mu\text{g/mL}$)	Vero (%)	HEp-2 (%)	C6/36 (%)
1000	60,1	51,5	55,1
500*	82,0	81,1	86,9
250	82,5	84,1	84,3
125	90,2	89,9	91,1
62,5	94,7	93,0	89,0
31,2	86,9	99,9	82,3
15,6	92,9	96,6	99,3
7,8	93,7	99,9	99,9
3,9	99,9	99,9	99,9

*Correspondente a CMNT.

Apesar das células LLC-MK2 terem apresentado baixa viabilidade celular (citotoxicidade) para a fração FI, até o presente momento, os polissacarídeos sulfatados de algas marinhas em geral têm sido descritos na literatura como atóxicos (alta viabilidade celular) para diferentes linhagens de células. Como por exemplo, podemos citar as células Vero, que apresentaram $CC_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$ para os polissacarídeos sulfatados obtidos de espécies de alga vermelha *Bostrychia montagnei* (DUARTE *et al.*, 2001b) e das algas pardas *Sargassum patens* (ZHU *et al.*, 2006) e *Sargassum trichophyllum* (LEE *et al.*, 2011). Em adição, polissacarídeos sulfatados das algas pardas *Sargassum latifolium* e *Cladosiphon okamuranus* não apresentaram toxicidade para a linhagem de células HEp-2 (GAMAL-ELDEEN, AHMED, ABO-ZEID, 2009) e C6/36 (HIDARI *et al.*, 2008), respectivamente. Desta forma, podemos sugerir que os resultados de citotoxicidade encontrados para a fração FI da *G. birdiae* estão em concordância com os descritos na literatura, possibilitando o prosseguimento de estudos de atividade antiviral.

5.7.2. Atividade Antiviral contra Adenovírus (AdV)

No ensaio de atividade contra os vírus não envelopados Ad 19 e Ad 41, a fração FI, na sua CMNT (500 $\mu\text{g/mL}$) ao ser adicionada nas microplacas por diluição em série, seguida da adição dos vírus não apresentou atividade antiviral para os dois sorotipos testados, não havendo, portanto, diferença significativa no efeito citopático quando comparado ao controle de vírus. Estes estão de acordo com o descrito na literatura, na qual os polissacarídeos sulfatados de algas marinhas em geral são incapazes de apresentar efeitos inibitórios contra vírus não envelopados, como por exemplo, adenovírus, reovírus e picornavírus (WITVROUW, DE CLERCQ, 1997).

5.7.3. Atividade Antiviral contra os vírus Herpes Simples (HSV)

Baseado em estudos anteriores de efeito antiviral de polissacarídeos sulfatados das algas marinhas contra vírus envelopados como o herpes simples (LEE *et al.*, 2011) e dengue (HIDARI *et al.*, 2008) avaliamos o efeito antiviral da fração FI contra 3 vírus envelopados (HSV-1, HSV-2 e DENV-1).

Na avaliação do HSV-1 e do HSV-2, a fração FI na sua CMNT e na concentração de 250 µg/mL apresentou inibição significativa do efeito citopático (ECP) contra ambos os vírus. Baseado neste resultado, os dados de inibição do efeito citopático da fração FI foram calculados levando em consideração somente a menor concentração (250 µg/mL). Portanto, a FI nesta concentração apresentou para o HSV-1, um índice de inibição viral (IIV) de 0,75 gerando uma percentagem de inibição (PI) de 82,2 % e para HSV-2 um IIV de 1,25 com uma PI de 94,4 % (Tabela 5).

Estes dados estão de acordo com os publicados por outros autores, que afirmaram que o mecanismo fundamental à atividade anti-HSV de polissacarídeos sulfatados de algas, pode estar relacionado com a inibição da adsorção viral, passo inicial no processo de replicação viral (CARLUCCI *et al.*, 1999; DAMONTE, MATULEWICZ, CERREZO, 2004; ZHANG *et al.*, 2007; CARDOZO *et al.*, 2011).

Este tipo de inibição viral é justificada pelo fato de uma infecção causada pelos HSV promover a interação entre a glicoproteína viral gC e moléculas de heparan sulfato celular. Desta forma, os polissacarídeos sulfatados agem, competitivamente, ao sítio de ligação de gC, impedindo o processo de adsorção viral (ZHU *et al.*, 2006).

Bandyopadhyay *et al.* (2011) realizando estudos de citotoxicidade e atividade antiviral de polissacarídeos sulfatados da alga *Sphacelaria indica* e de seus derivados contra o vírus herpes simples tipo 1 (HSV-1) encontraram valores de concentração inibitória 50 % (IC₅₀), que variaram de 0,6 a 10 µg/mL e que se mostraram atóxicos em concentrações superiores a 200 µg/mL. Os autores sugeriram que o efeito antiviral pode estar relacionado com a presença de grupamentos sulfato, que interagem de forma direta com a partícula viral.

Como o índice de seletividade (IS) de um composto testado representa o grau de segurança para sua utilização, este parâmetro foi determinado para a fração FI, utilizando-se a razão entre a CC₅₀ e a EC₅₀. Os resultados obtidos apresentaram valores de EC₅₀ de 98,8 e 20,5 µg/mL para o HSV-1 e HSV-2, sendo os valores obtidos para os IS foram superiores a 10 e 48,7 para o HSV-1 e HSV-2, respectivamente (Tabela 5).

Estes resultados mostraram-se similares aos obtidos para um polissacarídeo sulfatado isolado da alga parda *Stoechospermum marginatum* que, através da determinação dos mesmos parâmetros, foi demonstrada uma inibição de forma seletiva dos vírus herpes simples (HSV-1 e HSV-2) em células Vero (ADHIKARI *et al.* 2006).

Tabela 5: Atividade antiviral da fração F I contra os vírus herpes simples (HSV-1 e HSV-2) em células Vero

Vírus	Fração FI				
	CC ₅₀ (µg/mL)	IIV	PI (%)	EC ₅₀ (µg/mL)	IS
HSV-1	> 1000	0,75	82,2	98,8	> 10
HSV-2	> 1000	1,25	94,4	20,5	> 48,7

5.7.4. Atividade Antiviral contra a dengue (DENV-1)

Na avaliação da atividade antiviral da fração FI contra o DENV-1, inicialmente foi realizada uma curva dose-resposta de reação utilizando-se diluições seriadas a partir de sua CMNT (500 µg/mL) com a finalidade de se obter a ED₅₀. Os resultados obtidos nesta curva apresentaram uma inibição viral significativa de 89,64 e 89,53 % nas concentrações de 500 e 250 µg/mL, respectivamente (Tabela 6). A ED₅₀ (116,29 µg/mL) obtida a partir desta cinética de reação, juntamente com a CC₅₀ (> 1000 µg/mL) sugerida no ensaio de viabilidade celular, foram utilizadas para a determinação do índice de seletividade (IS), que mostrou um valor maior que 8,6 (Tabela 7).

Tabela 6: Curva dose-resposta de Inibição Viral da fração F I contra DENV-1 em células C6/36.

Fração	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Inibição (%)
F I	500	89,64
	250	89,53
	125	53,91
	62,5	33,05

Tabela 7: Atividade antiviral da fração F I contra DENV-1 em células C6/36

Fração	CC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	EC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	IS
F I	> 1000	116,29	> 8,6

CC₅₀ = concentração citotóxica para 50 % das células em cultura; EC₅₀ = Dose efetiva capaz de inibir 50 % da propagação viral; IS = Índice de seletividade.

Polissacarídeos sulfatados de algas marinhas por apresentarem semelhanças estruturais com o heparan sulfato, vêm sendo utilizados em estudos de inibição da infecção por vírus da dengue *in vitro*. Portanto, tem sido relatado na literatura que o envolvimento do heparan sulfato se dá nos estádios iniciais do ciclo de replicação do DENV. No entanto, a rota específica de ação do heparan sulfato durante a infecção ainda não foi totalmente elucidada, uma vez que estudos controversos sugerem que o mesmo possa atuar sob diferentes formas, dentre estas podemos destacar: 1) agir diretamente como receptor para a ligação e entrada do vírus (CHEN *et al.*, 1997; GERMI *et al.*, 2002; HILGARD, STOCKERT, 2000; HUNG *et al.*, 1999); 2) agir somente no recrutamento de vírions sob a superfície da célula, facilitando desta maneira a interação com um co-receptor de natureza protéica de alta afinidade (MARTÍNEZ-BARRAGÁN, DEL ANGEL, 2001; THEPPARIT, SMITH, 2004) ou 3) o heparan sulfato poderá não estar envolvido com a infecção ocasionada pelo DENV (BIELEFELDT-OHMANN *et al.*, 2001).

As interações que promovem a entrada do vírus da dengue na célula hospedeira são distintas, em que essas diferenças estão relacionadas com o sorotipo viral, com a história da passagem dos vírus para dentro das células infectadas e com o tipo de célula hospedeira (TALARICO, DAMONTE, 2007).

Com relação à célula hospedeira e ao sorotipo viral, Nogueira *et al.* (1988) relataram que a infecção viral por sorotipo 1 da dengue em células C6/36, apresentou um efeito citopático significativo com formação de sincícios, que são compatíveis à presença de uma infecção viral.

Em adição, em estudos de atividade antiviral realizados com polissacarídeos sulfatados obtidos das espécies de algas *Gymnogongrus griffithsiae* e *Cryptonemia crenulata* contra os 4 sorotipos da dengue mostraram que esses polissacarídeos inibiram a biossíntese dos sorotipos DENV-2 e DENV-3 em células de mamíferos (Vero e HEp-2). No entanto, esses polissacarídeos não foram capazes de inibir a biossíntese desses sorotipos em células de mosquitos (C6/36). Além disso, a susceptibilidade apresentada pelos 4 sorotipos avaliados foi de: DENV-2 > DENV-3 > DENV-4 > DENV-1. Diante desses resultados, os autores sugeriram que as diferenças obtidas na atividade antiviral destes polissacarídeos podem ser atribuídas a diferenças na interação vírus-célula (TALARICO *et al.*, 2005).

Talarico *et al.* (2011), em um estudo comparativo de atividade antiviral de uma iota-

carragenana comercial contra o sorotipo da dengue tipo 2 (DENV-2) em células Vero e C6/36, mostraram um efeito antiviral da iota-carragenana para ambas linhagens de células, que apresentaram mecanismos de ação distintos. Em células Vero, o efeito antiviral ocorreu no início do ciclo viral, provavelmente através da inibição da ligação do vírion. Com relação às células C6/36, o efeito antiviral ocorreu somente após 8 h da infecção viral. Além disso, os autores demonstraram que após 3 passagens do sorotipo DENV-2 na presença da iota carragenana para a linhagem de células Vero, o vírus passou a exibir uma alta resistência à iota carragenana, enquanto o vírus controle, passado 3 vezes, na ausência da iota carragenana, manteve sua suscetibilidade antiviral. Diferentemente, quando o ensaio antiviral foi realizado em células C6/36, foi demonstrado que tanto o ensaio controle como o ensaio realizado em presença da iota carragenana apresentaram a mesma curva dose-resposta. Portanto, diante de diferentes valores de EC_{50} obtidos para as duas linhagens de células avaliadas, os autores confirmaram a presença de um alvo diferencial em células de mosquito e em células de mamíferos.

Para confirmar a presença de um alvo diferencial entre as células Vero e C6/36, os autores realizaram um ensaio de adsorção viral em ambas as células utilizando dois diferentes métodos experimentais. Primeiramente, ambas as células foram tratadas com heparinase I com a finalidade de remover resíduos de GAGs nelas existentes. Após esse tratamento, a adsorção do DENV-2 às células Vero foi altamente inibida e às células C6/36 não ocorreu alteração significativa. Posteriormente, foi realizado o ensaio de supressão do nível de sulfatação dos GAGs, adicionando ao meio clorato de sódio. O resultado obtido mostrou que a adsorção viral foi inibida somente em células Vero, confirmando que em células C6/36 não se necessita da participação do heparan sulfato para a entrada do DENV, sugerindo, portanto, que a participação do vírus provavelmente está ligada a outro componente da membrana da célula (TALARICO *et al.*, 2011).

Em estudos de análises estruturais do DENV-2 foi demonstrado que os sítios de ligação do heparan sulfato no domínio III da glicoproteína do envelope do vírus são considerados essenciais para a ligação às células hospedeiras de mamíferos BHK-21. No entanto, estes sítios não se mostraram envolvidos na ligação às células de mosquito C6/36 (HUNG *et al.*, 2004). Adicionalmente, outras investigações identificaram outras proteínas com capacidade de ligação como receptores do DENV-2 em células C6/36 sem o

envolvimento aparente de heparan sulfato (CHEE, ABUBAKAR, 2004; KUADKITKAN *et al.*, 2010.; PAINGANKAR, GOKHALE, DEOBAGKAR, 2010;. SALAS-BENITO *et al.*, 2007).

Talarico *et al.* (2011) relataram que a iota carragenana comercial utilizada nos ensaios de atividade antiviral, por apresentar em sua estrutura uma combinação de zonas iônicas (sulfatadas) e hidrofóbicas (3,6-anidrogactose) na mesma macromolécula, sugeriram que esta combinação é considerada responsável pelos efeitos antivirais em células de mosquito C6/36.

Portanto, como no nosso estudo foi utilizada nos ensaios de atividade antiviral, uma agarana obtida da alga *Gracilaria birdiae*, que também apresenta em sua estrutura uma combinação de zonas iônicas (sulfatadas) e hidrofóbicas (3,6-anidrogactose) na mesma macromolécula, podemos sugerir que a mesma também seja considerada responsável pelos efeitos antivirais observados em células de mosquito (C6/36).

5.8. Atividade anti-inflamatória da fração F I da alga marinha *Gracilaria birdiae*

5.8.1. Migração celular induzido por Carragenina (Cg)

A migração celular ou simplesmente peritonite induzida por carragenina é um modelo experimental bem caracterizado de inflamação aguda, que vem sendo empregado largamente para testar novas terapias anti-inflamatórias por permitir a quantificação e correlação da migração celular e do exsudato inflamatório (SHERWOOD, TOLIVER-KINSKY, 2004).

Os resultados obtidos a partir da utilização da FI da *Gracilaria birdiae* neste modelo, mostraram que a dose de 10 mg/kg inibiu de maneira significativa a migração leucocitária induzida pelo agente flogístico carragenina (Cg: $11,12 \pm 2,31 \times 10^6$ células por mL do lavado peritoneal) em aproximadamente 52% (F I: $5,34 \pm 0,54 \times 10^6$ células por mL do lavado peritoneal) (Figura 19A). A redução dos leucócitos totais para a cavidade peritoneal foi principalmente ocasionada pela diminuição da migração de neutrófilos, com inibição de 54,76% ($4,80 \pm 0,47 \times 10^6$ neutrófilos / mL) quando comparadas ao controle negativo Cg ($9,94 \pm 2,13 \times 10^6$ neutrófilos / mL) (Figura 19B) e de células mononucleares, com inibição de 54% ($0,54 \pm 0,07 \times 10^6$ células / mL) em comparação com o controle negativo Cg ($1,18 \pm 0,18 \times 10^6$ células / mL) (Figura 19C).

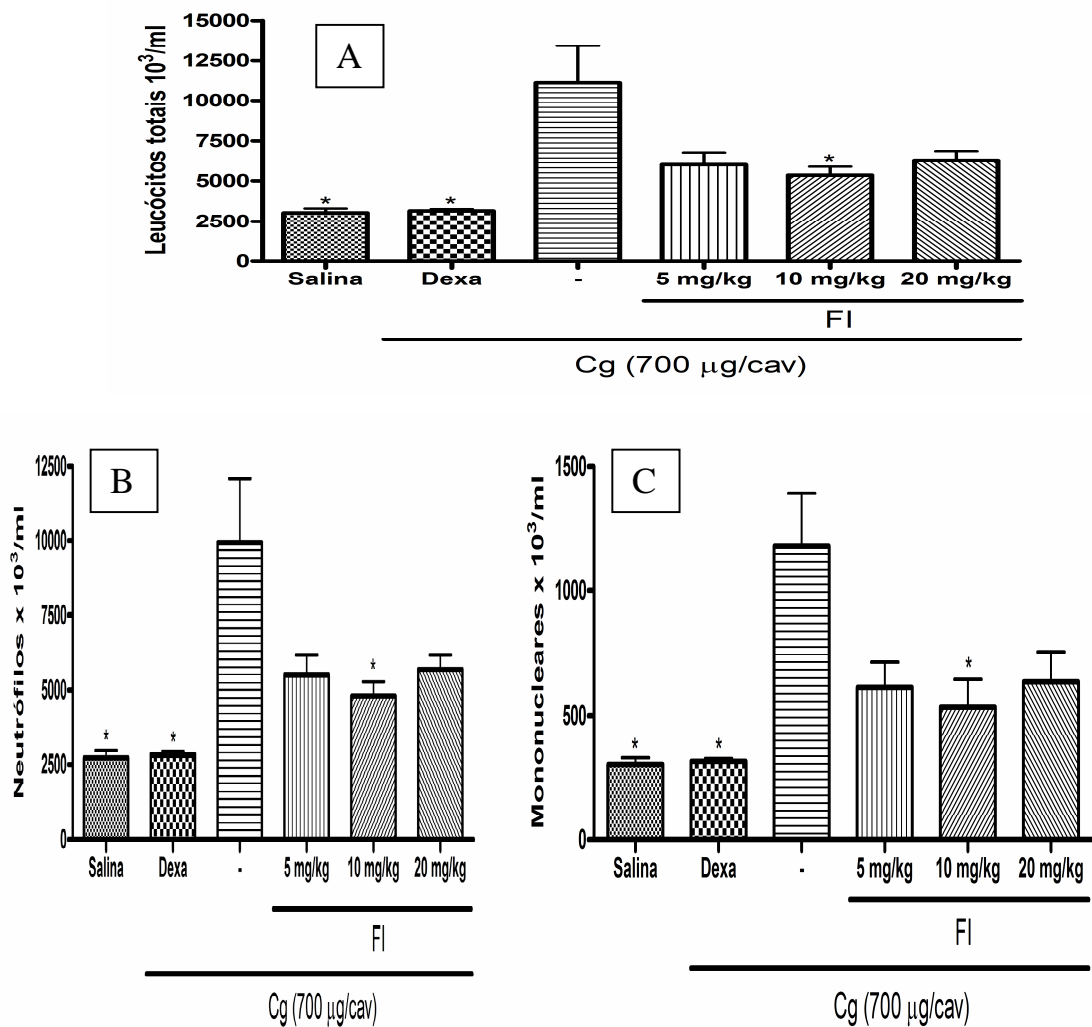


Figura 19. Efeito da fração FI na migração celular induzida por carragenina (Cg) em ratos. Uma hora antes de receberem uma injeção de carragenina (700 $\mu\text{g}/\text{cav}$; s.c.), grupos de animais receberam FI (5, 10 ou 20 mg/kg) ou dexametasona (1 mg/kg) via s.c. Outro grupo recebeu somente salina estéril sem Cg por via i.p. Após 4 horas, a contagem de leucócitos totais (A), neutrófilos (B) e células mononucleares (C) foram realizadas.* $p < 0,05$ indica diferença significativa para o grupo Cg (ANOVA; Teste de Bonferroni).

Este resultado difere do obtido para as doses de 5 e 20 mg/kg, que não mostraram efeito anti-inflamatório sobre a migração de leucócitos em comparação ao controle Cg. Como anti-inflamatório de controle, a dexametasona diminuiu a migração de leucócitos induzida pela Cg em 73,2 %. Injeção de solução salina não induziu migração de neutrófilos ou o influxo de células mononucleares.

O efeito de FI no modelo de peritonite está de acordo com outros estudos da literatura utilizando polissacarídeos sulfatados de algas marinhas. Medeiros *et al.* (2008) isolaram uma fração de fucoídano da alga marinha parda *Lobophora variegata* a partir da combinação de procedimentos de fracionamento por acetona e cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose. O efeito desta fucoídano sobre o processo inflamatório agudo foi avaliado utilizando o modelo de peritonite induzida por tioglicolato de sódio em ratos. Os autores constataram que a respectiva fração (50 mg/kg) inibiu o processo inflamatório em 55 %, contra 70 % de uma fucoídano comercial, na mesma dose, sugerindo que o mecanismo de ação desta fração esteja relacionado à inibição do rolamento de células na membrana do endotélio vascular e o influxo de leucócitos para o sítio da inflamação.

Siqueira *et al.* (2011) observaram que uma fração polissacarídica da alga marinha parda *Lobophora variegata* foi capaz de inibir a migração leucocitária induzida por zymosan em 61 %, sendo que o percentual desta inibição sobre os neutrófilos foi aproximadamente em 75 %, quando comparada com o grupo zymosan.

Coura *et al.* (2012) mostraram que o extrato polissacarídico (PST) da alga marinha vermelha *Gracilaria cornea* (3, 9 or 27 mg/kg; s.c.) administrados 1 hora antes da administração da carragenina na cavidade peritoneal, apresentou uma redução na contagem de neutrófilos de 59,0 %, 25,6 % and 31,5 %, respectivamente, mostrando que a menor dose foi considerada a mais efetiva. A dexametasona promoveu uma redução de 83,2 %.

Rodrigues *et al.* (2012b) relataram que uma fração polissacarídica da alga marinha verde *Caulerpa cupressoides* eluída por cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose, nas doses de 3, 9 e 27 mg/kg; s.c., administrados 1 hora antes da administração da carragenina inibiu a migração de neutrófilos em 64, 69 e 73 %, respectivamente, mostrando um efeito dose-dependente.

5.8.2. Edema de pata induzido por Carragenina (Cg) e atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)

A carragenina (500 µg/pata; 100 µL; s.c.) induziu um intenso edema, atingindo um nível máximo na terceira hora ($0,47 \pm 0,01$ mL).

O pré-tratamento com a fração F I (10 mg/kg; s.c.) reduziu a ocorrência do edema de forma significativa, com redução de 44 %, na terceira hora após a administração do estímulo, quando comparado ao grupo controle negativo (Cg). Entretanto, as demais doses da fração F I (5 e 20 mg/kg; s.c.) não reduziram o edema. A dexametasona (1 mg/kg; s.c.), utilizada como controle positivo, inibiu o edema de forma significativa em todos os intervalos, com inibição de 66% na terceira hora (Figura 20).

Esta inibição foi confirmada pela atividade da MPO, que avalia a infiltração de neutrófilos no tecido da pata. As doses de 10 e 20 mg/kg inibiram de forma significativa a acumulação neutrofílica na pata em 59,3 and 36,92 %, respectivamente, quando comparadas com o grupo Cg. A dexametasona também inibiu a atividade da MPO em 81,9%. A dose de 5 mg/kg não causou inibição (Figura 21).

Os polissacarídeos sulfatados de algas marinhas têm comportamentos distintos, dependendo da espécie, sendo capazes de inibir, manter ou inclusive potencializar o edema de pata induzido por Cg em ratos. Dentre eles está o extrato polissacarídico total da alga marinha parda *Turbinaria ornata* (2,5; 5; 10 ou 20 mg/kg) que reduziu o edema de pata de forma dose-dependente quando induzido por Cg (ANANTHI *et al.*, 2010). No entanto, um polissacarídeo sulfatado (0,9 mg/kg) obtido da alga *Champia feldmannii* potencializou o curso do processo inflamatório, comparado à Cg aos 60 min do modelo de edema de pata (ASSREUY *et al.*, 2008).

Siqueira *et al.* (2011), avaliando o efeito antiinflamatório da fração polissacarídica da alga marinha parda *Lobophora variegata*, verificaram que o pré-tratamento i.v. com essa fração na dose de 1 mg/kg inibiu em 47 % ($0,48 \pm 0,04$ mL) o edema de pata na segunda hora quando induzido por Cg ($0,92 \pm 0,07$ mL).

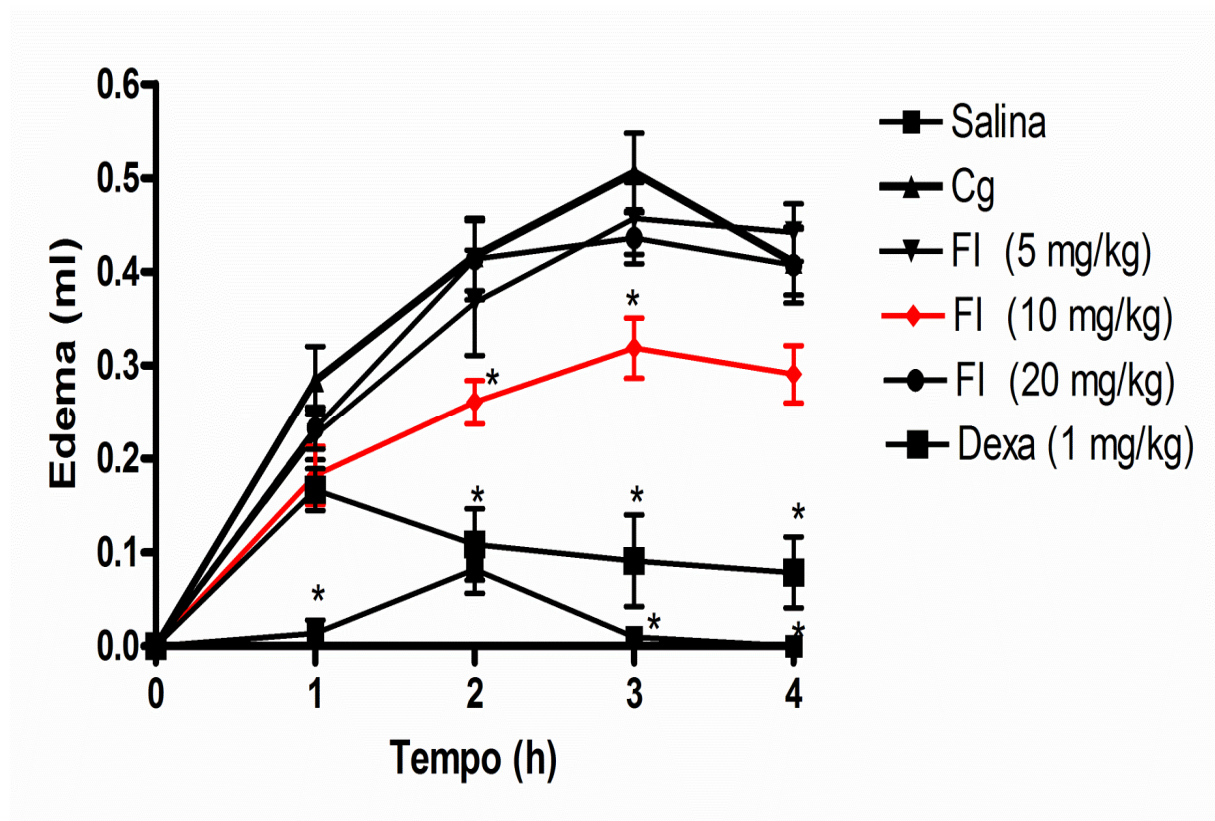


Figura 20. Efeito da fração FI no edema de pata induzidos por carragenina em ratos. Uma hora antes de receberem uma injeção de carragenina (500 $\mu\text{g}/\text{cav}$; 100 μL ; s.c.), grupos de animais receberam FI (5, 10 ou 20 mg/kg) ou dexametasona (1 mg/kg) via s.c. Outro grupo recebeu somente salina estéril sem Cg por via i.p. * $p < 0,05$ indica diferença significativa para o grupo Cg (ANOVA; Teste de Bonferroni).

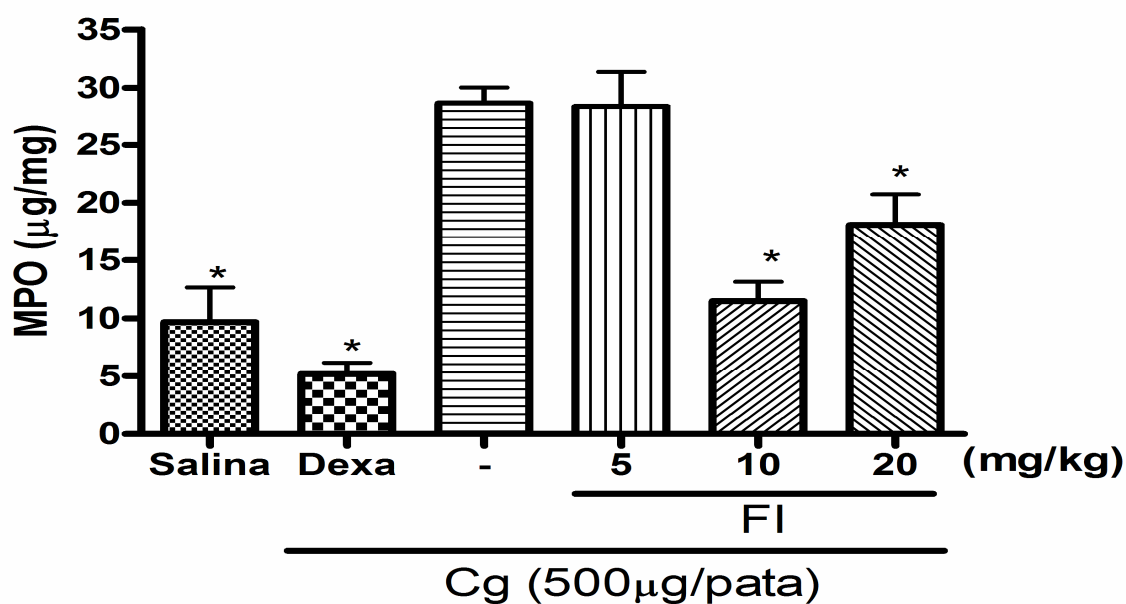


Figura 21. Dosagem da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) realizada no sobrenadante do homogenato do tecido da pata. O tecido da pata foi retirado dos grupos tratados com carragenina (500 µg/cav; s.c.), FI (5, 10 ou 20 mg/kg) ou dexametasona (1 mg/kg) via s.c. Outro grupo contendo somente salina estéril sem Cg por via i.p. também foi avaliado. * $p < 0,05$ indica diferença significativa para o grupo Cg (ANOVA; Teste de Bonferroni).

Araújo *et al.* (2011) afirmaram que o pré-tratamento com a fração polissacarídica da alga marinha vermelha *Solieria filiformis* na sua menor dose (1 mg/kg; s.c.) reduziu o edema de forma significativa em 46 %, 1 hora após a administração de Cg, quando comparado ao grupo controle negativo (Cg). Entretanto, a dose intermediária da fração (3 mg/kg; s.c.) não reduziu o edema e a maior dose da fração (9 mg/kg; s.c.) intensificou o edema de forma significativa (de $0,60 \pm 0,06$ mL para $0,83 \pm 0,06$ mL). A dexametasona (1 mg/kg; s.c.), utilizada como controle positivo, inibiu o edema de maneira significativa em todas as horas.

Em seguida, a mesma fração foi submetida à avaliação da atividade da MPO e, foi mostrado que as três doses (1, 3 ou 9 mg/kg; s.c.) não foram capazes de inibir a infiltração de neutrófilos quando comparado ao grupo Cg. Apenas a dexametasona reduziu a infiltração de neutrófilos de forma significativa.

Coura *et al.* (2012) relataram que os PST da alga marinha vermelha *Gracilaria cornea* inibiram de forma significativa o edema de pata induzido por Cg nas menores doses (3 e 9 mg/kg), enquanto que o pré-tratamento com a maior dose (27 mg/kg) não promoveu alteração. Esses resultados foram confirmados por MPO no tecido da pata, que indicou que as menores doses apresentaram a maior inibição do infiltrado celular, mostrando que as menores doses foram consideradas como mais efetivas.

A fração polissacarídica da alga marinha *Gelidium crinale*, cujo composto, quando administrado por via i.v. nas doses (0,01 e 1 mg/kg), reduziu o edema apenas durante a primeira hora (SOUSA *et al.*, 2011). Por outro lado, Rodrigues *et al.* (2012b) relataram que uma fração polissacarídica da alga marinha verde *Caulerpa cupressoides*, nas doses de 3, 9 e 27 mg/kg, administrados por via s.c. 1 hora antes da administração da carragenina, foi capaz de inibir o edema de forma mais intensa na segunda e na terceira hora, envolvendo uma maior liberação de prostaglandinas. Para os autores, esta inibição neste intervalo sugere que a ação anti-inflamatória dessa fração polissacarídica esteja relacionada com a inibição da migração de neutrófilos, similar ao nosso estudo.

5.8.3. Edema de pata induzido por Dextrana

Dextrana (400 µg/pata; 100 µL; s.c.) induziu um edema significativo, com volume máximo ($0,64 \pm 0,04$ mL) ocorrendo 30 minutos após o tratamento e decrescendo nas horas seguintes. A administração da fração F I (10 mg/kg; s.c.), 1 hora antes do edema induzido por dextrana, reduziu de forma significativa o aumento da permeabilidade vascular em 48,4 %, no tempo de 30 minutos após o estímulo, quando comparado ao controle dextrana. Porém, o tratamento com as demais doses (5 ou 20 mg/kg; s.c.) da fração F I, não inibiram o edema (Figura 22).

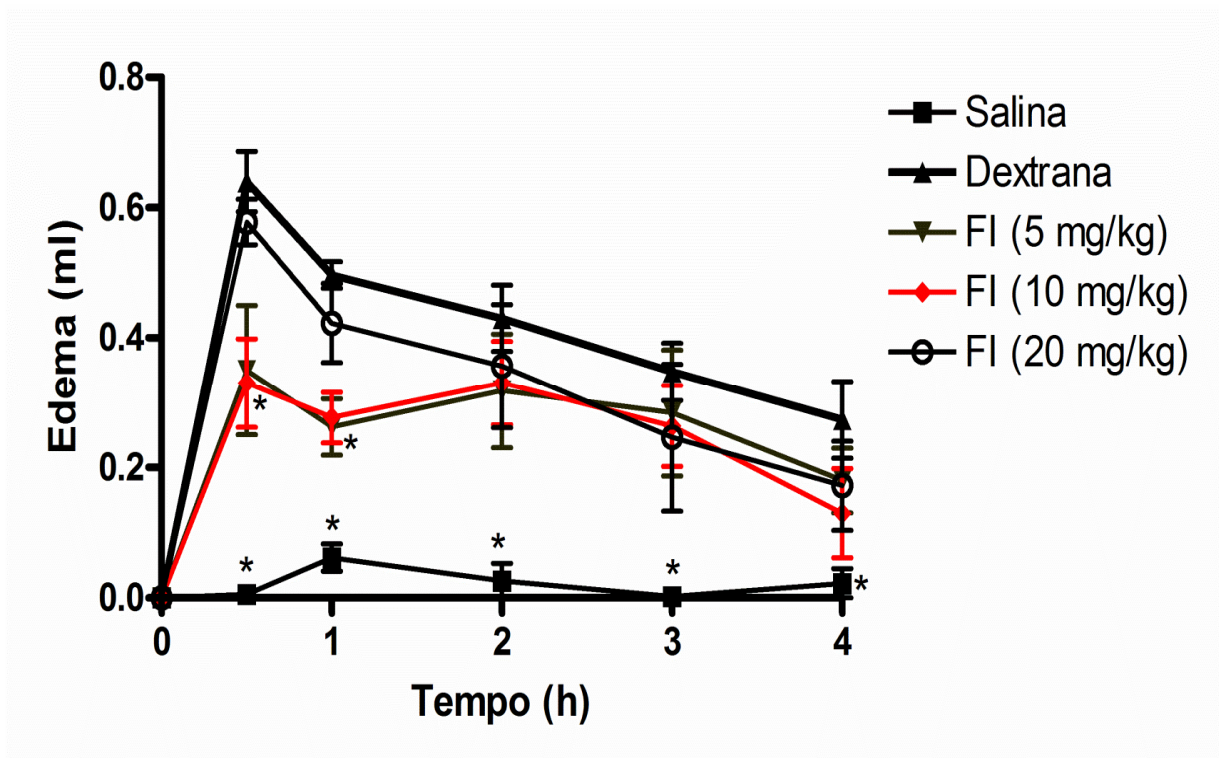


Figura 22. Efeito da fração FI no edema de pata induzidos por dextrana em ratos. Uma hora antes de receberem uma injeção de dextrana (400 µg/cav; 100 µL; s.c.), grupos de animais receberam FI (5, 10 ou 20 mg/kg) via s.c. Outro grupo recebeu somente salina estéril sem dextrana por via i.p. * $p < 0,05$ indica diferença significativa para o grupo dextrana. (ANOVA; Teste de Bonferroni).

Alguns relatos na literatura confirmam a ação anti-inflamatória de polissacarídeos sulfatados de algas marinhas em eventos vasculares. Dentre eles, o estudo de Siqueira *et al.* (2011), que observaram que um polissacarídeo sulfatado da alga marinha *Lobophora variegata* (1 mg/kg) inibiu a formação do edema induzido por dextrana ($1,22 \pm 0,06$ mL), em aproximadamente 19 % ($0,98 \pm 0,06$ mL), nos primeiros 30 minutos do ensaio.

Sousa *et al.* (2011) também mostraram que os polissacarídeos sulfatados da alga marinha *Gelidium crinale* (1 mg/kg) reduziu ($0,55 \pm 0,04$ mL) em 34 % o edema induzido por dextrana ($0,83 \pm 0,05$ mL), além disso, inibiu também o edema induzido por histamina em 49 %.

Entretanto, Assreuy *et al.* (2008) ao avaliarem os efeitos dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha *Champia feldmannii*, administrado nas doses de 0,1 e 0,3 mg/kg, antes da injeção de dextrana, constataram uma potencialização do edema induzido por este agente na primeira e quarta horas, após o estímulo.

Araújo *et al.* (2011) mostraram que após administração da fração polissacarídica da alga marinha *Solieria filiformis* (1 mg/kg; s.c.), 1 hora antes do edema induzido por dextrana, reduziu de forma significativa o edema em 38,57 %, 30 minutos após o estímulo. Porém, o tratamento com as doses mais altas (3 ou 9 mg/kg; s.c.) da fração FI, não alterou o edema.

Coura *et al.* (2012) mostrou que o tratamento com os PST (3, 9 e 27 mg/kg) da alga marinha *Gracilaria cornea* demonstrou ser eficaz em reduzir a formação do edema induzido por dextrana de maneira significativa, principalmente nos primeiros 30 minutos e na primeira hora. Nos primeiros 30 minutos, as doses 3, 9 e 27 mg/kg exibiram um percentual de redução em 52,8 % , 47,3 % e 40,2 % , respectivamente, enquanto que na primeira hora as referidas doses apresentaram um percentual de redução em 67,6 % , 59,7 % e 52,7 % , respectivamente, quando comparadas com a dextrana.

Estes resultados em conjunto sugerem que o efeito anti-edematogênico da fração FI (10 mg/kg) está relacionado com a inibição dos eventos inflamatórios celulares e vasculares, ou seja, inibindo a migração de neutrófilos e liberação de aminas vasoativas.

Acredita-se que a presença do efeito anti-inflamatório de FI apenas na dose intermediária esteja relacionada com o estímulo denominado de quantal ou “tudo ou nada”, em que o animal discrimina a presença ou ausência de uma dose ideal e então emite uma resposta de “sim ou não” (McMILLAN, LI, HARDWICK, 2001).

5.8.4. Análise do envolvimento da via da heme oxigenase (HO-1) na atividade anti-inflamatória da fração FI

Para investigar o envolvimento da via heme oxigenase no efeito anti-inflamatório de FI se expressa, os animais foram pré-tratados com ZnPP IX (3 mg/kg), um inibidor específico da HO-1. O resultado mostrou que o efeito anti-inflamatório de FI (10 mg/kg) existente no edema induzido por Cg não foi observado na presença do ZnPP IX (Figura 23).

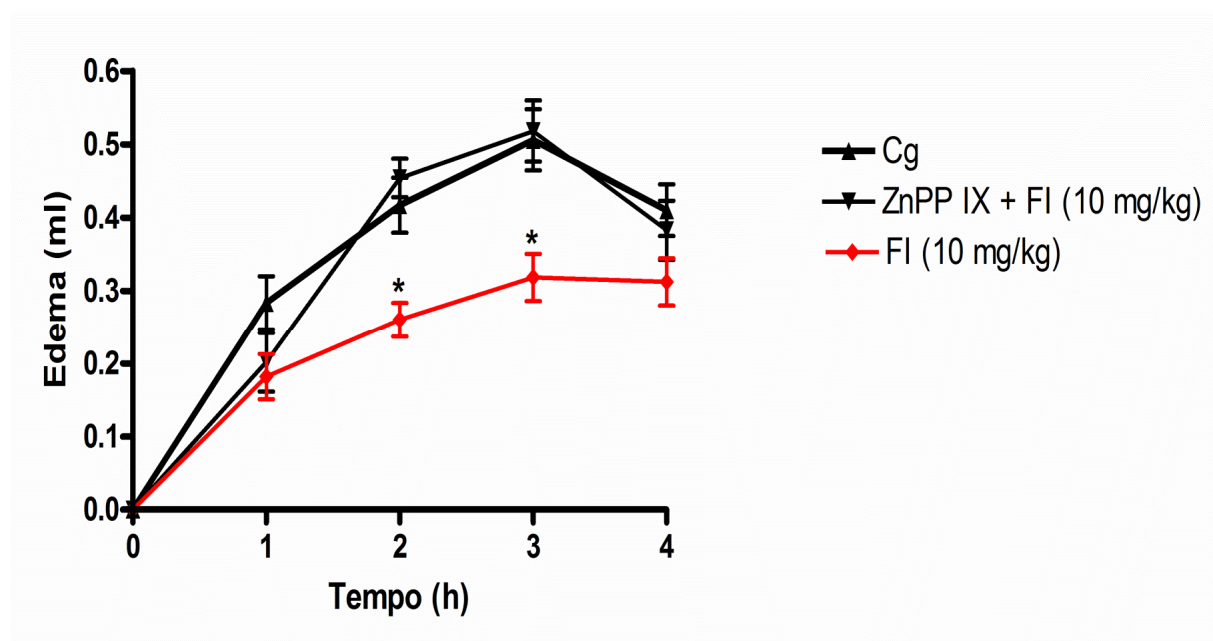


Figura 23. Envolvimento da via da heme oxigenase (HO-1) no edema de pata induzido por carragenina em ratos. Antes de receberem uma injeção de carragenina (500 µg/pata; 100 µL; s.c.), grupos de animais receberam FI (10 mg/kg) com ou sem ZnPP IX (3 mg/kg) via s.c. Outro grupo recebeu somente Cg por via i.p. * $p < 0.05$ indica diferença significativa para o grupo Cg (ANOVA; Teste de Bonferroni).

Numerosos estudos têm demonstrado que a expressão da via HO-1 está relacionada com efeito anti-inflamatório (PAINÉ *et al*, 2010). Inclusive, os efeitos anti-inflamatórios da HO-1 já vêm sendo apresentados em modelos animais induzidos por carragenina (WILLIS *et al.*, 1996). A HO-1 é uma enzima induzida em resposta a um estresse oxidativo, e sua expressão em resposta a diferentes mediadores pode contribuir com a resolução da inflamação, além de apresentar efeitos protetores contra injúria oxidativa em vários órgãos (NAITO *et al.*, 2011).

A clivagem da HO gera monóxido de carbono, que é uma molécula biologicamente ativa, que exerce a maioria de seus efeitos via ativação da guanilato ciclase. Steiner *et al.* (2001) testaram a hipótese q o monóxido de carbono (CO) endógeno pode modular a hiperalgesia inflamatória e os resultados mostraram que produto da via da HO tem importante papel no processo inflamatório por aumentar os níveis de GMPc.

Nascimento e Branco (2007) investigaram o papel da HO periférica na resposta nociceptiva no teste da formalina e também mostraram evidências da sinalização da via pelo GMPc. Em 2008, os mesmos autores identificaram o papel da via HO à nível de cordão espinal, ratificando o envolvimento desta via na resposta nociceptiva em ratos. Carvalho, Branco e Panissi (2011) também demonstraram envolvimento da via HO-CO-GMPc na modulação periférica e espinal da dor inflamatória.

Grangeiro *et al.* (2011) determinaram recentemente níveis de bilirrubina (produto da biliverdina) em exsudatos peritoneais, como indicadores de atividade HO-1 em teste de contorções abdominais em camundongos. Após induzido estímulo por ácido acético, foram detectados níveis de bilirrubina, que foram inibidos por ZnPP IX.

Outros relatos da literatura também estão de acordo com nosso estudo, mostrando que a inibição via HO-1 está relacionada com a inibição da resposta inflamatória (HAYASHI *et al*, 1999, ALCARAZ, FERNÁNDEZ, GUILLÉN , 2003)

5.9. Avaliação sistêmica da FI

Após a realização dos ensaios de atividades antiviral e anti-inflamatória, foram avaliados alguns parâmetros de toxicidade utilizando camundongos machos tratados com FI na dose de 10 mg/kg por via i.p.

Durante o período experimental de 48 h, a fração FI injetada em uma dose única (10 mg/kg), os animais se mostraram visualmente saudáveis, conseqüentemente não produziram nenhum sinal físico ou comportamental que caracterizasse toxicidade ou mortalidade.

Em seguida, a fração FI foi aplicada uma vez ao dia, na mesma dose, durante 14 dias consecutivos de administração.

Os resultados mostraram que, de acordo com a tabela 8, os valores encontrados de massa corporal dos animais e do peso úmido dos órgãos fígado, rim, timo, linfonodos e do coração não diferiram em comparação aos grupos controles (salina) de forma significativa, sugerindo que o tratamento com a fração FI não afetou a massa corporal antes ou depois do tratamento e nem a massa relativa desses órgãos avaliados. No entanto, houve um aumento significativo no peso do baço dos camundongos tratados com FI, comparados ao controle.

Segundo a literatura, os polissacarídeos sulfatados de algas marinhas, como *Gracilaria cornea* (COURA *et al.*, 2012), *Champia feldmanii* (LINS *et al.*, 2009) e *Solieria filiformis* (ARAÚJO *et al.*, 2011) vêm promovendo um aumento do baço, porém sem nenhuma lesão celular ou tecidual detectada por análise histológica.

Assim, foram realizadas análises histológicas dos órgãos avaliados a fim de se verificar a presença ou não de alguma anormalidade na morfologia das células e tecidos, e os resultados mostraram que a estrutura histológica do baço dos animais tratados com a fração F I está dentro dos limites da normalidade quando comparados com o grupo controle salina (Figuras 26 e 27). Não foram observadas alterações do parênquima nem do estroma deste órgão, comprovando que o aumento no tamanho do baço anteriormente apresentado não representa injúria tecidual ou toxicidade. Os órgãos timo, coração, rim e os linfonodos, também não revelaram qualquer dano significativo para os seus tecidos quando comparados ao controle salina (Figuras 24, 25 e 26).

A análise histológica do fígado mostrou uma degeneração vacuolar panlobular leve dos hepatócitos, que pode ser uma resposta à uma lesão considerada reversível (Figuras 24 e 25)

Apesar das discretas alterações histológicas observadas no fígado, não houve alterações na atividade enzimática das transaminases (TGO e TGP) e fosfatase alcalina, utilizadas como marcadores de função hepática nos animais tratados, em comparação ao respectivo controle. Portanto, é razoável concluir que esta alteração é de pouca importância toxicológica. O grupo tratado com F I também apresentou função renal normal porque não induziu qualquer alteração da uréia no sangue e nos níveis de creatinina (Tabela 8).

Além dessas investigações, o nosso estudo também avaliou os principais parâmetros hematológicos (Tabela 9). Os resultados mostraram que todos os parâmetros avaliados foram considerados normais em comparação com o controle salina, apesar da leve redução da quantidade de plaquetas, eritrócitos e leucócitos totais. Esta diminuição não é considerada de importância toxicológica e está dentro do intervalo de controle.

A discreta redução na contagem de hemácias, leucócitos e plaquetas podem, juntos, estarem resultando na hipertrofia do baço, já que seu aumento está relacionado a uma maior capacidade de reter e armazenar células sanguíneas (LARKIN, WATSON-WILLIAMS, 1984). Porém, não foram identificadas alterações macroscópicas ou histológicas nos tecidos hematopoiéticos associados, como o próprio baço, no aumento de 400 x e 1000 x (Figuras 26 e 27), timo e linfonodos (Figura 26). Portanto, não houve sinais consistentes de danos sistêmicos.

Tem sido demonstrado em estudos toxicológicos que os polissacarídeos sulfatados são bem tolerados em animais experimentais. Segundo Assreuy *et al.* (2008), o tratamento sistêmico (48 h) de camundongos com um polissacarídeo sulfatado (30 mg/kg ; i.v.) da alga marinha vermelha *Champia feldmannii* não resultou em sinais de toxicidade importante. Assim como a utilização de um polissacarídeo sulfatado isolado da alga marinha parda *Lobophora variegata* (1mg/ kg ; i.v.) em um tratamento de sete dias consecutivos (SIQUEIRA *et al.*, 2011).

Araújo *et al.* (2011) realizaram tratamento sistêmico durante 14 dias consecutivos com a fração polissacarídica sulfatada da alga marinha *Solieria filiformis*, analisando parâmetros bioquímicos, hematológicos e histológicos, semelhante a este estudo. Os resultados mostraram que todos os parâmetros bioquímicos e hematológicos avaliados foram considerados normais em comparação ao controle salina, apesar da leve redução de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito. Em nível histológico, no fígado foram visualizadas pequenas tumefações celulares e uma leve infiltração subcapsular de células mononucleares. No entanto, necrose e fibrose intersticial não foram observadas. Além disso, o rim apresentou ligeira degeneração nas áreas tubulares e subcapsulares. Entretanto, estas degenerações foram consideradas reversíveis e nenhuma alteração nas cápsulas renais foram observadas. Com relação aos órgãos baço, timo e linfonodos, não foi encontrada nenhuma alteração.

Coura *et al.* (2012) realizaram o mesmo tratamento sistêmico para os PST da alga *Gracilaria cornea*. Foram observadas pequenas alterações histológicas tanto do rim, quanto do coração dos animais tratados com os PST comparados aos controles. O rim mostrou ligeira

dilatação tubular e vascular e o coração apresentou uma pequena degeneração microvesicular das fibras cardíacas, porém essas alterações foram consideradas reversíveis. Os parâmetros bioquímicos e hematológicos avaliados foram considerados normais em comparação com seus respectivos controles.

Diante dos resultados bioquímicos, histológicos e hematológicos encontrados, podemos assim sugerir que a administração, no decorrer de 14 dias consecutivos, da FI de *Gracilaria birdiae* não resulta em toxicidade sistêmica importante, mostrando-se segura e bem tolerada em animais e viável como um possível composto com propriedades antivirais e anti-inflamatórias.

Tabela 8: Massa corporal e peso dos órgãos da fração F I em camundongos. * $p < 0.05$ indica diferença significativa para o grupo salina, usando teste t-Student.

Parâmetros	Tratamento (i.p.)	
	Salina	FI (10 mg/kg)
Massa corporal (g) inicial	25,39±0.89	25,43±1.13
Massa corporal (g) final	29,09±1,51	31,29±0.97
Fígado [g/100 g x peso corporal (%)]	6,02±0,34	5,39±0,15
Rim [g/100 g x peso corporal (%)]	0,91±0,04	0,85±0,02
Coração [g/100 g x peso corporal (%)]	0,60±0,02	0,59±0,01
Baço [g/100 g x peso corporal (%)]	0,42±0,03	0,65±0,05*
Timo [g/100 g x peso corporal (%)]	0,11±0,00	0,08±0,00
Linfonodos [g/100 g x peso corporal (%)]	0,32±0,02	0,47±0,05

Tabela 9: Parâmetros hematológicos da fração FI em camundongos. Após 14 dias de tratamento, as amostras de sangue foram coletadas para serem obtidos os valores destes parâmetros.* $p < 0.05$ indica diferença significativa para o grupo salina, usando teste t-Student.

Parâmetros	Tratamento (i.p.)	
	Salina	FI (10 mg/kg)
Eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$)	8,68 \pm 0,23	7,43 \pm 0,32
HGB (g/dL)	14,14 \pm 0,32	12,45 \pm 0,52
HCT (%)	44,45 \pm 1,42	40,35 \pm 1,78
VCM (fL)	51,68 \pm 1,09	53,17 \pm 0,24
HCM (pg)	16,10 \pm 0,20	16,37 \pm 0,08
CHCM (g/dL)	31,17 \pm 0,32	30,80 \pm 0,11
Leucócitos totais ($10^3/\mu\text{L}$)	3,44 \pm 0,48	2,12 \pm 0,27
Linfócitos (%)	88,54 \pm 1,43	84,78 \pm 1,03
Monócitos (%)	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
Neutrófilos (%)	11,46 \pm 1,43	15,22 \pm 1,03
PLT ($10^3/\mu\text{L}$)	767,40 \pm 98,94	638,30 \pm 86,53

Tabela 10: Parâmetros bioquímicos da fração FI em camundongos. Após 14 dias de tratamento, as amostras de plasma foram coletadas para dosagens bioquímicas (TGO, TGP, fosfatase alcalina, creatinina e uréia). * $p < 0.05$ indica diferença significativa para o grupo salina, usando teste t-student.

Parâmetros	Tratamento (i.p.)	
	Salina	FI (10 mg/kg)
TGO (UI/l)	31,82±8,38	26,13±7,20
TGP (UI/l)	7,16±0,71	7,20±1,10
Uréia (mg/dl)	36,31±1,00	31,14±1,12
Creatinina (mg/dl)	0,61±0,04	0,77±0,05
Fosfatase Alcalina (UI/L)	68,16±10,04	70,17±6,63

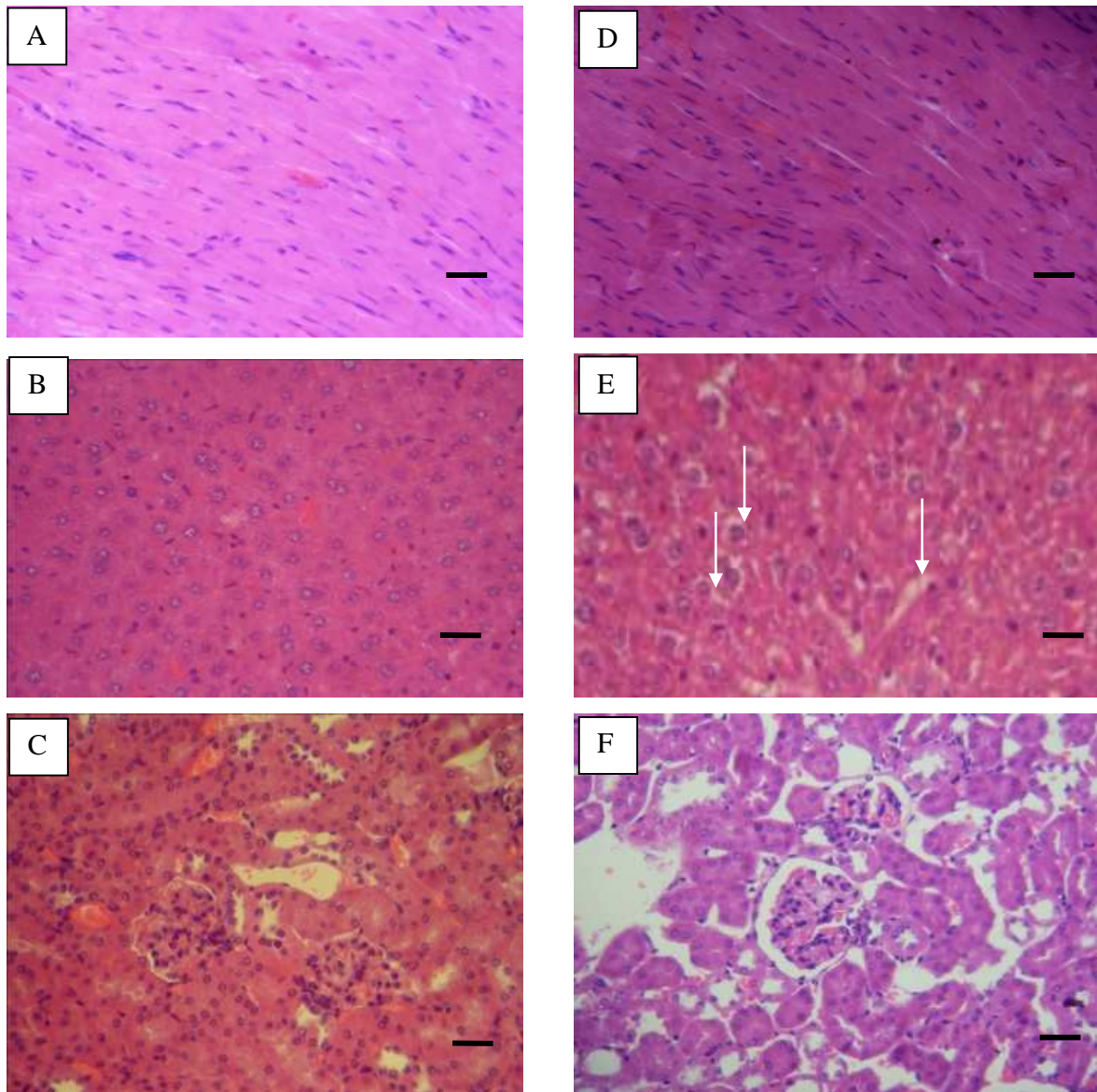


Figura 24. Fotomicrografias de luz dos órgãos coração, fígado e rim dos animais após o tratamento com a fração polissacarídica FI (10 mg/kg) após 14 dias. Grupo salina: coração (A), fígado (B) e rim (C). Grupo FI: coração (D), fígado (E), rim (F). Os órgãos foram fixados com paraformaldeído e corados com hematoxilina e eosina. O fígado mostrou leve degeneração vacuolar panlobular de hepatócitos (setas brancas), porém considerada reversível. Os tecidos foram observados por um microscópio de luz a 400 x. Barra de referência 10 μ m.

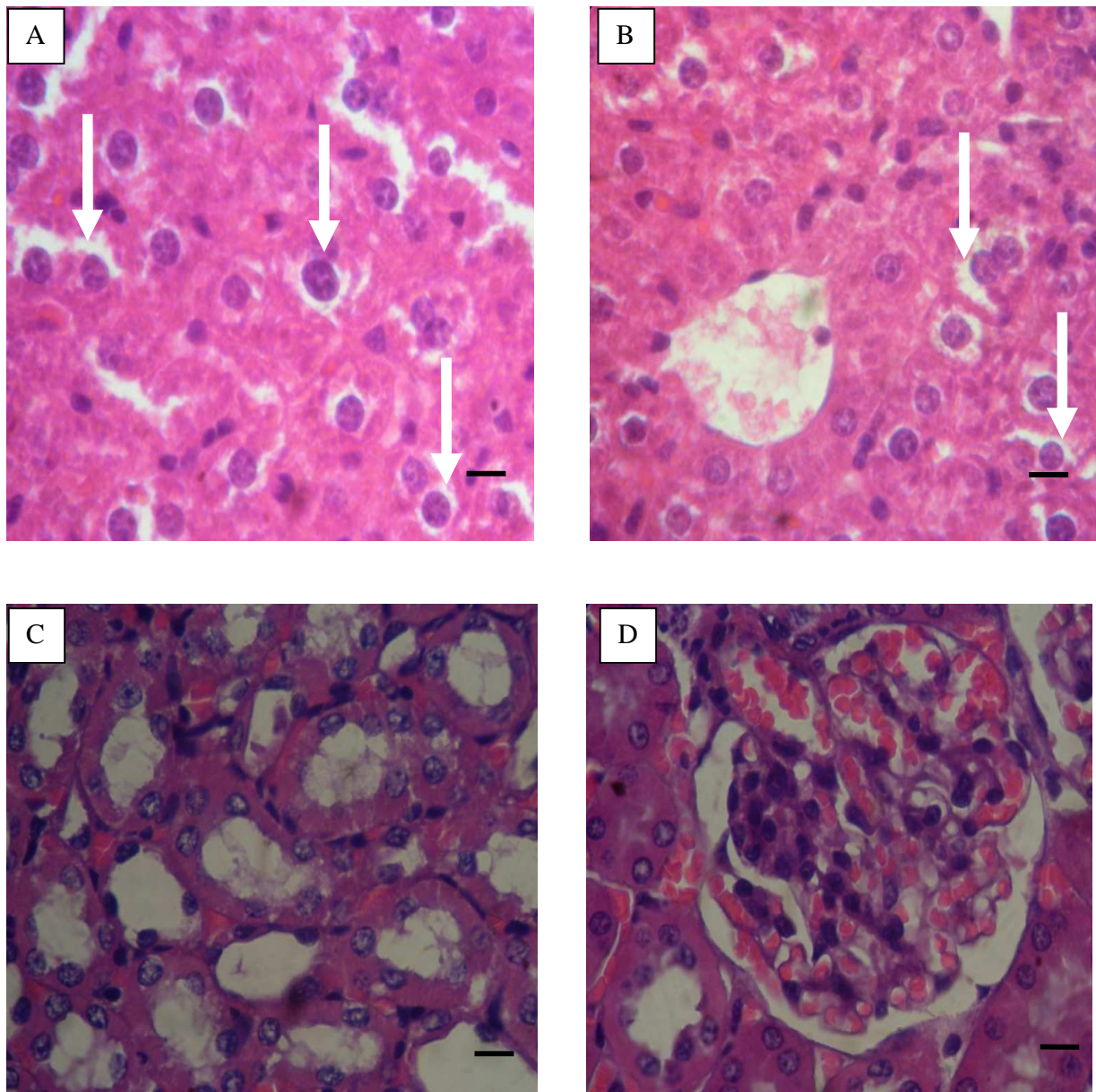


Figura 25. Fotomicrografias de luz de fígado e rim de camundongo Swiss após administração i.p. de FI (10 mg/kg) após 14 dias. (A) Hepatócitos com discreta degeneração vacuolar (setas brancas). (B) Hepatócitos com discreta degeneração vacuolar (setas brancas) e veia centrolobular normal. (C) Túbulos renais normais. (D) Glomérulo e túbulos renais normais. Aumento de 1000 x. Barra de referência 10 μ m.

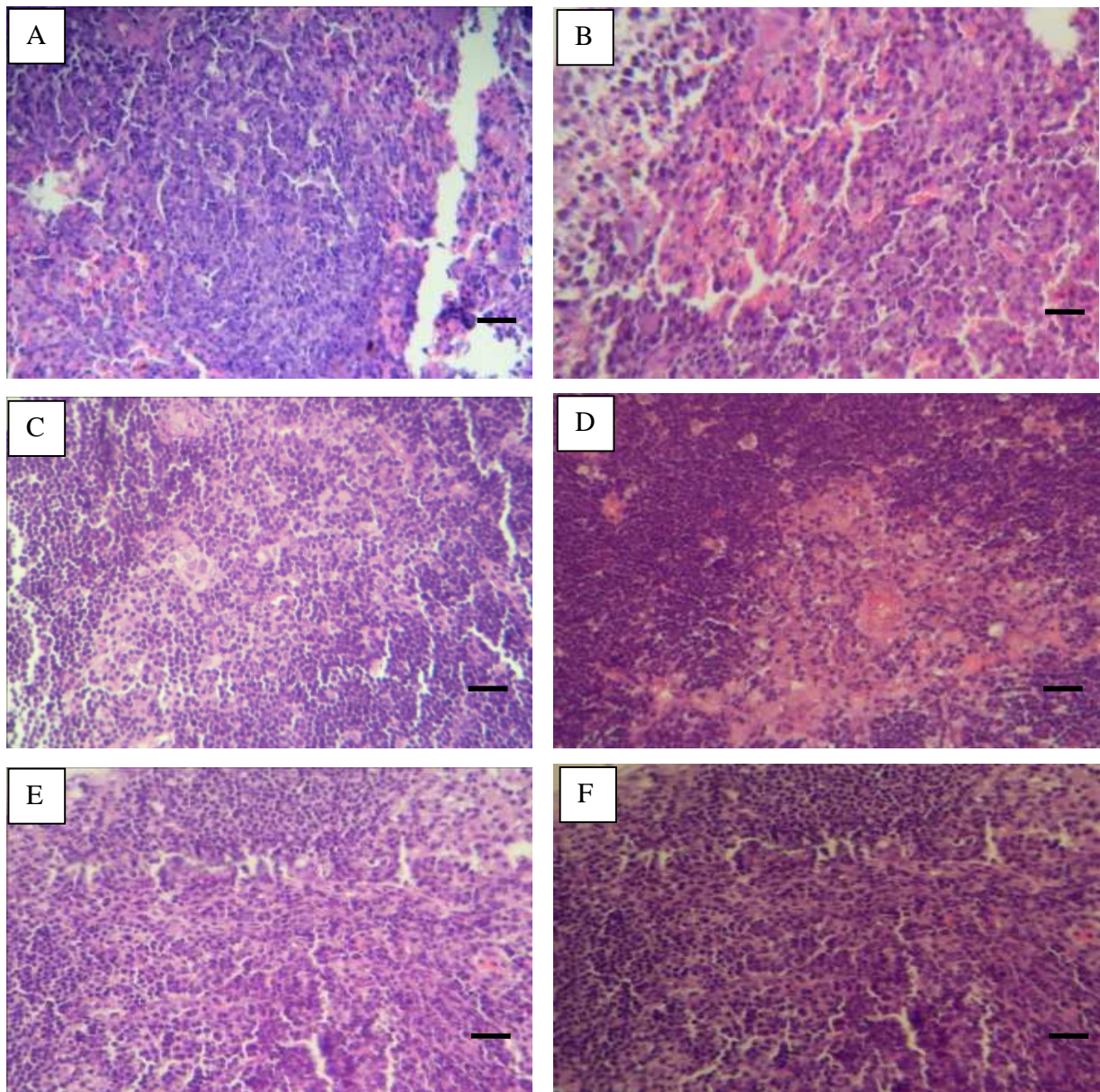


Figura 26. Fotomicrografias de luz dos órgãos baço, timo e linfonodos dos animais após o tratamento com a fração polissacarídica FI (10 mg/kg) após 14 dias. Grupo salina: baço (A), timo (B) e linfonodos (C). Grupo FI: baço (D), timo (E) e linfonodos (F). Os órgãos foram fixados com paraformaldeído e corados com hematoxilina e eosina. Os tecidos foram observados por um microscópio de luz a 400 x. Barra de referência 10µm.

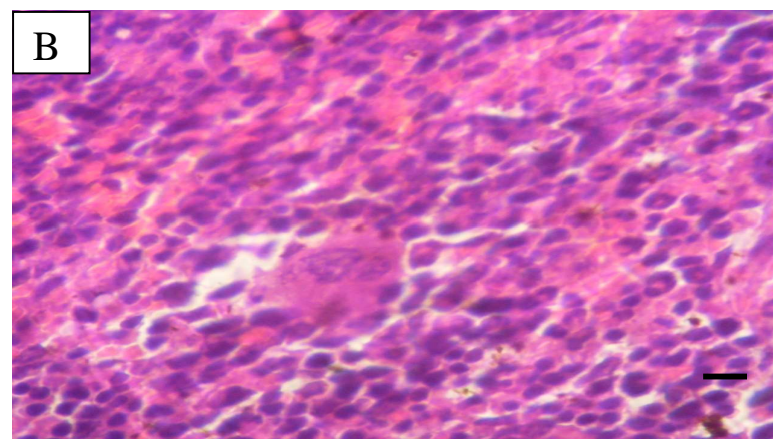
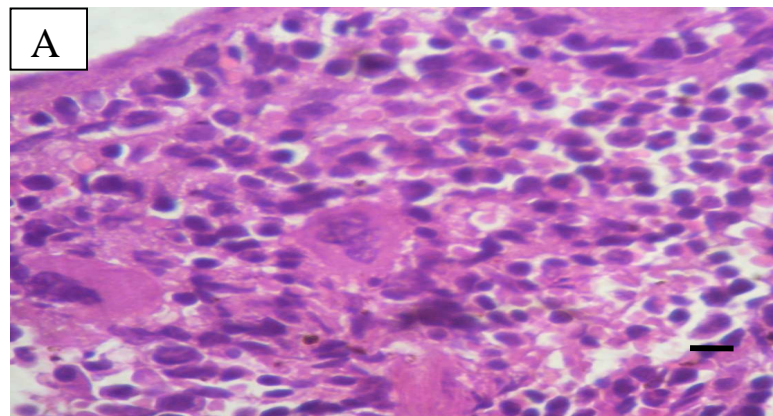


Figura 27. Fotomicrografias de luz do baço de camundongo Swiss após administração i.p. de F I (10 mg/kg) após 14 dias. (A) Polpa branca (em azul) normal (B) Polpa branca (azul) e polpa vermelha (sangue rosado) normais. Aumento de 1000 x. Barra de referência 10 μ m.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo, demonstramos que a fração FI apresentou atividade antiviral significativa contra os vírus herpes simples tipos 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2) e da dengue tipo 1 (DENV-1) através de ensaios *in vitro*;

A fração FI (10 mg/kg) apresentou atividade anti-inflamatória em modelos *in vivo*, com envolvimento da via heme oxigenase-1;

Por fim, a administração da fração F I (10 mg/kg) durante 48 horas e durante quatorze dias consecutivos por via *i.p.* em camundongos não mostrou sinais de toxicidade nos parâmetros avaliados.

7. CONCLUSÃO

A fração polissacarídica sulfatada da alga marinha vermelha *Gracilaria birdiae* apresentou atividades antiviral e anti-inflamatória, sendo o primeiro relato de um polissacarídeo sulfatado de alga marinha com atividade anti-inflamatória regulada pela via heme oxigenase.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 564p.
- ABRAHAM, N.G.; KAPPAS, A. Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. **Pharmacol Rev.**, v.60, p. 79–127, 2008.
- ADHIKARI, U. *et al.* Structure and antiviral activity of sulfated fucans from *Stoechospermum marginatum* **Phytochemistry**, v. 67, n. 22, p.2474-2482, 2006.
- ADHIKARY, A.K. *et al.* Heterogeneity of the fiber sequence in subgenus C adenoviruses. **J.Clin.Pathol.** v.57, p.612-617, 2004.
- ALBINO JÚNIOR, W. *et al.* Suplementação com glutamina melhora as reservas de glicogênio de músculos de ratos tratados com dexametasona. **Revista brasileira de Educação Física**, v.18, n.3, p.283-91, 2004.
- ALCARAZ, M.J.; FERNÁNDEZ. P.; GUILLÉN, M.I. Anti-inflammatory actions of the heme oxygenase-1 pathway. **Curr Pharm Des.** v.9, p.2541–2551, 2003.
- ALMEIDA, C.L.F. *et al.* Bioactivities from Marine Algae of the Genus *Gracilaria*. **Int. J. Mol. Sci.**, v.12, p.4550-4573, 2011.
- ANANTHI, S. *et al.* *In vitro* antioxidant and *in vivo* anti-inflammatory potential of crude polysaccharide from *Turbinaria ornata*. **Food and Chemical Toxicology**, v.48, n.1, p.187-192, 2010.
- AQUINO, R. S. *et al.* Occurrence of sulfated galactans in marine angiosperms: evolutionary implications. **Glycobiology**, Oxford, v.5, n.1, p.11-20, 2005.
- ARAÚJO, I.W.F., *et al.* Effects of a sulfated polysaccharide isolated from the red seaweed *Solieria filiformis* on models of nociception and inflammation. **Carbohydrate Polymers**, v.86, n.3, p.1207– 1215, 2011.
- ARAÚJO, G.S.; RODRIGUES, J.A.G. Maricultura da alga marinha vermelha *Gracilaria birdiae* em Icapuí, Ceará **Arq. Ciên. Mar**, v. 44, n. 1, p.62-68, 2011.
- ARMISEN, R. World-wide use and important of *Gracilaria*. **J. Appl. Phycol.**, v.7, p.231-243,1995.
- ARMISEN, R., GALACTAS, F. Production, properties and uses of agar. In: McHUGH, D.J. (Ed.), Production and Utilisation of Products from Commercial Seaweeds. **FAO Fish. Tech.** Paper 288, p.1–57, 1987.

- ASSREUY, A.M.S. *et al.* Biological effects of a sulfated-polysaccharide isolated from the marine red algae *Champia feldmannii*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.31, n.4, p.691-695, 2008.
- BAIN, B. **Células Sanguíneas: um guia prático**. 2ed. Artes Médicas, Porto Alegre, 1997, 334p.
- BALIJA, M. *et al.* Serotonin level and serotonin uptake in human platelets: A variable interrelation under marked physiological influences. **Clinica Chimica Acta** v.412, p.299-304, 2011.
- BANDYOPADHYAY, S.S. *et al.* Structural features and *in vitro* antiviral activities of sulfated polysaccharides from *Sphacelaria indica*. **Phytochemistry**, v.72, n. 2-3, p. 276-283, 2011.
- BARAHONA, T. Antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from seaweeds. A kinetic approach. **Food Hydrocolloids**, v.25,p. 529-535, 2011.
- BARSANTI, L., GUALTIERI, P. **Algae – Anatomy, Biochemistry and Biotechnology**. 1ª Ed. Boca Raton: Taylor & Francis Group, LLC, 2006, 318p.
- BASBAUM, A. I.; JULIUS, D. Novos alvos contra a dor. **Scientific American Brasil**, v.50, p.76-83, 2006.
- BERTEAU, O.; MULLOY, B. Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide **Glycobiology**, v. 13, n. 6, p. 29R-40R, 2003.
- BEZERRA, A.F.; MARINHO-SORIANO, E.; Cultivation of the red seaweed *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta) in tropical waters of northeast Brazil. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, p.1813-1817, 2010.
- BIELEFELDT-OHMANN, H. *et al.* Dengue virus binding to human leukocytic cell lines: receptor usage differs between cell types and virus strains. **Virus Res.** v.3, p.81-89, 2001.
- BILAN, M. I. *et al.* A highly regular fraction of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus distichus* L. **Carbohydrate Research**, v. 339, p. 511-517, 2004.
- BILAN, M.I. *et al.* Structure of a highly pyruvylated galactan sulfate from the Pacific green alga *Codium yezoense* (Bryopsidales, Chlorophyta) **Carbohydrate Research**, v.342, n.3-4, p.586-596, 2007.
- BLOSSOM, D. B. *et al.* Outbreak of adverse reactions associated with contaminated heparin. **The New England Journal of Medicine**, v. 359, p.2674-2684, 2008.
- BOREFREUND, E.; PUERNER, J. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. **Toxicol. Lett.**, v. 24, p. 119-124, 1985.

BOUHLAL, R. *et al.* Antiviral Activities of Sulfated Polysaccharides Isolated from *Sphaerococcus coronopifolius* (Rhodophyta, Gigartinales) and *Boergeseniella thuyoides* (Rhodophyta, Ceramiales). **Marine Drugs**, v. 9, p. 1187-1209; 2011.

BOXER, L.A. **Distúrbio da função dos fagócitos**. In: GOLDMAN, L. ; BENNETT, J.C. (Eds.) Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1013-1022, 2001.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, v. 60, p. 618-622, 1982.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação Geral do Programa Nacional de Controle da Dengue Balanço Dengue. **Semana Epidemiológica (1 a 26) de 2011**. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_dengue_072011.pdf, acessado em julho, 2011.

BROWN, E.J. Adhesive interaction in the immune system. **Cell Biology**, v.7, p.289-295, 1997.

BRUM-JÚNIOR, L. **Desenvolvimento e validação de metodologias para avaliação de etoricoxibe por cromatografia líquida e espectrometria de massas**. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Santa Maria, 2006, 116p.

BURKE, D.S., MONATH, T.P. Flaviviruses. In: Knipe DM, Howley DE, Griffin SR, Lamb A, Martin MA, Roizman B, Straus SE, eds. **Field's Virology**, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 4th ed, p. 1043–1125, 2001.

BUTLER, L.M. *et al.* Effects of endothelial basement membrane on neutrophil adhesion and migration. **Cellular Immunology**, v.251, n.1, p. 56–61, 2008

CAMPO, V.L. *et al.* Carrageenans: biological properties, chemical modifications and structural analysis – a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n.2, p.167-180, 2009.

CARDOZO, K. H. M. *et al.* Review: metabolites from algae with economical impact. **Comp Biochem Physiol C 367 Toxicol Pharmacol**. v.146, p. 60–78, 2007.

CARDOZO, F.T.G.S. *et al.* Antiherpetic activity of a sulfated polysaccharide from *Agaricus brasiliensis* mycelia **Antiviral Research**, v.92, p.108–114, 2011.

CARLUCCI, M.J. *et al.* Antiherpetic activity and mode of action of natural carrageenans of diverse structural types. **Antiviral Research**. v.43, p. 93–102, 1999.

CARVALHO FILHO, J. Algas – uma alternativa para as comunidades pesqueiras? **Panorama da Aqüicultura**, v.14, n.84, p.53-56, 2004.

CARVALHO, P.G.; BRANCO, L.G.S.; PANISSI, C.R.A.L. Involvement of the heme oxygenase-carbon monoxide-cGMP pathway in the nociception induced by acute painful stimulus in rats. **Brain Res.** v. 1385, p. 107-113, 2011.

CHAMBERS, T.J. *et al.* Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Annu Rev. Microbiol.** v.44, p.649-688, 1990.

CHANDRASEKHARAN, N.V. *et al.* COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. **PNAS**, v.99, n.21, p. 13926–13931, 2002.

CHEE, H. Y.; ABUBAKAR, S. Identification of a 48kDa tubulin or tubulin-like C6/36 mosquito cells protein that binds dengue virus 2 using mass spectrometry. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v.320, p.11–17, 2004.

CHEN, S.C. *et al.* Lagged temperature effect with mosquito transmission potential explains dengue variability in southern Taiwan: Insights from a statistical analysis. **Science of the Total Environment**, v. 408, p. 4069–4075, 2010.

CHEN, Y. *et al.* Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. **Nat. Med.** v.3, p.866–871, 1997.

CHIN, J. **Manual de controle das doenças transmissíveis.** 17 ed. Porto Alegre, Artmed, 2002.

CIANCIA, M.; QUINTANA, I.; CERREZO, A.S. Overview of anticoagulant activity of sulfated polysaccharides from seaweeds in relation to their structures, focusing on those of green seaweeds. **Curr. Med. Chem.**, v.17, p.2503–2529, 2010.

COSTA, L.S. *et al.* Heterofucan from *Sargassum filipendula* induces apoptosis in HeLa cells. **Marine Drugs**, v.9, p.603–614, 2011.

COURA, C.O. *et al.* Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of Sulphated Polysaccharides from the Red Seaweed *Gracilaria cornea*. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.110, n.4, p.335-341, 2012

COURA, C.O. **Atividades antinociceptiva e anti-inflamatória dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Gracilaria cornea*** J. Agardh. Dissertação (Mestrado). Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, 2011, 123p.

CUNHA, F.Q. *et al.* The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, v.107, n.3, p.660-664, 1992.

CUPOLILO, S.M.N. *et al.* Investigação de efeitos lesivos de doses antiinflamatórias e imunossupressoras de dexametasona sobre a mucosa gástrica em camundongos. **HU rev. Juiz de Fora**, v.33, n.1, p.17-22, 2007.

- DAMONTE, E.B., MATULEWICZ, M.C., CEREZO, A.S. Sulfated seaweed polysaccharides as antiviral agents. **Curr. Med. Chem.** v.11,p. 2399–2419, 2004.
- DANG, H.T. *et al.* Anti-inflammatory constituents of the red alga *Gracilaria verrucosa* and their synthetic analogues. **J. Nat. Prod.** v, 71, n.2, p.232-240, 2008.
- DANTAS-SANTOS, N. *et al.* Freshwater Plants Synthesize Sulfated Polysaccharides: Heterogalactans from Water Hyacinth (*Eicchornia crassipes*). **Int. J. Mol. Sci.**, v.13, p. 961-976, 2012.
- DE BOER, J.A. **A report on the fisheries training and development project.** BHA/78/001, Nassau, 1981, 301p.
- DE CLERCQ, E. D. *et al.*. Comparative efficacy of antiherpes drugs against different strains of herpes simplex virus. **J. Infect. Dis.**, v.141, p.563-574, 1980.
- DEKKER, L.V.; SEGAL, A.W. Signals to move cells. **Science**, v.287, n.11, p.982-984, 2000.
- DEUBER, V. *et al.* Direct sequencing of genomic cDNA fragment amplified by the polymerase chain reaction for molecular epidemiology of dengue 2 virus. **Archives of Virology**, v.129, p.197-210, 1992.
- DHARGALKAR V. K.; VERLECAR X. N. Southern Ocean seaweeds: A resource for exploration in food and drugs. **Aquaculture**, v. 287, p. 229–242, 2009.
- DIETRICH, C.P.; DIETRICH, S.M.C. Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. **Analytical Biochemistry**, v. 70, n. 2, p. 645-647, 1976.
- DI STASI, L.C. **Plantas Mediciniais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar.** São Paulo: Ed. UNESP, 1996.
- DODGSON, K.S.; PRICE, R.G. A note on the determination of the ester sulphate content of sulfated polysaccharides. **Biochemistry Journal**, v. 84, p. 106-110, 1962.
- DOS SANTOS, M.D. *et al.* Plant cell and microalgae culture. **In: Modern Biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry. Research Signpost**, Kerala, India, 2005.
- DREYFUSS J.L. *et al.* Heparan sulfate proteoglycans: Structure, protein interactions and cell signaling. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v.81, p.409–429, 2009.
- DUARTE, M. E. R. *et al.* Structural studies form the brown seaweed *Sargassum stenophyllum*. **Carbohydrate Research.**, v. 333,p. 281-293, 2001a.
- DUARTE, M. E. R. *et al.* Inhibitory effect of sulfated galactans from the marine alga *Bostrychia montagnei* on herpes simplex virus replication in vitro. **Phytomedicine**, v. 8, n.1, p. 53–58, 2001b.

EATON, D.L.; KLAASSEN, C.D. Principles of toxicology. In: Klaassen, C.D.; Amdur, M.O.; Doull, J. (eds.). **Csarett and Doull's Toxicology. The basic science of poisons**. 5.ed. New York: McGraw-Hill, 1996, p.13-34, 1996.

EBNER, K. *et al.* Typing of human adenoviruses in specimens from immunosuppressed patients by PCR-fragment length analyses and real-time quantitative PCR. **J Clin Microbiol**. v.44, n.8, p.2808-2815, 2006.

ERDMAN, D.D. *et al.* Molecular epidemiology of adenovirus type 7 in the United States, 1966-2000. **Emerg Infect Dis**. v.8, n.3, p.269-277, 2002.

FAILACE, R. **Hemograma: manual de interpretação**. 4 ed. Porto Alegre. Artmed, 2003.

FARIAS, W.R. *et al.* Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 275, p. 29299-29307, 2000.

FARNDALE, R.W.; BUTTLE, DJ.; BARRET, A.J. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. **Biochimistry et Biophysica Acta**, v. 883, n. 2, p. 173-177, 1986.

FAUSTO, N. *et al.* **Robbins & Cotran - Patologia - Bases Patológicas das Doenças** – 8 ed. Rio de Janeiro, Elsevier, 2010, 1480p.

FERREIRA, S. H. **Dor on line**. Disponível em: www.dol.com.br. Acessado em: junho/2009.

FIGUEIREDO, L.T.M. The Brazilian flaviviruses. **Microbes Infect.**, v. 2, p. 1643-1649, 2000.

FOGG, S. *et al.* Iron regulates hyperoxia-dependent human heme oxygenase-1 gene expression in pulmonary endothelial cells. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v.20, p.797-804, 1999.

FOLGUEIRA, M. A. A. K; BRENTANI, M. M. Câncer de mama. In: FERREIRA, C. G.; ROCHA, J. C. **Oncologia molecular**. Editora Atheneu, São Paulo, p. 135-144, 2004.

FREITAS, A. *et al.* Heme oxygenase/carbon monoxide biliverdin pathway down regulates neutrophil rolling, adhesion and migration in acute inflammation. **Br J Pharmacol**, v.149, p.345-354, 2006.

GALBRAITH, R. Heme Oxigenase: Who needs it? **P.S.E.B.M.**, v.222, p.299-305, 1999.

GAMAL-ELDEEN, A.M.; AHMED, E.F.; ABO-ZEID, M.A. In vitro cancer chemopreventive properties of polysaccharide extract from the brown alga, *Sargassum latifolium*. **Food and Chemical Toxicology**, v.47, p. 1378-1384, 2009.

GERMI, R. *et al.* Heparan sulfate-mediated binding of infectious dengue virus type 2 and yellow fever virus. **Virology**, v.292, p.162-168, 2002.

- GIACOMINI, A. *et al.* Platelet count and parameters determined by the Bayer ADVIA™ 120 in reference subjects and patients. **Clinical Lab Haemostasis**. v. 23, p.181-186, 2001.
- GILMAN, A. G. *et al.* **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 11a ed. Rio de Janeiro: Grow-Hill, 2006.
- GLENN, E.P. *et al.* Correlation between *Gracilaria parvispora* (Rhodophyta) biomass production and water quality factors on a tropical reef in Hawaii. **Aquaculture**, v.178, n.3-4, p.323-331, 1999.
- GÓMEZ-ORDÓÑEZ, E; RUPÉREZ, P. FTIR-ATR spectroscopy as a tool for polysaccharide identification in edible brown and red seaweeds. **Food Hydrocolloids**, v.25, p 1514-1520, 2011.
- GOZZELINO, R.; JENEY, V.; SOARES, M.P. Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**. v.50, p.323–354, 2010.
- GRANGEIRO, N.M.G. *et al.* Heme oxygenase/carbon monoxide-biliverdin pathway may be involved in the antinociceptive activity of etoricoxib, a selective COX-2 inhibitor. **Pharmacol Rep.**, v.63, p.112–119, 2011.
- GRAY, G.C. *et al.* Adult adenovirus infections; loss of orphaned vaccines precipitates military respiratory disease epidemics. For the Adenovirus Surveillance Group. **Clin Infect Dis**. v.31, n.3, p.663-670, 2000.
- GRESPLAN, R. **Participação das quimiocinas CXCL1 (KC) e CXCL5 (LIX) e do LTB4 na migração de neutrófilos para a cavidade articular em modelo de artrite induzida por mBSA**. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, 2006.
- GRESSLER, V. *et al.* Lipid, fatty acid, protein, amino acid and ash contents in four Brazilian red algae species. **Food Chemistry**, v.120, p. 585–590, 2010
- GROCHOT-PRZECZEK, A.; DULAK, J.; JOZKOWICZ, A. Heme oxygenase-1 in neovascularisation: a diabetic perspective. **Thrombosis Haemostasia**. v.104, p.424–31, 2010.
- GUBLER, D.J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical Microbiology Reviews.**, v. 11, p. 480-496, 1998.
- GUGLANI, L., KABRA, S. K. T cell immunopathogenesis of dengue virus infection. **Dengue Bulletin**, v. 29, p. 58-69, 2005.
- GUIMARÃES, M.; PLASTINO, E.M.; OLIVEIRA, E.C. The life history, reproduction and growth of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta) from Brazil. **Botanica Marina**, v.42, p.481-482, 1999.
- GUZMAN, M.G.; KOURI, G. Dengue haemorrhagic fever integral hypothesis: confirming observations, 1987–2007. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.102, n.6, 522–523, 2008.

HALSTEAD, S.B. Dengue. **Lancet**, v.370, n.11, p.1644–1652, 2007.

HARMOINEN, A. **Evaluation and improvement of clinical chemical laboratory tests for glomerular functions**. Dissertação (Mestrado). Tampere: Medical School of University of Tampere- Finland, 2001.

HAYASHI, S. *et al.* Induction of heme oxygenase-1 suppresses venular leukocyte adhesion elicited by oxidative stress: role of bilirubin generated by the enzyme. **Circ Res**. v.85, p.663–671, 1999.

HENCHAL, E.A.; PUTNAK, J.R. The dengue viruses. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 3, p. 376-396, 1990.

HENRY, J.B. **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. 19 ed. São Paulo, Ed. Manole, 1999, 78p.

HIDARI, K.I.P.J. *et al.* Structure and anti-dengue virus activity of sulfated polysaccharide from a marine alga. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.376, p.91-95, 2008.

HIERHOLZER, J.C. Adenoviruses in the immunocompromised host. **Clin Microbiol Rev**. v.5, n.3, p.262-274, 1992.

HILGARD, P.; STOCKERT, R. Heparan sulfate proteoglycans initiate dengue virus infection of hepatocytes. **Hepatology**, v.32, p.1069–1077, 2000.

HUNG, S.L. *et al.* Analysis of the steps involved in dengue virus entry into host cells. **Virology**, v.257, p.156–167, 1999.

HUNG, J.J. *et al.* An external loop region of domain III of dengue virus type 2 envelope protein is involved in serotype-specific binding to mosquito but not mammalian cells. **J Virol**, v. 78, p.378–388, 2004.

ISHII, S; SHIMIZU, T. Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice. **Prog Lipid Res**, v.39, p.41-82, 2000.

ISON, M.G. Adenovirus infections in transplant recipients. **Clin Infect Dis**. v.43, n.3, p.331-339, 2006.

IWALEWA, E.O. *et al.*. Inflammation: the foundation of diseases and disorders. A review of phytomedicines of South African origin used to treat pain and inflammatory conditions. **African Journal of Biotechnology**, v.6, p.2868-2885, 2007.

JEONG, G.S.; LEE, D.S.; KIM, W.C. Cucurbitacin A from *Cudrania tricuspidata* suppresses pro-inflammatory mediators through expression of anti-inflammatory heme oxygenase-1 in RAW264.7 macrophages. **Int Immunopharmacol**. v.9, n.2, p.241-246, 2009.

- JIAO, G. *et al.* Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. **Marine Drugs**, v.9, p.196–223, 2011.
- JØRGENSEN, H.S. Studies on the neuroendocrine role of serotonin. **Dan Med Bull**, v.54, n.4, p.266-288, 2007.
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, 428p.
- KAM, P.C.A. ; SO, A. COX-3: Uncertainties and controversies. **Current Anaesthesia & Critical Care**, v.20, p.50–53, 2009.
- KERR, M.G. **Exames Laboratoriais em Medicina Veterinária**. 2 ed. São Paulo: Roca, 2003. p. 61-80.
- KUADKITKAN, A. *et al.* Identification and characterization of prohibitin as a receptor protein mediating DENV-2 entry into insect cells. **Virology**, v.406, p.149–161, 2010.
- KUMAR, S; GODIYA, C.B.; SIDDHANTA, A.K. Carrageenan from *Sarconema scinaoides* (Gigartinales, Rhodophyta) of Indian waters. **Carbohydrate Polymers** v.87, p.1657–1662, 2012
- KYLE, J.L., HARRIS, E. Global spread and persistence of dengue. **Annu Ver Microbiol**, v.62, p.71–92, 2008.
- LARKIN, E.C.; WATSON-WILLIAMS, E.J. Alcohol and Blood. **Med Clin North Am**, v.68, n.1, p-105-120, 1984.
- LAGROTA, M.H.C. **Atividade antiviral *in vitro* de substâncias sintéticas e naturais**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Pós Graduação em Microbiologia, Rio de Janeiro, 1978.
- LATIMER, K.S.; MEYER. D.J. Os leucócitos na Saúde e na Moléstia. In: ETTINGER, S.J. **Tratado de medicina Interna Veterinária**. 3. ed. São Paulo: Manole, 1992. v. 4, p. 2616-2664.
- LEE , C.J. ; LIAO, C.L.; LIN, Y.L. Flavivirus activates phosphatidylinositol 3-kinase signaling to block caspase-dependent apoptotic cell death at the early stage of virus infection. **Journal of Virology**, v. 79, n. 13, p. 8388-8399, 2005.
- LEE, J.B. *et al.* Structures and antiviral activities of polysaccharides from *Sargassum trichophyllum*. **Carbohydrate Polymers**, v.86, n.2, p.995-999, 2011.
- LEES, P. *et al.* Pharmacodynamics and pharmacokinetics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in species of veterinary interest. **J. Vet. Pharmacol. Ther.**, v.27, p.479-490, 2004.
- LEITE, E. L. *et al.* Structure and pharmacological activities of a sulfated xylofucoglucuronan from the alga *Spatoglossum schröderi*. **Plant Sci.**, v. 132, n. 2, p. 215-228, 1998.

- LI, H. *et al.* Structural characterization of an anticoagulant-active sulfated polysaccharide isolated from green alga *Monostroma latissimum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 2, p.394-400, 2011.
- LIN, F; GIROTTI, A. Hemin-enhanced resistance of human leukemia cells to oxidative killing: antisense determination of ferritin involvement. **Arch Biochem Biophys**, v.352, p.51-58, 1998
- LINDENBACH, B.D.; RICE, C.M. Molecular biology of flavivirus. **Adv. Virus Res.**v.10, p. 213-221, 2003.
- LINS, K.O.A.L. *et al.* Antitumor properties of a sulfated polysaccharide from the red seaweed *Champia feldmannii* (Diaz-Pifferer). **Journal of Applied Toxicology**, v.29, n.1, p.20-26, 2009.
- LO, T.N; ALMEIDA, A.P; BEAVEN, M.A. Dextran and carrageenan evoke different inflammatory response in rat with respect to composition of infiltrates and effect of indomethacin. **J. Pharmacol. Exp Ther**, v.221, p.261–267, 1982.
- LONG, L.H. *et al.* Montmorillonite adsorbs urea and accelerates urea excretion from the intestine. **Applied Clay Science**, v.46, p.57–62, 2009.
- LONGUI, C.A. Glucocorticoid therapy: minimizing side effects. Artigo de revisão. **J Pediatr (Rio J)**. v. 83, n.5, p.S163-S171, 2007.
- LORENZI, T.F. **Manual de hematologia propedêutica e clinica**. 4ed. São Paulo, Sarvier, 2006, 722p.
- MACIEL, J.S. *et al.* Structural characterization of cold extracted fraction of soluble sulfated polysaccharides from red seaweed *Gracilaria birdiae*. **Carbohydrate Polymers**, v.71, n.4, p.559-565, 2008.
- MADIGAN, M.T. *et al.* **Microbiologia de Brock**. 12 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010, 1160p.
- MAINES, M.D. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** v.37, p. 517–54, 1997.
- MAITY T.K., *et al.* Studies on antiinflammatory effect of *Cassia tora* leaf extract (Fam. Leguminosae). **Phytotherapy Research**. **12**, p. 221–223, 1998.
- MANSON, P. Whys, whats and when of blood tests. **The Pharmaceutical Journal**, v.272, p.419-421, 2004.
- MARINHO-SORIANO, E.; BOURRET, E. Effects of season on the yield and quality of agar from *Gracilaria* species (Gracilariaceae, Rhodophyta). **Bioresource Technology**, n.90, n.3, p.329-333, 2003.
- MARINHO-SORIANO, E. *et al.*. Nutrients' removal from aquaculture wastewater using the macroalgae *Gracilaria birdiae*. **Biomass and Bioenergy**, v.33, p.327-331, 2009.

- MARTÍNEZ-BARRAGÁN, J.J.; DEL ANGEL, R.M. Identification of a putative co-receptor on Vero cells that participates in dengue 4 virus infection. **J. Virol.** v.75, p.7818–7827, 2001.
- MATSUHIRO, B. Vibrational spectroscopy of seaweed galactans. **Hydrobiologia**, v.326-327, 481-489, 1996.
- MASUKO, T. *et al.* Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. **Analytical Biochemistry**, v. 339, n. 1, p. 69-72, 2005.
- McCOUBREY, W.K., HUANG, T.J., MAINES, M.D. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. **Eur J Biochem.**v. 247, p.725-732, 1997.
- McHUGH, D. J. **A guide to the seaweed industry.** FAO fisheries technical paper. Rome: FAO, 2003, 105p.
- McMILLAN, D.E.; LI, M.; HARDWICK, W.C. Schedule control of quantal and graded dose-effect curves in a drug-drug-saline discrimination. **Pharmacol Biochem Behav.** v.68, p. 395–402, 2001.
- MEDEIROS, G.F. *et al.* Distribution of sulfated glycosaminoglycans in the animal kingdom: Widespread occurrence of heparin-like compounds in invertebrates. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1475, p.287–294, 2000.
- MEDEIROS, V.P.; *et al.* Sulfated galactofucan from *Lobophora variegata*: anticoagulant and anti-inflammatory properties. **Biochemistry**, v.73, n.9, p.1018-1024, 2008.
- MEINI, S; MAGGI, C. A. Knee osteoarthritis: a role for bradykinin? **Inflamm.Res**, v.57, p.351–361, 2008.
- MELANCON, J. M.; FOSTER, T. P. ; KOUSOULAS, K. G. Genetic Analysis of the Herpes Simplex Virus Type 1 UL 20 Protein Domains Involved in Cytoplasmic Virion Envelopment and Virus-Induced Cell Fusion. **J. Virol**, v.78, n.14, p.7329 -7343, 2004.
- MELO, M. R. S. *et al.* Isolation and characterization of soluble sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria cornea*. **Carbohydr. Polym.**, v.49, n.4, p.491-498, 2002.
- MENDES, G. *et al.* *In Vitro* Anti-HMPV Activity of Meroditerpenoids from Marine Alga *Styopodium zonale* (Dictyotales). **Molecules**, v.16, p.8437-8450, 2011.
- MICHEL, G. *et al.* The cell wall polysaccharide metabolism of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*. Insights into the evolution of extracellular matrix polysaccharides in Eukaryotes. **New Phytol.**, v.188, p.82–97, 2010.
- MIDDENDORF, P.J.; WILLIAMS, P.L. Nephrotoxicity: Toxic Responses of the Kidney. In: WILLIAMS, P.L.; JAMES, R.C.; ROBERTS, S. M. **Principles of toxicology: environmental**

and industrial applications. A Wiley-Interscience Publication, Second Edition. New York, cap. 5, p. 120- 25, 2000.

MILLÁN, J. L. Chapter 9- Alkaline Phosphatase. **Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism**, p.153-164, 2006a.

MILLÁN, J. L. Review: Alkaline Phosphatases - Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes. **Purinergic Signalling**, v.2, p.335-341, 2006b.

MILLER, O. **Laboratório para o clínico.** 8 ed. São Paulo, Atheneu, p.3-78, 1999.

MOHAMMAD-ZADEH, L.F., MOSES, L., GWALTNEY-BRANT, S.M.. Serotonin: a review. **Journal of Veterinary Pharmacological Therapy** v.31, p.187-99, 2008.

MOLLET, J-C.; RAHAOUI, A.; LEMOINE, Y. Yield, chemical composition and gel strength of agarocolloids of *Gracilaria gracilis*, *Gracilariopsis longissima* and the newly reported *Gracilaria cf. vermiculophylla* from Roscoff (Brittany). **Journal of Applied Phycology**, v.10, p.59-66, 1998.

MORAES, A.G. **Alterações anatomopatológicas em corações de camundongos submetidos à inalação crônica de cocaína crack.** Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, São Paulo, 2009, 136p.

MORRIS, M.W.; DAVEY, F.R. Exame básico do sangue. In: HENRY, J.B. **Diagnósticos Clínicos e Tratamento por métodos laboratoriais.** 19 ed. São Paulo, Manole, p.549-593, 1999.

MORRIS, C.J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. **Methods in Molecular Biology**, v.225, p.115-121, 2003.

MOURA, P.O. *et al.* Molecular epidemiology of human adenovirus isolated from children hospitalized with acute respiratory infection in São Paulo, Brazil. **J Med Virol.** v. 79, p.174-181, 2007.

MULLOY, B.; MOURÃO, P. A. S.; GRAY, E. Structure/function studies of anticoagulant sulphated polysaccharides using NMR. **J. Biotechnol.**, v. 77, p. 123-135, 2000.

MUÑOZ, J.; FREILE-PELEGRIN, Y.; ROBLEDO, D. Mariculture of *Kappaphycus alvarezzi* (Rhodophyta, Solieriaceae) color strains in tropical waters of Yucatán, México. **Aquaculture**, Amsterdam, v.239, n.1-4, p.161-177, 2004.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A. **Microbiologia médica.** 6ed. Rio de Janeiro, Elsevier, 2010, 1072p.

MURUVE, D.A. The innate immune response to adenovirus vectors. **Hum Gene Ther.** v.15, n.12, p.1157-1166, 2004.

MUTZE, S. *et al.* Myeloperoxidase-derived hypochlorous acid antagonizes the oxidative stress-mediated activation of iron regulatory protein 1. **J. Biol. Chem**, v.278, p.40542-405429, 2003.
NASCIMENTO, C.G.O.; BRANCO, L.G.S. Role of the peripheral heme oxygenase-carbon monoxide pathway on the nociceptive response of rats to the formalin test: evidence for a cGMP signaling pathway. **Eur J Pharmacol**. v. 556, n. 1-3, p. 55-61, 2007.

NASCIMENTO, C.G.O.; BRANCO, L.G.S. Role of the spinal cord heme oxygenase-carbon monoxide-cGMP pathway in the nociceptive response of rats. **Eur J Pharmacol**. v. 581, n. 1-2, p. 71-76, 2008.

NAITO, Y. *et al.* Heme oxygenase-1: a novel therapeutic target for gastrointestinal diseases. **J Clin Biochem Nutr.**, v.48, p.126–33, 2011.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5ed, Porto Alegre, Artmed, 2011, 1274p.

NISHIMURA, T.; TOKU, K.; FUKUYASU, H. Antiviral compounds. XII. Antiviral activity of aminohydrazone of alkoxyphenyl substituted carbonyl compounds against influenza virus in eggs and mice. **Kitasato Arch. Exp. Med.**, v. 50, p. 39-46, 1977.

NOGUEIRA, R.M.R. *et al.* Virological study of a dengue type 1 epidemic at Rio de Janeiro. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.83, n.2, p.219-225, 1988.

NOSEDA, M.D. **Polissacarídeos sulfatados isolados da fase tetraesporofítica de *Gigartina skottsbergii* (Rhodophyta, Gigartinales)**. Tese (Doutorado). Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, 1994, 180p.

OH,G.S. *et al.* Hydrogen sulfide inhibits nitric oxide production and nuclear factor-kappaB via heme oxygenase-1 expression in RAW264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide. **Free Radic Biol Med**, v.41, p. 106–119, 2006.

OKADA, D. Zinc protoporphyrin IX suppresses nitric oxide production through a loss of L-arginine in rat cerebellar slices. **Neuroscience Research**. v.25, p.353-358, 1996.

OLIVEIRA, E. C; ALVEAL, K.; ANDERSON, R. Mariculture of the Agar-Producing Gracilarioid Red Algae. **Reviews in Fisheries Science**, v.8, p. 345-377, 2000.

OLIVEIRA, E.C.; PLASTINO, E.M. Gracilariaceae. In: Akatsuka, I. (ed.) Biology of economic seaweeds. SPB Academic Publishing. **The Hague**, p.185-226, 1994.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Dengue**. Disponível em: <http://www.who.int/topics/dengue/en/>. Acesso em: 08/04/12.

OTTERBEIN, L.E.; MANTELL , L.L.; CHOI, A.M. Carbon monoxide provides protection against hyperoxic lung injury. **Am J Physiol**, v.276, p. L688–694, 1999.

- PAINE, A. *et al.* Signaling to heme oxygenase-1 and its anti-inflammatory therapeutic potential. **Biochemical Pharmacology**. v.80, p.1895–903, 2010.
- PAINGANKAR, M. S.; GOKHALE, M. D.; DEOBAGKAR, D. N. Dengue-2-virus-interacting polypeptides involved in mosquito cell infection. **Arch. Virol.**, v.155, p.1453–1461, 2010.
- PAINTER, T.J. Algal polysaccharides. **In: The polysaccharides**. New York: Academic Press, 1983.
- PATEL, S. Review. Therapeutic importance of sulfated polysaccharides from seaweeds: updating the recent findings. **3 Biotech.**, 2012, *In press*.
- PERCIVAL, E.; McDOWELL, R. H. Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides. **Academic Press, New York**, 1967.
- PEREIRA, M.G. *et al.* Structure and anticoagulant activity of a sulfated galactan from the red alga, *Gelidium crinale*. Is there a specific structural requirement for the anticoagulant action? **Carbohydrate Research**, Oxford, v.340, n.12, p.2015-2023, 2005.
- PLASTINO, E. M.; OLIVEIRA, E. C. *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta), a new species from the tropical South Atlantic with a terete frond and deep spermatangial conceptacles. **Phycologia**, v.41, n.4, p.389-396, 2002.
- PONCE, N. M. A. *et al.* Fucoidans from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*: extraction, methods, antiviral activity and structural studies. **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 153-165, 2003.
- PROPHET, E.B. *et al.* **Laboratory Methods in Histotechnology**. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC., 1992. 279 p.
- RANDALL, R.E.; GOODBOURN, S. Interferons and viruses; an interplay between induction, signaling, antiviral responses and virus countermeasures. **J Gen Virol**. v. 89, p.1-47, 2008.
- RANG, H.P. *et al.* **Farmacologia**. 6a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007, 829p.
- RAVEL, R. **Laboratório clínico: aplicações clínicas dos dados laboratoriais**. 6ª Ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1997, 640p.
- RAY, B.; LAYAHE, M. Cell-wall polysaccharides from the marine green alga *Ulva rigida* (ulvales, chlorophyta). Extraction and chemical composition. **Carbohydrate Research**, v.274, n.8, p. 251-261, 1995.
- REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percents endpoints. **Am. J. Hyg.**, v. 27, p. 493-497, 1938.

- RODRIGUES, J.A.G.; FARIAS, W.R.L. Avaliação comparativa dos polissacarídeos sulfatados extraídos de rodofíceas *Halymenia* spp.: ferramenta taxonômica para algas? **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, v. 4, n. 1, p. 7-20, 2009.
- RODRIGUES, J. A. G. *et al.* Polissacarídeos sulfatados isolados das clorofíceas *Caulerpa racemosa* e *Caulerpa cupressoides* – extração, fracionamento e atividade anticoagulante. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 32, n. 2, p. 113-120, 2010.
- RODRIGUES, J. A. G. *et al.* Carragenana da epífita *Hypnea musciformis* obtida do cultivo experimental de *Solieria filiformis* em Flecheiras, Estado do Ceará, Brasil. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 33, n. 2, p. 137-144, 2011.
- RODRIGUES, J. A. G. *et al.* Analysis of two drying methods on the yield and activity of sulfated polysaccharides extracted from *Halymenia* sp. (Rhodophyceae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 34, n. 1, p. 5-11, 2012a.
- RODRIGUES, J. A. G. *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory activities of a sulfated polysaccharide isolated from the green seaweed *Caulerpa cupressoides*. **Pharmacological Reports**, v.64, p.282-292, 2012b.
- RODRIGUEZ-VITA, J.; LAWRENCE, T. The resolution of inflammation and cancer. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v.21, p.61–65, 2010.
- ROGERO, S.O. *et al.* Teste *in vitro* de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. **Materials Research**, v.6, n.3, p.317-320, 2003.
- ROSTAND, K. S.; ESKO, J. D. Microbial adherence to and invasion through proteoglycans. **Infect Immun**. v.65, p.1–8., 1997.
- ROTH, J. *et al.* Molecular aspects of fever and hyperthermia. **Immunol. Allergy Clin. N. Am.**, v.29, p.229- 245, 2009.
- ROTHENBERG, M.E; HOGAN, S.P. The eosinophil. **Annu. Rev. Immunol**, v.24, p. 147-174, 2006.
- ROTHMAN, A. L. e ENNIS, F. A. Immunopathogenesis of Dengue Hemorrhagic Fever. **Virology**, v. 257, p. 1-6, 1999.
- RUSSELL, W.C. Update on adenovirus and its vectors. **J Gen Virol**. v. 81, p.2573-2604, 2000.
- RUSSELL, W.C. Adenoviruses: update on structure and function. **J Gen Virol**. v. 90, p.1-20, 2009.
- RYTER, S.W.; ALAM, J.; CHOI, A.M. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. **Physiol Rev**, v. 86, p. 583–650, 2006.

SACHS, D. ; CUNHA, FQ; FERREIRA, SH. Peripheral analgesic blockage of hypernociception: activation of arginine/NO/cGMP/protein kinase G/ATP-sensitive K⁺ channel pathway. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.101, n.10, p.3680–3685, 2004.

SALAS-BENITO, J. *et al.* Evidence that the 45-kD glycoprotein, part of a putative dengue virus receptor complex in the mosquito cell line C6/36, is a heat-shock related protein. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.77, p.283–290, 2007.

SALEHI, P *et al.* Structural and compositional characteristics of a sulfated galactan from the red alga *Gracilariopsis persica*. **Carbohydrate Polymers** v.83, p.1570–1574, 2011.

SÁNCHEZ, E.N.; DÉSPRES, P.; BARRÓN, L.C. Review Article. Innate Immune Responses to Dengue Virus. **Archives of Medical Research.** n. 36, p. 425–435, 2005.

SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE. **Informe Semanal Dengue 2011.** Fortaleza: Secretaria Municipal de Saúde, 14p, 2011.

SHENG, J. *et al.* Preparation, identification and their antitumor activities in vitro of polysaccharides from *Chlorella pyrenoidosa*. **Food Chemistry** v.105, p.533–539, 2007.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Pract Res Clin Anaesthesiol**, v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004.

SILVA, R. O. *et al.* Sulfated-Polysaccharide Fraction from Red Algae *Gracilaria caudata* Protects Mice Gut Against Ethanol-Induced Damage. **Marine Drugs**, v.9, p.2188-2200, 2011.

SIQUEIRA, R.C.L. *et al.* *In vivo* anti-inflammatory effect of a sulfated polysaccharide isolated from the marine brown algae *Lobophora variegata*. **Pharm. Biol.**,v.49, p.167-174, 2011.

SOARES, J.L.M.F. *et al.* **Métodos diagnósticos: consulta rápida.** Artmed Editora, Porto Alegre, 2002, 1096p.

SOUSA, A.A.S. *et al.* A report of a galactan from marine alga *Gelidium crinale* with in vivo anti-inflammatory and antinociceptive effects. **Fundam Clin Pharmacol.** doi: 10.1111/j.1472-8206.2011.01001.x, 2011, in press.

SOUSA, G. E. P., FERREIRA, S. H. Blockade antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. **Ag. Actions**, v. 17, p. 97-103, 1985.

SOUZA, B.W.S. *et al.* Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. **Food Hydrocolloids**, v.27, p.287-292, 2012.

SOUZA, G.E.P. *et al.* Neutrophil migration induced by inflammatory stimuli is reduced by macrophage depletion. **Agents Actions**, v.24, p.377–380, 1988.

SPINOSA, H.S., GÓRNIK, S.L., BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada a Medicina Veterinária**. 4a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 239-272, 2006.

SPILLMANN, D. Heparan sulfate: anchor for viral intruders? **Biochimie**, v.83, p.811-817, 2001.

STAFFORINI, D. M. *et al.* Platelet-activating factor, a pleiotrophic mediator of physiological and pathological processes. **Crit Rev Clin Lab Sci**, v.40, p.643–672, 2003.

STEINER, A.A. *et al.* Role of the haeme oxygenase/carbon monoxide pathway in mechanical nociceptor hypersensitivity. **British Journal Pharmacology**. v. 132, n. 8, p. 1673-1682.

STEPHANIE, B. *et al.* Carrageenan from *Solieria chordalis* (Gigartinales): Structural analysis and immunological activities of the low molecular weight fractions. **Carbohydrate Polymers**, v.81, p. 448–460, 2010.

STEPHENSON, J.R. Understanding dengue pathogenesis: implications for vaccine design. **Bull World Health Organ**, v.83, n.4, p.308–314, 2005.

STORTZ, C.A.; CERREZO, A.S. Novel findings in carrageenans, agarans and “hybrid” red seaweed galactans. **Curr. Topics Phytochem.**, v 4, p. 121-134, 2000.

SUH, G.Y. *et al.* CCAAT/enhancer-binding protein mediates carbon monoxide-induced suppression of cyclooxygenase-2. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v.35, p. 220–226, 2006.

SULLIVAN, B.M.; LOCKSLEY, R.M.; Review - Basophils: A Nonredundant Contributor to Host Immunity. **Immunity**. v.30, n.1, p. 12-20, 2009.

SZE, P. **A biology of the algae**. 3. ed. New York: McGraw-Hill. 1997. 278p.

TAKAO, M. *et al.* Role of heme oxygenase-1 in inflammatory response induced by mechanical stretch in synovial cells. **Inflamm. Res.** v.60, n.9, p. 861-867, 2011.

TALARICO, L.B. *et al.* The antiviral activity of sulfated polysaccharides against dengue virus is dependent on virus serotype and host cell. **Antiv. Res.**, v. 66, p. 103-110, 2005.

TALARICO, L.B. *et al.* Differential inhibition of dengue virus infection in mammalian and mosquito cells by iota-carrageenan. **Journal of General Virology**, v.92, n.6, p.1332-1342, 2011.

TALARICO, L.B; DAMONTE, E.B. Interference in dengue virus adsorption and uncoating by carrageenans. **Virology**, v.363, p.473-485, 2007.

TENHUNEN, R.; MARVER, H.S.; SCHMID, R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.61, p.748-755, 1968.

THEPPARIT, C.; SMITH, D.R. Serotype-specific entry of dengue virus into liver cells: identification of the 37-kilodalton/67-kilodalton high-affinity laminin receptor as a dengue virus serotype 1 receptor. **J. Virol.** v.78, p.12647–12656, 2004.

THURMOND, R. L; GELFAND, E.W; DUNFORD, P. J. The role of histamine H1 and H4 receptors in allergic inflammation: the search for new antihistamines. **Nature Publishing Group**, v.7, p.41-53, 2008.

TISCHER, P.C.S.F. **Estrutura química, propriedades reológicas e atividade antiviral das galactanas sulfatadas das algas vermelhas *Meristiella gelidium* e *Gymnogongrus griffithsiae* (GIGARTINALES)**. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Paraná. Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular. 2006, 226p.

TORTORELLA, D. *et al.* Viral subversion of the immune system. **Annu Rev Immunol** .v.18, p.861-926, 2000.

TIWARI, V. *et al.* A Role for 3-O-Sulfotransferase Isoform-4 in Assisting HSV-1 Entry and Spread. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 338, p. 930 937, 2005.

USOV, A.I. Polysaccharides of the red algae. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, v.65, p. 115–217, 2011.

USOV, A. I.; BILAN, M. I. Fucoidans-sulfated polysaccharides of brown algae. **Russian Chemical Reviews** v. 78 n. 8 p. 785-799, 2009.

USOV, A.I., IVANOVA, E.G., SHASHKOV, A.S. Polysaccharides of algae XXXIII: Isolation and ¹³C NMR spectral study of some gel-forming polysaccharides from Japan Sea red seaweeds. **Botanica Marina**, v. 26, p. 285–294, 1983.

VANDERLEI, E.S.O. *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory of lectin from the marine green alga *Caulerpa cupressoides*. **International Immunopharmacology** v.10, n.9, p.1113-1118, 2010.

VAN DE VELDE, F. *et al.* ¹H and ¹³C high resolution NMR spectroscopy of carrageenans: Application in research and industry. **Trends in Food Science & Technology**, v.13, p. 73–92, 2002.

VIANA, G. S. B. *et al.* Antinociceptive activity of sulfated carbohydrates from the red algae *Bryothamion seaforthii* (Turner) Kütz. and *B. triquetrum* (S.G. Gmel.) M. Howe. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 35, p. 713-722, 2002.

VIDOTTI, E.C.; ROLLEMBERG, M.C. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. **Química nova**, v.27, n.1, p.139-145, 2004.

- WANG, X. *et al.* Structural Biology of Shared Cytokine Receptors. **Annu. Rev. Immunol**, v. 27, p.29-60, 2009.
- WEBSTER, D.P.; FARRAR, J.; ROWLAND-JONES, S. Progress towards a dengue vaccine. **Lancet Infect Dis**, v.9, n.11, p.678–687, 2009.
- WHELTON, A. Nitrogen metabolites and renal function. In BURTIS, C.A.; ASHWOOD, E.R. **Tietz Textbook of Clinical Chemistry**, 2 ed, Philadelphia PA: WB Saunders Company, 1994, 975p.
- WHITEHORN, J.; SIMMONS, C.P. Review: The pathogenesis of dengue. **Vaccine**, v.29, n.42, p.7221-7228, 2011.
- WHITLEY, R. J.; ROIZMAN, B. Herpes Simplex Virus Infections. **Lancet**, v. 357, p. 1513-1518, 2001.
- WIJESKARA, I; PANGESTUTI, R.; KIM, S.K. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. **Carbohydrate Polymers**. v.84, p.14-21, 2011.
- WILLIS, D. *et al.* Moore AR, Frederick R, Willoughby DA. Heme oxygenase: a novel target for the modulation of the inflammatory response. **Nat Med.**, v.2, p.87–90, 1996.
- WINDMILL, K.F. ; LEE, V.W.K. Effects of castration on the lymphocytes of the thymus, spleen and lymph nodes. **Tissue and Cell**, v. 30, n. 1, p. 104-111, 1998.
- WINTER, C.A.; RISELY, E.A.; NUSS, G.W. Carrageenan-induced edema in the hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proc Soc Exp Biol Med**. v.111, p.544-547, 1962.
- WITVROUW, M. ; DE CLERCQ, E. **Review**. Sulfated Polysaccharides Extracted from Sea Algae as Potential Antiviral Drugs. **General Pharmacology**. v. 29, n. 4, p. 497–511, 1997
- WITVROUW, M.; DESMYTER, J.; DE CLERCQ, E. Antiviral portrait series: 4. Polysulfates as inhibitors of HIV and other enveloped viruses. **Antiv. Chem. Chemother.**, v.5, p.345-359, 1994.
- XU, Q.; LU, Z.H.; ZHANG, X.M. A novel role of alkaline phosphatase in protection from immunological liver injury in mice. **Liver**, v.22, p.8–14, 2002.
- YAMAZAKI, Y. *et al.* Augmentation of vascular permeability of VEGF is enhanced by KDR-binding proteins. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 355, p.693–699, 2007.
- YANG, G. *et al.* Unique effects of zinc protoporphyrin on HO-1 induction and apoptosis. **Blood**. v.97, p.1306-1313, 2001.

YANG, Y.L *et al.* Clinical and laboratory study on late-onset urea cycle defects. **Chinese Journal of Neurology**, v.37, p.158–161, 2004.

YOON, S.J. *et al.* A sulfated fucan from the brown alga *Laminaria cichorioides* has mainly heparin cofactor II-dependent anticoagulant activity. **Carbohydrate Research**, v.342, p. 2326–2330, 2007.

ZHANG, Q. In vivo antioxidant activity of polysaccharide fraction from *Porphyra haitanesis* (Rhodophyta) in aging mice. **Pharmacological Research** v. 48, p.151–155, 2003.

ZHANG, Y. *et al.* Chemical properties, mode of action, and in vivo anti-herpes activities of a lignin–carbohydrate complex from *Prunella vulgaris* **Antiviral Research**. v.75, p.242–249, 2007.

ZHU, W. *et al.* Antiviral property and mechanisms of a sulphated polysaccharide from the brown alga *Sargassum patens* against Herpes simplex virus type 1. **Phytomedicine**, v.13, p. 695–701, 2006.

Anexo 1



Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº80/10, sobre o projeto intitulado: **“BIOPROSPECÇÃO DE POLÍMEROS DE ALGAS MARINHAS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO”**, de responsabilidade de Norma Maria Barros Benevides, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 24 de março de 2011.

Fortaleza, 25 de março de 2011


Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA

Anexo 2

Inflamm. Res. (2011) 60:1121–1130
DOI 10.1007/s00011-011-0376-8

Inflammation Research

ORIGINAL RESEARCH PAPER

The involvement of the HO-1 pathway in the anti-inflammatory action of a sulfated polysaccharide isolated from the red seaweed *Gracilaria birdiae*

Edfranck de Sousa Oliveira Vanderlei · Ianna Wivianne Fernandes de Araújo · Ana Luíza Gomes Quinderé · Bruno Pedrosa Fontes · Ygor Raphael Gomes Eloy · José Ariévilto Gurgel Rodrigues · Antonio Alfredo Rodrigues e Silva · Heliáda Vasconcelos Chaves · Roberta Jeane Bezerra Jorge · Dalgimar Beserra de Menezes · Janaína Serra Azul Monteiro Evangelista · Mirna Marques Bezerra · Norma Maria Barros Benevides

Received: 10 April 2011 / Revised: 11 August 2011 / Accepted: 16 August 2011 / Published online: 31 August 2011
© Springer Basel AG 2011

Abstract

Objectives The aim of this study was to investigate the involvement of the hemoxigenase-1 (HO-1) pathway in the anti-inflammatory action of a sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria birdiae* (SP-Gb).

Methods SP-Gb (5, 10 and 20 mg/kg) was administered to Wistar rats in a peritonitis model using carrageenan or a paw edema model using carrageenan or dextran. To

analyze the involvement of HO-1 in the anti-inflammatory activity of SP-Gb, the animals were pretreated subcutaneously with a specific HO-1 inhibitor (ZnPP IX). To evaluate the systemic effects, SP-Gb (10 mg/kg) was administered to mice intraperitoneally before waiting for 48 h or for 14 days.

Results SP-Gb (10 mg/kg) caused an anti-inflammatory effect that was evidenced by a decrease in leukocytes in the peritoneal cavity. SP-Gb also reduced the paw edema induced by carrageenan and inhibited the paw edema induced by dextran in the first half-hour. After being inhibited by ZnPP IX, the anti-inflammatory effect of SP-Gb on carrageenan-induced rat paw edema was not observed. SP-Gb did not cause mortality or significant changes in the biochemical, hematological and histopathological parameters.

Conclusion SP-Gb may be used as a tool for further investigations into the inflammatory processes associated with the hemoxigenase-1 pathway.

Responsible Editor: Michael Parnham.

E. de Sousa Oliveira Vanderlei · I. W. F. de Araújo · A. L. G. Quinderé · B. P. Fontes · Y. R. G. Eloy · J. A. G. Rodrigues · N. M. B. Benevides (✉)
Department of Biochemistry, Molecular Biology, Federal University of Ceará, Campus do Pici, Bloco 907, Fortaleza, CE 60455-760, Brazil
e-mail: nmbb@ufc.br

M. M. Bezerra
Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Sobral, CE, Brazil

A. A. R. eSilva · H. V. Chaves
Faculty of Dentistry, Federal University of Ceará, Sobral, CE, Brazil

R. J. B. Jorge
Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

D. B. de Menezes
Department of Pathology and Forensic Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

J. S. A. M. Evangelista
Faculty of Veterinary Medicine, State University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

Keywords Seaweed · Sulfated polysaccharide · *Gracilaria birdiae* · Inflammation

Introduction

The primary response to infection or injury is inflammation, which functions to clear the injurious material or agent and to promote tissue repair. Inflammation is characterized by the sequential release of a battery of mediators, including bioactive amines, eicosanoids, cytokines, chemokines and growth factors that regulate increased vascular permeability and the recruitment of blood-borne leukocytes. Increased