



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

FRANCISCO CLARK NOGUEIRA BARROS

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E PROPRIEDADES
ANTITUMORAIS DOS POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS DA ALGA
MARINHA VERMELHA *GRACILARIA CAUDATA* J AGARDH**

FORTALEZA-CE

2011

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

FRANCISCO CLARK NOGUEIRA BARROS

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E PROPRIEDADES ANTITUMORAIS DOS
POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS DA ALGA MARINHA VERMELHA *GRACILARIA*
CAUDATA J AGARDH

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Área de concentração: Bioquímica Vegetal

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas

FORTALEZA-CE
2011

B277c Barros, Francisco Clark Nogueira
Caracterização estrutural e propriedades antitumorais dos
polissacarídeos extraídos da alga marinha vermelha *Gracilaria*
caudata J Agardh / Francisco Clark Nogueira Barros. 2011.
138 f.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Ponte Freitas
Área de concentração: Bioquímica Vegetal
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará,
Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia
Molecular, Fortaleza, 2011.

1. Bioquímica. 2. Alga. I. Freitas, Ana Lúcia Ponte (Orient.)

FRANCISCO CLARK NOGUEIRA BARROS

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E PROPRIEDADES ANTITUMORAIS DOS
POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS DA ALGA MARINHA VERMELHA *GRACILARIA*
CAUDATA J AGARDH

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, Área de Concentração em Bioquímica Vegetal. Este trabalho encontrar-se-á à disposição na Biblioteca Central da referida Universidade. A transcrição ou utilização de qualquer trecho deste trabalho é permitida, desde que seja feito de acordo com as normas da ética científica.

Francisco Clark Nogueira Barros

Aprovada em 06 de junho de 2011.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas
Deptº de Bioquímica e Biologia Molecular – UFC (Orientador)

Profa. Dra. Leticia Veras Costa Lotufo
Deptº de Fisiologia e Farmacologia - UFC

Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira
Centro de Ciências da Saúde - UNIFOR

FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho foi realizado com o suporte das seguintes instituições:

- + **Universidade Federal do Ceará**, através do:
 - Laboratório de Bioquímica de Algas Marinhas I do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, sob a coordenação da profa. Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas.
 - Laboratório de Oncologia Experimental do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, sob a coordenação dos professores Letícia Veras Costa Lotufo, Manoel Odorico de Moraes e Cláudia Pessoa.
 - Laboratório de Polímeros do Departamento Química Inorgânica, sob a coordenação da professora Regina Célia Monteiro de Paula.
 - Centro Nordestino de Aplicação e Uso de Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN)
- + **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pela concessão de bolsa de estudo para a realização deste trabalho.
- + **Fundação Cearense de Apoio à Pesquisa (FUNCAP) e Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP)** pela concessão de auxílio financeiro para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por permitir o desenvolvimento deste trabalho.

À minha orientadora, **profa. Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas**, por ter contribuído para o meu crescimento científico e pessoal. Por todo o apoio, carinho e companheirismo a mim dedicados. Por sua orientação desde a iniciação científica.

À **profa. Dra. Regina Célia Monteiro de Paula**, por sua contribuição fundamental para realização deste trabalho, por sua disponibilidade em discutir os resultados.

Ao **prof. Dr. Edilberto Silveira Rocha**, pela disponibilidade do CENAUREMN na realização dos experimentos de Ressonância Magnética Nuclear.

À **profa. Dra. Jeanny da Silva Maciel**, pela disposição na realização dos experimentos de Ressonância Magnética Nuclear.

À **profa. Dra. Letícia Veras Costa Lotufo**, por ter aberto as portas do Laboratório de Oncologia Experimental para a realização deste trabalho e por aceitar participar da banca examinadora deste trabalho.

À **profa. Dra. Nylane Maria Nunes Alencar**, pela ajuda na realização dos testes bioquímicos e hematológicos.

À **profa. Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves**, pelo auxílio com as análises histopatológicas.

Ao **prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira**, por todos os conselhos e ensinamentos e por aceitar participar da banca examinadora deste trabalho.

Aos professores da Pós Graduação em Bioquímica, por todos os ensinamentos.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pela disposição em ajudar, sempre que necessário.

Aos amigos **Luciano de Sousa Chaves, Dráulio Costa da Silva, Bartolomeu Warlene S. de Souza e Jacilane Ximenes Mesquita e Fábria Karine Andrade** pelo companheirismo e ajuda desde a época da graduação no curso de Ciências Biológicas. Pelos momentos agradáveis, pelas alegrias compartilhadas, pelo apoio incessante.

Aos amigos do laboratório de Bioquímica de Algas Marinhas I, pelo companheirismo, discussões científicas e disposição em ajudar.

Aos alunos do Laboratório de Oncologia Experimental, em especial aos estudantes **José Delano Barreto Marinho Filho e Kézia Oliveira Abrantes de Lacerda Lins**, pelo auxílio na realização dos ensaios com células tumorais.

Aos alunos do Laboratório de Farmacologia e Bioquímica Clínica, em especial aos estudantes **Ingrid Figueiredo e Ítalo Cavalcante**, pelo auxílio na realização dos ensaios hematológicos e bioquímicos.

À minha noiva **Iara Lorena Gonçalves Silveira**, por me encorajar nos momentos de dificuldade. Por compreender os momentos em que não pude estar ao seu lado devido à realização deste trabalho. Pelo apoio incondicional e pelo amor que compartilhamos.

À **minha família**, que sempre esteve presente incentivando e apoiando minha trajetória acadêmica. Em especial aos meus pais **Jovenir Nogueira de Souza e Eliseu Barros Filho**, por terem me educado e ensinado valores que sempre seguirei. Por todo o amor, carinho e confiança a mim depositados. Essa conquista é nossa!

“Nem toda experimentação realizada pode provar que estou certo; um único experimento pode provar que estou errado”

Albert Einstein

RESUMO

Caracterização estrutural e propriedades antitumorais dos polissacarídeos extraídos da alga marinha vermelha *Gracilaria caudata* J Agardh

As algas marinhas são consideradas uma rica fonte de moléculas bioativas. Neste trabalho a alga marinha vermelha *Gracilaria caudata* foi submetida a extração aquosa a quente de seus polissacarídeos e apresentou rendimento de 32,8%. Os polissacarídeos extraídos de *G. caudata* (PGC) apresentaram 1% de átomos de enxofre e um grau de sulfatação de 0,13. A massa molar de PGC foi determinada por cromatografia de permeação em gel e mostrou ser da ordem de $2,5 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$. A análise química feita por Infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear de PGC revelou que esse composto pertence é uma galactana tipo ágar, constituído basicamente por resíduos alternantes de β -D-galactose e 3,6 α -L-anidrogalactose com grupamentos hidroxila substituídos por ésteres de sulfato, metil e piruvato. As propriedades antitumorais de PGC foram investigadas *in vitro* e *in vivo*. A citotoxicidade de PGC foi avaliada *in vitro* pelo ensaio do metil tiazolil tetrazolium (MTT). Esse ensaio demonstrou que PGC apresentou valores de CI_{50} (concentração inibitória média) maiores que $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para todas as células testadas, sendo considerado não tóxico. A atividade antitumoral *in vivo* de PGC contra células de Sarcoma 180 transplantadas em camundongos foi avaliada e demonstrou efeito anticâncer em ambas as vias de administração intraperitoneal e oral. PGC reduziu significativamente o crescimento do tumor em 47,59 e 53,53% nas doses de 25 e 50 mg.kg^{-1} quando administrado intraperitonealmente. A administração oral de 50 e 100 mg.kg^{-1} de PGC causou taxas de inibição de 37,27 e 35,98%, respectivamente. O polissacarídeo extraído de *G. caudata* (25 mg.kg^{-1}) potencializou o efeito antitumoral apresentado pelo 5-FU (10 mg.kg^{-1}) de 37,22 para 70,74% quando administrados conjuntamente. As análises histopatológicas do fígado e rim mostraram que esses órgãos foram moderadamente afetados pelo tratamento com PGC. Contudo, nenhuma alteração significativa nos parâmetros marcadores de toxicidade renal (uréia) ou hepática (AST e ALT) foi observada. Os resultados obtidos após tratamento por via ip. demonstraram que PGC aumentou o peso relativo do baço, induziu hiperplasia de folículos linfóides, aumentou a percentagem de neutrófilos e reverteu a leucopenia ocasionada por 5-FU, sugerindo que a atividade antitumoral pode estar relacionada às suas propriedades imunomodulatórias.

Palavras-chave: *Gracilaria caudata*, polissacarídeo, atividade antitumoral, Sarcoma 180.

ABSTRACT

Structural characterization and antitumor properties of the polysaccharides extracted from the red seaweed *Gracilaria caudata* J Agardh

Seaweeds are considered an important source of bioactive molecules. In this work the red marine alga *Gracilaria caudata* was submitted to aqueous extraction of their polysaccharides and presented a recovery of 32.8%. The extracted polysaccharides of *G. caudata* (PGC) had 1% of sulfur atoms and a degree of sulfation of 0.13. The molar mass of PGC was determined by gel permeation chromatography and the molar mass detected was 2.5×10^5 g.mol⁻¹. Chemical analysis made by spectroscopic methods such as Infrared and Nuclear Magnetic Resonance of PGC demonstrated to belong to the agar type galactan family, mainly constituted by alternating residues of β -D-galactose and 3,6- α -L-anhydrogalactose with the hydroxyl groups substituted by ester sulfate, methyl groups and pyruvic acid acetal. Seaweed polysaccharides have recently been shown to act as antitumor agents. The antitumor properties of the polysaccharides extracted from *G. caudata* (PGC) were investigated *in vitro* and *in vivo*. The cytotoxicity of PGC was evaluated *in vitro* by the methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. This assay demonstrated that PGC had IC₅₀ values greater than 25 μ g.mL⁻¹ for all tested cells, being considered non-toxic. The *in vivo* antitumor activity of PGC against Sarcoma 180 cells transplanted in mice was evaluated and showed anticancer effect in both oral and intraperitoneal routes of administration. PGC significantly reduced tumor growth in 47.59 and 53.53% at the doses of 25 and 50 mg.kg⁻¹ when administered intraperitoneally. The oral administration of 50 and 100 mg.kg⁻¹ of PGC caused inhibition rates of 37.27 and 35.98%, respectively. Interestingly, PGC (25 mg.kg⁻¹) enhanced the antitumor effect presented by 5-fluorouracil (10 mg.kg⁻¹) from 37.22 to 70.74%. The histopathological analysis of liver and kidney showed that both organs were moderately affected by PGC treatment. Though, no significant changes in renal (urea) or liver (enzymatic activity of Alanine and Aspartate aminotransferase) parameters were observed. Results demonstrated that PGC administered by intraperitoneal route increased the relative spleen weight, induced a hyperplasia of lymphoid follicles, enhanced the neutrophil percentage and reverted the leucopeny induced by 5-FU, suggesting that the observed antitumor activity could be related to its immunomodulatory properties.

Keywords: *Gracilaria caudata*, polysaccharide, Antitumor activity, Sarcoma 180.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Representação em cadeia da estrutura básica das galactanas de algas marinhas.....	24
FIGURA 2	Estrutura básica repetitiva de galactanas tipo agarana.....	28
FIGURA 3	Estrutura química básica da agarose, também chamada de agarobiose e da agarpectina, também conhecida como agarana.....	29
FIGURA 4	Estrutura química básica de carragenanas e carragenoses.....	32
FIGURA 5	Representação esquemática de diferentes estruturas da unidade dimérica repetitiva das carragenanas comerciais e estruturas relacionadas.....	33
FIGURA 6	Capacidades adquiridas por células neoplásicas necessárias ao desenvolvimento de tumores malignos.....	37
FIGURA 7	Relação entre os aspectos intrínsecos (autônomos) e extrínsecos (células imunes) da progressão tumoral.....	45
FIGURA 8	Fotografia da alga marinha vermelha <i>Gracilaria caudata</i>	57
FIGURA 9	Estratégia experimental para extração dos polissacarídeos da alga <i>Gracilaria caudata</i>	59
FIGURA 10	Perfil cromatográfico do polissacarídeo extraído da alga <i>Gracilaria caudata</i> em cromatografia de permeação em gel.....	68
FIGURA 11	Espectro de absorção na região do infravermelho do polissacarídeo PGC isolado da alga <i>Gracilaria caudata</i>	69
FIGURA 12	Espectro de RMN de ^1H do polissacarídeo de <i>G. caudata</i> (PGC).....	70
FIGURA 13	Espectro de RMN de ^{13}C do polissacarídeo de <i>G. caudata</i> .(PGC).....	70
FIGURA 14	Espectro de DEPT 135 do polissacarídeo extraído da alga <i>Gracilaria caudata</i>	71

FIGURA 15	Espectro de HSQC de ¹³ C e ¹ H do polissacarídeo extraído da alga <i>Gracilaria caudata</i>	72
FIGURA 16	Efeito do polissacarídeo extraído de <i>G. caudata</i> (PGC) sobre o crescimento tumoral em camundongos transplantados com Sarcoma 180 tratados por via intraperitoneal.....	75
FIGURA 17	Efeito do polissacarídeo extraído de <i>G. caudata</i> (PGC) sobre o crescimento tumoral em camundongos transplantados com Sarcoma 180 tratados por via oral.....	75
FIGURA 18	Fotomicrografias de cortes histológicos (400x) do tumor de camundongos transplantados com tumor sarcoma 180 tratados por via intraperitoneal.....	79
FIGURA 19	Fotomicrografias de cortes histológicos (400x) do tumor de camundongos transplantados com tumor sarcoma 180 tratados por via oral.....	80
FIGURA 20	Fotomicrografias de cortes histológicos (400x) do fígado de camundongos transplantados com tumor sarcoma 180 tratados por via intraperitoneal.....	81
FIGURA 21	Fotomicrografias de cortes histológicos (400x) do fígado de camundongos transplantados com tumor sarcoma 180 tratados por via oral.....	82
FIGURA 22	Fotomicrografias de cortes histológicos (100 e 400x) do baço de camundongos transplantados com tumor sarcoma 180 tratados por via intraperitoneal.....	83
FIGURA 23	Fotomicrografias de cortes histológicos (100 e 400x) do baço de camundongos transplantados com tumor sarcoma 180 tratados por via oral.....	84
FIGURA 24	Fotomicrografias de cortes histológicos (400x) do rim de camundongos transplantados com tumor sarcoma 180 tratados por via intraperitoneal..	85
FIGURA 25	Fotomicrografias de cortes histológicos (400x) do rim de camundongos transplantados com tumor sarcoma 180 tratados por via oral.....	86
FIGURA 26	Fotomicrografias de cortes histológicos (100 e 400x) do estômago de camundongos transplantados com tumor sarcoma 180 tratados por via	

	oral.....	87
FIGURA 27	Efeito do polissacarídeo isolado de <i>G. caudata</i> (PGC) associado com 5-fluorouracil sobre o crescimento tumoral em camundongos transplantados com Sarcoma 180.....	91
FIGURA 28	Fotomicrografias de cortes histológicos (400x) do tumor de camundongos transplantados com tumor sarcoma 180 tratados por via intraperitoneal.....	95
FIGURA 29	Fotomicrografias de cortes histológicos (400x) do fígado de camundongos transplantados com tumor sarcoma 180 tratados por via intraperitoneal.....	96
FIGURA 30	Fotomicrografias de cortes histológicos (400x) do rim de camundongos transplantados com tumor sarcoma 180 tratados por via intraperitoneal..	97
FIGURA 31	Fotomicrografias de cortes histológicos (100 e 400x) do baço de camundongos transplantados com tumor sarcoma 180 tratados por via intraperitoneal.....	98
FIGURA 32	Estrutura básica repetitiva do polissacarídeo isolado da alga <i>Gracilaria caudata</i>	109

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Notações abreviadas dos resíduos de açúcar e grupos substituintes em ágares e carragenanas.....	26
TABELA 2	Estimativas para o ano 2010 de número de casos novos por câncer no Brasil em homens e mulheres, segundo localização primária.....	35
TABELA 3	Rendimento e análise do polissacarídeo da alaga <i>Gracilaria caudata</i> extraído a 100° C por 2 horas.....	67
TABELA 4	Assinalamentos de RMN de 1H e 13C para o polissacarídeo PGC.....	73
TABELA 5	Efeito do polissacarídeo extraído de <i>G. caudata</i> (PGC) sobre a massa úmida de órgãos (g/100g de massa corpórea) de camundongos transplantados com Sarcoma 180 ($2,0 \times 10^6$ células por animal, s.c.).....	77
TABELA 6	Efeito do polissacarídeo extraído de <i>G. caudata</i> (PGC) sobre parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos transplantados com Sarcoma 180.....	89
TABELA 7	Efeito do polissacarídeo extraído de <i>G. caudata</i> (PGC) sobre parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos transplantados com Sarcoma 180.....	90
TABELA 8	Efeito do polissacarídeo extraído de <i>G. caudata</i> (PGC) associado com 5-fluorouracil sobre a massa úmida relativa de órgãos (g/100g de massa corpórea) de camundongos transplantados com Sarcoma 180 (2.0×10^6 células por animal, s.c.).....	93
TABELA 9	Efeito do polissacarídeo extraído de <i>G. caudata</i> (PGC) sobre parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos transplantados com Sarcoma 180.....	100
TABELA 10	Efeito do polissacarídeo extraído de <i>G. caudata</i> (PGC) sobre parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos transplantados com Sarcoma 180.....	101
TABELA 11	Rendimento de polissacarídeos extraídos de algas do gênero <i>Gracilaria</i>	103

TABELA 12	Atribuições no espectro do infravermelho para polissacarídeos de algas marinhas.....	105
TABELA 13	Assinalamentos de referência do espectro de RMN de ¹³ C.....	107

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Considerações Gerais Sobre Algas	17
1.2. Importância Ecológica das Algas	19
1.3. Importância Econômica de Algas Marinhas	20
1.4. Polissacarídeos de algas marinhas	21
1.4.1. Polissacarídeos sulfatados de algas marinhas vermelhas	23
1.4.2. Galactanas tipo ágar	26
1.4.3. Galactanas tipo carragenana	30
1.5. Considerações gerais sobre o câncer	34
1.5.1. Incidência de câncer no Brasil e no Mundo	34
1.5.2. Características intrínsecas do câncer	35
1.5.3. O sistema imune	41
1.5.4. A resposta imune contra o câncer	44
1.5.5. Propriedades farmacológicas de polissacarídeos	50
1.5.5.1. Propriedades farmacológicas de polissacarídeos de algas marinhas	53
1.5.5.2. Propriedades farmacológicas de polissacarídeos do gênero <i>Gracilaria</i>	55
2. OBJETIVOS	56

2.1. Objetivo Geral	56
2.2. Objetivos Específicos	56
3. MATERIAIS E MÉTODOS	57
3.1. Alga marinha – Coleta e processamento	57
3.2. Extração e isolamento dos Polissacarídeos da alga <i>Gracilaria caudata</i>	58
3.3. Determinação de Proteínas	58
3.4. Quantificação de Sulfato e Carbono	60
3.5. Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)	60
3.6. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho	61
3.7. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	61
3.8. Atividade antitumoral de PGC <i>in vitro</i>	61
3.8.1. Linhagens de células tumorais	61
3.8.2. Manutenção das células tumorais	62
3.8.3. Determinação do efeito de PGC sobre células tumorais <i>in vitro</i>	62
3.9. Atividade Antitumoral de PGC <i>in vivo</i>	63
3.9.1. Obtenção e manutenção dos animais	63
3.9.2. Manutenção das células tumorais	63
3.9.3. Determinação do efeito de PGC sobre o crescimento tumoral <i>in vivo</i>	63
3.9.3.1. Análise dos dados	64
3.9.3.2. Análise morfológica e histopatológica	65
3.9.3.3. Determinação do efeito de PGC sobre parâmetros hematológicos e bioquímicos	65
3.9.4. Determinação do efeito associado de PGC e 5-FU sobre o crescimento tumoral <i>in vivo</i>	65
4. RESULTADOS	67

4.1. Extração, Rendimento e Análises Químicas do Polissacarídeo de <i>G. caudata</i>	67
4.2. Determinação da massa molar por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)	68
4.3. Espectro de Absorção na Região do Infravermelho	68
4.4. Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^{13}C e ^1H	69
4.5. Efeito de PGC sobre células tumorais <i>in vitro</i>	73
4.6. Efeito de PGC sobre o crescimento tumoral <i>in vivo</i>	74
4.7. Análise morfológica e histopatológica	76
4.8. Efeito de PGC sobre parâmetros hematológicos e bioquímicos	88
4.9. Efeito antitumoral associado de PGC e 5-fluorouracil	91
4.10. Análise morfológica e histopatológica do tratamento associado de PGC e 5-FU	92
4.11. Efeito do tratamento associado de PGC e 5-FU sobre parâmetros hematológicos e bioquímicos	99
5. DISCUSSÃO	102
5.1. Caracterização do polissacarídeo da alga <i>Gracilaria caudata</i> (PGC)	102
5.2. Efeito antitumoral do polissacarídeo isolado da alga <i>Gracilaria caudata</i>	109
6. CONCLUSÃO	117
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais Sobre Algas

Alga é um termo genérico desprovido de significado taxonômico que inclui organismos eucariontes fotossintéticos, possuidores de clorofila *a* e talo não diferenciado em raiz, caule ou folhas, com hábito predominantemente aquático. Estes organismos não são necessariamente semelhantes entre si e nem sempre possuem origem evolutiva próxima (OLIVEIRA, 2003).

Este coletivo abrange ampla variabilidade morfológica, estrutural e metabólica, possuindo diferentes ciclos de vida. As principais características exclusivas deste grupo são a presença de estrutura reprodutiva unicelular ou, quando multicelular, com todas as células férteis não possuindo, portanto, tecido constituído de células estéreis envolvendo os órgãos de reprodução e tampouco um sistema diferenciado para condução de água. Assim, esse aglomerado de organismos forma um grupo artificial e é classificado atualmente no reino Protista, formando grupos polifiléticos (VAN DEN HOEK; MANN; JAHNS, 1998; BHATTACHARYA; MEDLIN, 1998; SOGIN *et al.*, 1989; CHAPMAN; BUCHHEIM, 1992).

As algas podem ser encontradas nos mais diversos ambientes, ocorrendo desde formas livres terrestres e aquáticas até formas que vivem em associações com outros organismos, como os líquens. As formas mais comuns são aquáticas, podendo ocorrer em rios, lagos, mangues e mares. Nestes ambientes, podem fazer parte dos bentos, conjunto de indivíduos que vivem fixos ao substrato ou do plâncton, conjunto de indivíduos que vivem em suspensão na coluna de água devido à sua pequena ou nula capacidade de locomoção (LEE, 1989; OLIVEIRA, 2003; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

Como adaptações a diferentes ambientes, as algas podem se fixar a rochas ou substratos rochosos e calcários, aderir a conchas de moluscos ou a outras algas (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001; VAN DEN HOEK; MANN; JAHNS, 1998). São mais abundantes em regiões quentes, próximas ao equador, onde apresentam tamanho reduzido e maior variabilidade de espécie, mas se estendem até águas mais frias, atingindo maiores proporções, com menor variabilidade de espécie (VAN DEN HOEK; MANN; JAHNS, 1998; LEE, 1989).

A presença de clorofila nas algas não resulta obrigatoriamente em coloração esverdeada. Além da clorofila, esses organismos possuem pigmentos denominados acessórios, que podem mascarar a presença da clorofila proporcionando às algas colorações avermelhadas, pardas ou até enegrecidas (OLIVEIRA, 2003; VAN DEN HOEK; MANN; JAHNS, 1998).

As algas podem ser pluricelulares ou unicelulares, apresentando similaridade em muitos aspectos com as plantas, como a composição de seus carboidratos de reserva, suas proteínas e o fato de possuírem clorofila “a” como pigmento fotossintético primário (VAN DEN HOEK; MANN; JAHNS, 1998). Estas características suportaram a classificação das algas dentro do reino Plantae durante muitas décadas.

Apesar de não apresentarem origem filogenética concordante, algumas formas de classificação baseadas em suas características morfológicas e estruturais são utilizadas. Uma das classificações possíveis agrupa as algas baseado em seus tamanhos, sendo divididas em dois grandes grupos. O primeiro grupo é formado pelas algas microscópicas, chamadas de microalgas e o segundo compreende as algas macroscópicas, denominadas macroalgas (OLIVEIRA, 2003; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

Segundo Raven, Evert e Eichhorn (2001), as algas podem ser classificadas, de acordo com características bioquímicas de seus cloroplastos, substâncias de reserva, estrutura física, coloração predominante e ciclo reprodutivo, em três divisões dentro do reino Protista: Rhodophyta (algas vermelhas), Phaeophyta (algas pardas) e Chlorophyta (algas verdes).

Estudos recentes de filogenia molecular e genômica comparativa têm contribuído para reconstrução da história evolutiva de genes, famílias de genes e organismos. Com base em tais análises as algas são classificadas atualmente nas linhagens descritas a seguir: Chlorophyta (algas verdes), Rhodophyta (algas vermelhas), Glaucocystophyta (também chamado de Glaucophyta), Euglenophyta, Chlorarachniophyta e Chromophyta (que inclui os grupos Heterokonta, Haptophyta, Cryptophyta e os dinoflagelados). O grupo Chromophyta recebe essa designação por possuir as clorofilas “a” e “c”, além de vários pigmentos chamados de xantofilas, fazendo com que alguns de seus membros sejam tradicionalmente chamados de algas pardas (PRIETO; SOON; BHATTACHARYA, 2006; BHATTACHARYA; MEDLIN, 1998).

Análises baseadas na ultraestrutura de algas levaram ao reconhecimento de dois tipos fundamentalmente diferentes de plastídeos, chamados de cloroplastos simples e

complexos. O primeiro apresenta duas membranas, derivadas do fenômeno de endossimbiose primária, sendo presente nos grupos Chloropyta, Rhodophyta e Glaucocystophyta. Já os plastídeos complexos possuem três ou mais membranas, decorrentes de endossimbiose secundária, sendo representantes desse grupo virtualmente todas as outras algas (SITTE, 1993; BHATTACHARYA; MEDLIN, 1998; YOON et al., 2004).

1.2 Importância Ecológica das Algas

Devido à presença de clorofila e à realização de fotossíntese em seus cloroplastos, as algas desempenham um importante papel ecológico como produtores primários nos oceanos, mares e lagos (XU; GAO, 2008). Portanto, são utilizadas como fonte de carboidratos, proteínas e outras moléculas pelos organismos aquáticos e de maneira indireta, por quase todos os seres vivos, em função da sucessão de níveis tróficos (VAN DEN HOEK; MANN; JAHNS, 1998; VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004). As algas formam a base da cadeia alimentar nos ecossistemas aquáticos devido à sua eficiência fotossintética, sendo responsáveis por cerca de 40 a 50 % da fixação de carbono e produção de oxigênio do planeta. Em adição, as algas incorporam energia solar em biomassa através da fotossíntese, atuam na mineralização e no ciclo dos elementos químicos, desempenhando papel vital na manutenção dos ecossistemas aquáticos (KATZ et al., 2004; OLIVEIRA, 2003; VAN DEN HOEK; MANN; JAHNS, 1998; VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

As algas podem desempenhar um importante papel em processos de biorremediação, caracterizado como sendo a remoção de elementos químicos potencialmente tóxicos por organismos vivos. A biorremediação tem evoluído como uma tecnologia efetiva para o tratamento e a remoção de contaminantes de natureza orgânica e inorgânica. As algas são especialmente úteis na remoção de íons metálicos tais como cádmio, cobre, zinco, chumbo, cromo e mercúrio, além de alguns compostos orgânicos, podendo ser consideradas “espécies protetoras” no ambiente aquático, pois contribuem para diminuir a fração do contaminante “disponível” para os demais organismos. O uso de algas na recuperação de efluentes contendo espécies metálicas apresenta vantagens, como o baixo custo de operação e elevada eficiência na remoção dos contaminantes de efluentes muito diluídos. Em adição, consórcios de algas podem ser utilizados para remoção de urânio de efluentes derivados de mineração (DAVIS;

VOLESKY; MUCCI, 2003; KALIN; WHEELER; MEINRATH, 2005; VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

Vários estudos demonstraram que as algas apresentam elevada sensibilidade frente a mudanças nas condições ambientais, especialmente em casos de poluição de água. Conseqüentemente, algumas espécies de algas podem ser utilizadas como bioindicadores de poluição. Esses indivíduos são diretamente afetados por efluentes químicos ou domésticos ricos em matéria orgânica e por contaminação por metais pesados e hidrocarbonetos. Quando os nutrientes nitrogênio e fósforo estão presentes em excesso, ocorre um rápido crescimento e multiplicação de algas e, nestas condições, pode haver mudança no perfil da comunidade, dominação de uma ou algumas espécies e/ou floração de algas. As algas respondem rapidamente e previsivelmente a uma ampla variedade de poluentes e proporcionam um sinal de alerta precoce indicativo de impacto ambiental, favorecendo a ação de medidas mitigadoras para controlar tais problemas (BELLINGER; SIGEE, 2010; VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004; KUREISHY; ABDEL-MOATI; AL-MUFTAH, 1995).

1.3 Importância Econômica de Algas Marinhas

As algas marinhas são utilizadas como fonte de alimento há milênios. Existem registros de sua utilização a mais de 12 milhões de anos no sítio Monte Verde, sudeste do Chile, na América do Sul. Essa descoberta foi realizada a partir de material arqueológico coletado emlareiras e datada por radiação de ^{14}C (DILLEHAY *et al.*, 2008).

Contudo, a utilização de algas na dieta humana foi popularizada na Ásia, principalmente na China e Japão. Há registros da utilização de algas na China antes do ano 2700 a.C. Sua utilização no Japão, um dos principais produtores e consumidores de algas, parece ter sido importada da China, e a aquicultura primitiva nesse país começou por volta do ano 1670 d.C. (OLIVEIRA, 2003).

Mais de dois milhões de toneladas de algas frescas são processadas por ano para obter produtos alimentícios, principalmente no Oriente. Em adição, cerca de hum milhão e meio de toneladas de algas são coletadas por ano para extração de diversas biomoléculas de interesse econômico, tais como alginatos, ágares e carragenanas (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004; OLIVEIRA, 2003).

As macroalgas do grupo Rhodophyta são as mais exploradas no Brasil. Destas, as algas vermelhas dos gêneros *Gracilaria* e *Hypnea* são as mais utilizadas, particularmente na costa nordestina, no trecho que se estende do Estado do Ceará até a Paraíba. Estas algas são exploradas e exportadas, ficando apenas uma pequena parcela da produção no país para o processamento e produção de agar – agar pela indústria brasileira (OLIVEIRA *et al.*, 2002). Esta atividade é responsável pela coleta de milhares de toneladas de algas por ano (OLIVEIRA, 1999).

Na costa nordestina, destacam-se a bioprospecção das algas *Gracilaria cornea*, *G. caudata* e *Gracilaria* sp. A utilização dessas espécies é principalmente voltada para exportação e produção de Ágar no país. Já as algas do gênero *Hypnea*, especialmente a espécie *Hypnea musciformis*, é utilizada para a produção de kapa-carragenana, um ficolóide de grande valor econômico (OLIVEIRA, 1999).

Recentemente a espécie de alga vermelha *Kappaphycus alvarezii* foi introduzida experimentalmente no Brasil, com o objetivo de desenvolver estudos para a implantação de cultivos comerciais no litoral do sudeste brasileiro. Esse fato se deve à grande eficiência desta alga na produção de kapa-carragenana, hidrocolóide utilizado como agente espessante e estabilizante em alimentos, fármacos e cosméticos (REIS; BASTOS; GÓES, 2007). Esta espécie de macroalga vermelha, também conhecida como *Eucheuma cottonii*, foi uma das principais impulsionadoras da produção e utilização do polissacarídeo carragenana durante a década de 1960. Esta alga é ainda uma das espécies mais exploradas em todo o mundo e a principal produtora de kapa-carragenana (DE RUITER; RUDOLPH, 1997; VAN DE VELDE *et al.*, 2002; CAMPO *et al.*, 2009).

Existem também registros da exploração esporádica de duas outras algas vermelhas: *Porphyra* spp., utilizada como alimento e popularmente conhecida como Nori e *Pterocladia capilacea*, utilizada para produção de ágar-ágar. Mas, em ambos os gêneros a produção e utilização é localizada e artesanal (OLIVEIRA, 1999).

1.4 Polissacarídeos de algas marinhas

A complexidade estrutural das macroalgas é função das condições ambientais em que vivem, onde estão sujeitas às flutuações de umidade, temperatura, salinidade e intensidade luminosa (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

As algas marinhas possuem parede celular resistente, capaz de suportar a tensão mecânica decorrente do movimento das águas oceânicas e a ação abrasiva das partículas de areia em suspensão. O principal constituinte da fração fibrilar da parede celular das algas marinhas é a celulose (VAN DEN HOEK; MANN; JAHNS, 1998), um polissacarídeo linear com função estrutural formado por repetições do monossacarídeo D-glucose, unidos por ligações β (1 \rightarrow 4) (NELSON; COX, 2008).

Além da fração fibrilar, a parede celular das algas marinhas apresenta um componente amorfo e menos rígido que a celulose, o qual confere a flexibilidade e o aspecto mucilaginoso característicos das algas marinhas (KLOAREG; QUATRANO, 1988). O componente amorfo encontrado na parede celular de algas marinhas varia em função das divisões de algas. As algas vermelhas (divisão Rodophyta) possuem polissacarídeos constituídos principalmente por repetições do monossacarídeo galactose, frequentemente chamados de galactanas sulfatadas devido à presença de ésteres de sulfato em sua estrutura, que são o principal componente estrutural da parede celular desses organismos (CRAIGIE, 1990). As algas pardas (divisão Phaeophyta) produzem dois tipos de polissacarídeos como componente mucilaginoso amorfo, os alginatos e as fucanas, enquanto as algas verdes (divisão Chlorophyta) apresentam polissacarídeos mais complexos, formados por pelo menos cinco resíduos de monossacarídeos diferentes: D-galactose, ácido D-glucurônico, D-xilose, L-ramnose e L-arabinose (PAINTER, 1983).

Os polissacarídeos presentes na matriz amorfa da parede celular das macroalgas marinhas são alguns dos principais hidrocolóides usados industrialmente. O termo hidrocolóide refere-se a uma variedade de polissacarídeos e proteínas que são amplamente utilizados em vários setores industriais. Esses compostos podem ser utilizados como espessante e gelificante de soluções aquosas, estabilizante de espumas e emulsões, inibidores da formação de cristais de açúcar e de gelo, liberação controlada de aromas, dentre outras possibilidades (WILLIAMS; PHILLIPS, 2000; ARMISEN; GALACTAS, 1987).

Os hidrocolóides podem ser obtidos a partir de vegetais, algas marinhas, animais e bactérias. Gomas exsudadas, celulose, amido e pectina são hidrocolóides obtidos de vegetais. Os polímeros gelatina, caseinato e quitosana são de origem animal (WILLIAMS; PHILLIPS, 2000). Quando o hidrocolóide é obtido a partir de algas marinhas, esse composto recebe a denominação ficocolóide. Os principais ficocolóides produzidos em escala industrial são os ágares, alginatos e carragenanas (ARMISEN; GALATAS, 2000).

1.4.1 Polissacarídeos sulfatados de algas marinhas vermelhas

Os termos ágar e carragenana são usados de maneira geral para referir-se a uma família de polissacarídeos relacionados, que apresentam importantes variações intra e intermoleculares as quais afetam suas propriedades gelificantes (ROCHAS; LAHAYE; YAPHE, 1986; CRAIGIE, 1990; USOV, 1998; LAHAYE, 2001). Esses polímeros possuem elevado valor comercial devido às suas habilidades de formar fortes géis termorreversíveis a baixas concentrações em soluções aquosas. A construção e o comportamento dessas redes tridimensionais são baseados na auto-associação da estrutura primária regular desses polissacarídeos. Tal característica promove a formação de grandes agregados que somente se dissociam em temperaturas elevadas e formam colóides em temperaturas mais baixas (LAHAYE, 2001).

Essas galactanas compartilham uma estrutura básica comum, constituída por repetições do dissacarídeo formado por unidades alternadas do resíduo de β -galactopiranosose unido por ligação α (1 \rightarrow 3) e α -galactopiranosose unido por ligação β (1 \rightarrow 4), que podem ser esquematicamente chamadas de unidades A e unidade B, respectivamente. A principal diferença estrutural entre esses polissacarídeos reside no fato de a unidade B do dissacarídeo básico, ou seja, a α -galactopiranosose pertencer à série estereoisomérica L nos ágares e D nas carragenanas, enquanto os resíduos de β -galactose sempre pertencem à série D, como mostrado na Figura 1 (ROCHAS; LAHAYE; YAPHE, 1986; USOV, 1998; LAHAYE, 2001).

Dependendo da espécie de alga marinha analisada, as unidades de α -galactopiranosose podem se apresentar na forma ciclizada denominada 3,6-anidro- α -galactopiranosose ou como galactose-6-sulfato (ROCHAS; LAHAYE; YAPHE, 1986). Esses polímeros podem ainda apresentar substituições de seus grupos hidroxila por grupamentos metil, piruvato, ésteres de sulfato ou às vezes, por monossacarídeos adicionais (USOV, 1998; LAHAYE, 2001).

A estrutura dessas moléculas aniônicas varia entre as espécies, apesar de as principais características estruturais serem conservadas entre os grupos de algas. Além do tipo de enantiômero encontrado no polímero, o padrão de sulfatação é outro importante fator diferenciador dessas moléculas. A distribuição de grupos sulfato ao longo do esqueleto de galactose é bastante heterogênea e o conteúdo de sulfato entre as espécies produtoras de galactanas é notavelmente variável (POMIN; MOURÃO, 2008; POMIN, 2009; POMIN, 2010).

A ocorrência de galactanas sulfatadas é consideravelmente restrita na natureza. Elas são comumente isoladas da parede celular de algas marinhas verdes (Clorophyta) e vermelhas (Rhodophyta). Ocasionalmente, esses polímeros podem ser extraídos do revestimento gelatinoso dos ovos de ouriços do mar (Echinodermata) e da túnica externa de ascídias (Urochordata, Ascidiaceae) (POMIN, 2010).

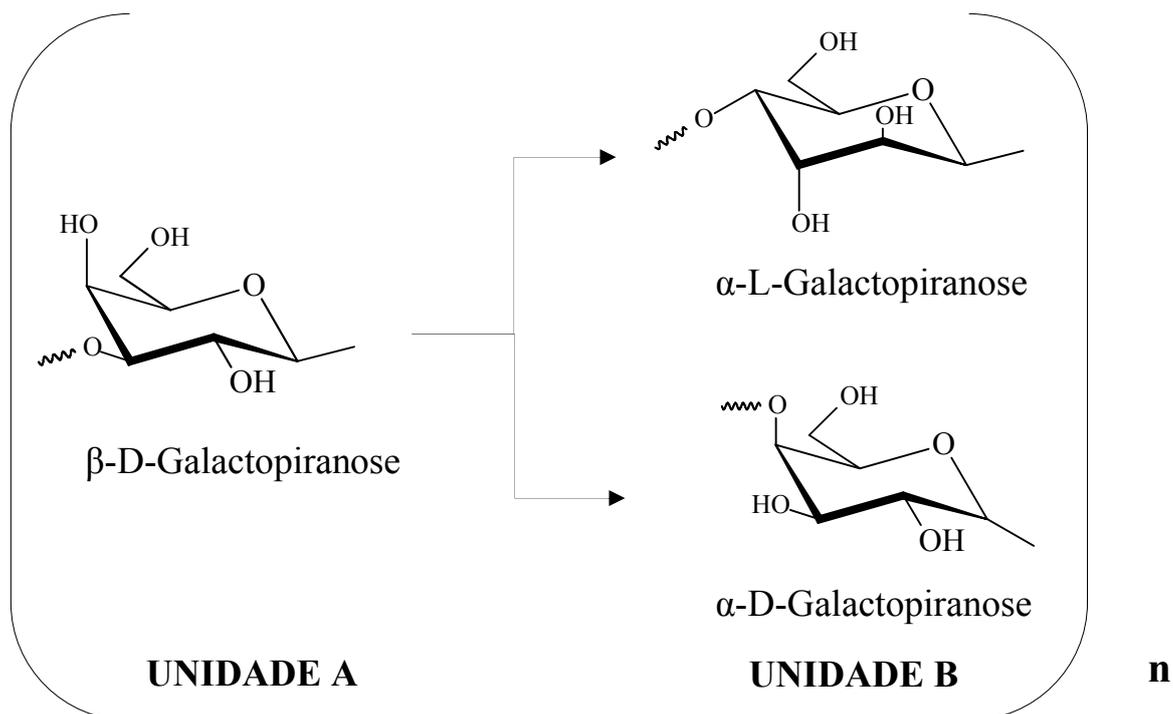


Figura 1 – Representação em cadeia da estrutura básica das galactanas de algas marinhas. A unidade A é sempre formada por (\rightarrow 3) β -D-galactopiranosose, enquanto a unidade B pode consistir de α -D-galactopiranosose para carragenanas ou α -L-galactopiranosose para ágaros.

Em adição, existe uma única descrição de galactanas sulfatadas isoladas de uma gramínea marinha (Angiospermae, Spermatophyta). Contudo, as galactanas sulfatadas são exclusivamente sintetizadas por organismos marinhos (POMIM; MOURÃO, 2008; POMIM, 2010). Em todos os casos descritos, as galactanas sulfatadas ocorrem em elevadas concentrações na matriz extracelular, de modo semelhante aos glicosaminoglicanos encontrados na matriz extracelular de tecidos conectivos de mamíferos, especialmente cartilagens (POMIN, 2010).

Modificações na estrutura básica das galactanas sulfatadas podem alterar suas propriedades físico-químicas e, conseqüentemente, suas aplicações industriais e atividades biológicas. Por exemplo, níveis elevados de unidades de 3,6-anidro- α -galactopiranosose e baixo conteúdo de sulfato são importantes requerimentos estruturais para formar géis fortes em soluções aquosas (USOV, 1998; POMIN; MOURÃO, 2008; POMIN, 2010). O grau de sulfatação dos ágares é sempre menor que o apresentado pelas carragenanas, fazendo com que produzam géis mais fortes que aqueles produzidos pelas carragenanas (ARMISEN; GALACTAS, 1987; USOV, 1998). Os grupamentos hidroxila das carragenanas são também substituídos por piruvato ou grupamentos metílicos, entretanto tais substituições são mais frequentes em ágares (LAHAYE, 2001).

Devido às várias possibilidades de combinações de posicionamento dos grupos substituintes, tanto os ágares quanto as carragenanas podem apresentar ampla variedade de estruturas diferenciadas (VAN DE VELDE *et al.*, 2002; LAHAYE, 2001; USOV, 1998). Com o objetivo de facilitar a descrição das diferentes estruturas de galactanas sulfatadas, Knutsen *et al.* (1994) propuseram o uso de notações abreviadas para referir-se às estruturas repetitivas observadas em carragenanas e ágares. Nesta notação, as letras D e L referem-se à unidade 4-*O*-ligada (unidade B) de α -D-galactose e α -L-galactose, respectivamente, enquanto DA e LA correspondem aos seus respectivos derivados anidrogalactose. A letra G representa a unidade 3-*O*-ligada β -D-galactose (unidade A) e os grupos substituintes são representados pelas letras M para éter metílico, P indicando piruvato e S correspondendo a éster de sulfato, com a posição no açúcar dado pelo número do carbono (TABELA 1).

Essa representação é baseada na universalmente aceita nomenclatura IUPAC (“International Union of Pure and Applied Chemistry nomenclature”) e permite a descrição sistemática de polímeros complexos. A maioria das publicações recentes que descrevem estruturas complexas adota essa nomenclatura baseada em letras, demonstrando a importância científica da mesma em trabalhos com ágares e carragenanas (DE RUITER; RUDOLPH, 1997; VAN DE VELDE *et al.*, 2002).

Tabela 1 – Notações abreviadas dos resíduos de açúcares e grupos substituintes em ágar e carragenanas.

<i>Letra codificada</i>	<i>Nomenclatura segundo IUPAC</i>
D	(→4)-α-D-galatopiranosose
DA	(→4)-3,6-anidro-α-D-galatopiranosose
G	(→3)-β-D-galatopiranosose
L	(→4)-α-L-galatopiranosose
LA	(→4)-3,6-anidro-α-L-galatopiranosose
M	O-metil
P	4,6-O-(1-carboxietilideno)
S	Éster sulfato
D2S,6S	(→4)-α-D-galatopiranosose-2,6-dissulfato
DA2S	(→4)-3,6-anidro-α-D-galatopiranosose
L2M,6S	(→4)-2-O-metil-α-L-galactopiranosose-6-sulfato
-G4S-DA-G-	(→3)-β-D-galatopiranosose-4-sulfato-(1→4)-3,6-anidro-α-D-galatopiranosose-(1→3)-β-D-galatopiranosose (1→)

Fonte: Adaptado de Knutsen *et al.* (1994).

1.4.2 Galactanas tipo ágar

Ágar pode ser definido como um hidrocolóide que apresenta forte poder gelificante, obtido de várias famílias de algas marinhas da divisão Rhodophyta, principalmente as famílias Gelidiaceae e Gracilariaceae (ARMISEN, 1995; MARINHO-SORIANO, 2001). Esse composto é o ficocolóide mais antigo conhecido e começou a ser manufaturado e comercializado entre os séculos XVII e XVIII no Japão (ARMISEN; GALACTAS, 1987).

Embora compartilhem certas características, os ágaros provenientes de diferentes algas possuem propriedades físico-químicas distintas. As espécies agarófitas mais utilizadas industrialmente pertencem aos gêneros *Gelidium*, *Gracilaria*, *Pterocladia* e *Gelidiella* (ARMISEN; GALACTAS, 1987). Apesar de as primeiras extrações e utilizações de ágar terem sido realizadas a partir de algas do gênero *Gelidium* (ARMISEN, 1995) as espécies do

gênero *Gracilaria* são as principais fontes de ágar encontradas na natureza (KUMAR; FOTEDAR, 2009).

A estrutura química dos ágares começou a ser estudada por técnicas de fracionamento, seguidas por hidrólise química e enzimática. Contudo, somente com o auxílio de técnicas espectroscópicas de infra-vermelho e ressonância magnética nuclear a estrutura desses polímeros pôde ser mais detalhadamente analisada (ARMISEN; GALACTAS, 1987).

O esqueleto estrutural do ágar é caracterizado por uma cadeia linear formada por unidades repetitivas de (\rightarrow 3) β -D-galactopiranosose e (\rightarrow 4) α -L-galactopiranosose (ARMISEN; GALACTAS, 1987; ARMISEN; GALACTAS, 2000) conforme descrito na Figura 2. Uma parte substancial ou mesmo todos os resíduos de (\rightarrow 4) α -galactose podem existir na forma de 3,6-anidro- α -L-galactose (USOV, 1998). O polissacarídeo formado por unidades repetitivas de (\rightarrow 3) β -D-galactopiranosose e (\rightarrow 4)-3,6-anidro- α -L-galactose é historicamente denominado agarobiose e é considerado a estrutura básica dos ágares (ARAKI, 1966, *apud* LAHAYE, 2001).

A identificação de modificações químicas naturais na estrutura do ágar por ésteres de sulfato, éteres metílicos e acetais de piruvato (ARMISEN; GALACTAS, 2000) e o grau de substituição, especialmente por ésteres de sulfato, levaram à proposição de que os polissacarídeos tipo ágar seriam formados por dois polímeros diferenciados, chamados de agarose e agarpectina, conforme demonstrado na Figura 3 (ARAKI, 1966, *apud* LAHAYE, 2001).

Segundo essa terminologia, a agarose é responsável pelo poder gelificante conhecido dos ágares, enquanto a agarpectina possui pequena habilidade para formar colóides (ARMISEN; GALACTAS, 1987).

A agarose é definida como um polissacarídeo neutro de cadeia longa, formado por resíduos de (\rightarrow 3) β -D-galactopiranosose ligados a resíduos de (\rightarrow 4) 3,6-anidro- α -L-galactose. Esse composto pode ser obtido por técnicas de fracionamento do ágar total, sendo a fração não carregada resultante. Esses polímeros podem ainda apresentar substituições de seus resíduos de monossacarídeos por 6-*O*-metil-D-galactose, L- galactose e 2-*O*-metil-L-galactose, conforme Figura 3 (ARMISEN; GALACTAS, 1987; ARMISEN; GALACTAS, 2000).

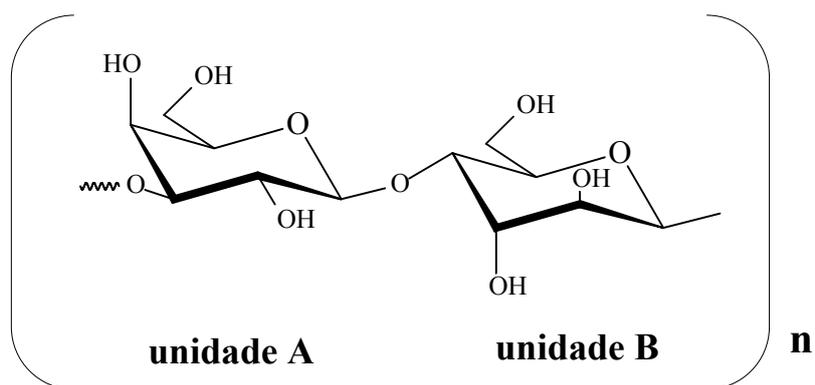


Figura 2 – Estrutura básica repetitiva de galactanas tipo agarana. O polissacarídeo é formado por repetições dos resíduos de monossacarídeos (1→3)-β-D-galactose (unidade A) e (1→4)-α-L-galactose (unidade B).

Ainda de acordo com Armisen e Galactas (1987), a fração carregada do ágar total, chamada agaropectina, é formada por repetições dos resíduos (→3) β-D-galactopiranosose e (→4) α-L-galactopiranosose com elevada quantidade de substituintes carregados. A análise da composição monossacarídica após hidrólise da agaropectina obtida de espécies agarófitas revelou a presença de resíduos de L-galactose, 3,6-anidro-L-galactose, D-galactose-2,6-dissulfato, D-galactose, ácido glucurônico, 4,6-O-(1-carboxietilideno)-D-galactose, L-galactose-6-sulfato e D-galactose-4-sulfato, sendo os dois últimos as principais unidades sulfatadas e o resíduo 3,6-anidro-L-galactose presente em quantidade moderada (FIGURA 3).

O resíduo (→4)-α-L-galactose-6-sulfato é considerado um precursor biogénico dos resíduos de (→4)-3,6-anidro-α-L-galactose. Essa conversão é catalisada nos tecidos algais por uma enzima específica (sulfato eliminasse) e pode ser quimicamente realizada por tratamento alcalino dos polissacarídeos (USOV, 1998). O ágar natural produzido por espécies do gênero *Gracilaria* não apresenta elevado poder gelificante. Contudo, a capacidade gelificante e, conseqüentemente, a qualidade do ágar pode ser melhorada por essa transformação (ARMISEN, 1995).

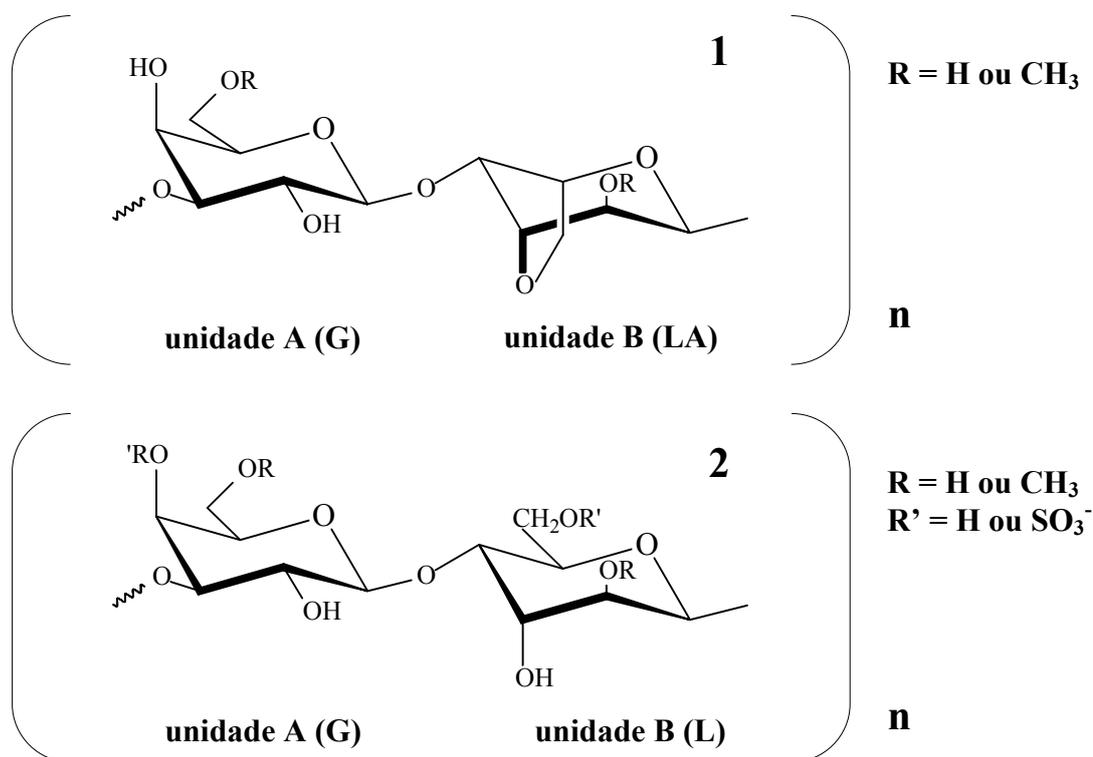


Figura 3 – Estrutura química básica da agarose, também chamada de agarbiose (1) e da agarpectina, também conhecida como agarana (2). O primeiro polímero é formado por repetições de unidades de (1→3)-β-D-galactose (unidade A) e (1→4)- 3,6-anidro-α-L-galactose (unidade B) enquanto o segundo apresenta (1→3)-β-D-galactose como unidade A e (1→4)-α-L-galactose formando a unidade B com substituições por grupamentos metil ou sulfato nos átomos indicados.

Essa classificação foi posteriormente considerada uma visão simplista devido à descoberta de galactanas que apresentam continuidade de regiões neutras e altamente carregadas observadas na mesma molécula (DUCKWORTH; YAPHE, 1971) e entre moléculas pouco e muito metiladas (LAHAYE, 1986).

Craigie (1990) propôs a substituição do termo genérico “ágar” por “agarocolóides” e que as denominações ágar e agaróide fossem utilizadas para referir-se às famílias de ágares gelificantes e não gelificantes, respectivamente. Posteriormente, Knutsen et al. (1994) propuseram o nome agarana para designar polissacarídeos construídos por unidades

alternantes de (\rightarrow 3)- β -D-galactose e (\rightarrow 4)- α -L-galactose e o termo agarose para polímeros que apresentam (\rightarrow 4)-3,6-anidro-D-galactose como segundo resíduo do dissacarídeo básico (FIGURA 3).

Os polissacarídeos de ocorrência natural podem ser formados por moléculas regulares construídas de unidades dissacarídicas idênticas repetitivas, como no caso da agarose, porém essas moléculas são mais frequentemente híbridos contendo várias unidades repetitivas substituídas (USOV, 1998). Esta característica explica a variação de nomenclaturas propostas para esses polímeros e reflete a grande diversidade estrutural que essas moléculas podem apresentar, assim como a dificuldade em criar uma terminologia que relacione perfeitamente as características estruturais e as propriedades gelificantes desses compostos (LAHAYE, 2001).

1.4.3 Galactanas tipo carragenana

As carragenanas representam um dos principais hidrocolóides utilizados na indústria alimentícia. Carragenana é um nome genérico que compreende uma família de polissacarídeos obtidos de macroalgas vermelhas como *Gigartina*, *Chondrus crispus*, *Hypnea*, *Eucheuma* e *Kappaphycus* (CAMPO *et al.*, 2009), sendo os gêneros *Eucheuma* e *Kappaphycus* os mais explorados para fins industriais (ARMISEN; GALATAS, 1987).

A primeira carragenana descoberta foi extraída de *Chondrus crispus* em 1862 e foi chamada de carragenina. Esse nome foi posteriormente substituído por carragenana para adotar o sufixo “an” característico de carboidratos (PEREIRA *et al.*, 2009). Esses polímeros são utilizados na indústria alimentícia como espessante, gelificante e estabilizante em sobremesas congeladas, achocolatados e sorvetes, assim como na produção gêneros não alimentícios como cosméticos, formulações farmacêuticas, tintas e têxteis (VAN DE VELDE; PEREIRA; ROLLEMA, 2004; VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004, VAN DE VELDE *et al.*, 2002).

As carragenanas são uma família de galactanas sulfatadas hidrossolúveis de cadeia linear, podendo apresentar diferentes padrões de substituições por ésteres de sulfato, dentre outras. As letras utilizadas para representar a estrutura desses polímeros correspondem à denominação simplificada desenvolvida por Knutsen *et al.* (1994) (TABELA 1). São

principalmente constituídas de unidades alternantes de (\rightarrow 3)- β -D-galactopiranosose (unidade G) e (\rightarrow 4)- α -D-galactopiranosose (unidade D) ou (\rightarrow 4)-3,6-anidro- α -D-galactopiranosose (unidade DA), formando a unidade dissacarídica repetitiva das carragenanas (FIGURA 4) (CAMPO *et al.*, 2009; VAN DE VELDE; PEREIRA; ROLLEMA, 2004; VAN DE VELDE *et al.*, 2002; LAHAYE, 2001; USOV, 1998; DE RUITER; RUDOLPH, 1997). Como as carragenanas naturais são uma família de polissacarídeos com diferentes padrões de substituições, o termo unidade dissacarídica repetitiva refere-se à estrutura idealizada desses polímeros (VAN DE VELDE *et al.*, 2002; USOV, 1998).

Os polissacarídeos sulfatados são classificados de acordo com a posição e número de grupamentos sulfato e presença de ligações 3,6-anidro no resíduo de galactose 4-*O*-ligado (CAMPO *et al.*, 2009; VAN DE VELDE *et al.*, 2002). Os grupos sulfato são covalentemente ligados via ligações éster dos átomos de carbono C-2, C-4 e C-6 dos resíduos de galactose (DE RUITER; RUDOLPH, 1997). Além de galactose e sulfato, outros resíduos de carboidrato podem estar presentes em carragenanas como xilose, glucose e ácidos urônicos, assim como os grupos substituintes metil éter e piruvato (VAN DE VELDE *et al.*, 2002; LAHAYE, 2001).

De modo semelhante à nomenclatura proposta para os polissacarídeos tipo ágar, Knutsen *et al.* (1994) sugeriram restringir o nome “carragenana” a polissacarídeos formados por resíduos alternados de (\rightarrow 4)- α -D-galactopiranosose e (\rightarrow 3)- β -D-galactopiranosose, enquanto o termo “carragenose”, seria utilizado quando o resíduo 4-*O*-ligado for 3,6-anidro- α -D-galactose (FIGURA 4) (LAHAYE, 2001; USOV, 1998; VAN DE VELDE *et al.*, 2002).

Os tipos mais comuns de carragenanas são tradicionalmente identificados por prefixos gregos. As três carragenanas mais importantes comercialmente são chamadas de iota (ι -), kappa (κ -) e lambda (λ -) carragenanas (FIGURA 5) e os seus nomes correspondentes baseados na nomenclatura IUPAC são carragenose 2,4'-dissulfato (G4S-DA2S), carragenose 4'-sulfato (G4S-DA) e carragenana 2,6,2'-trissulfato (G2S-D2S,6S) (PEREIRA *et al.*, 2009; VAN DE VELDE *et al.*, 2002; DE RUITER; RUDOLPH, 1997).

Além das três estruturas citadas, outras 12 estruturas dissacarídicas repetitivas de carragenanas foram encontradas em galactanas de algas e nomeadas por letras gregas (LAHAYE, 2001), tais como xi (G2S-D2S), theta (G2S-DA2S), beta (G-DA), mu (G4S-D6S) e nu (G4S-D2S,6S) (PEREIRA *et al.*, 2009). As duas últimas (mu e nu) são os precursores biológicos das carragenanas tipo kappa e iota, respectivamente, formados pela ação de uma enzima sulfidrolase ou pela exposição a condições alcalinas (VAN DE VELDE *et al.*, 2002), através da formação de ligação 3,6-anidrogalactose (FIGURA 5) (PEREIRA *et al.*, 2009).

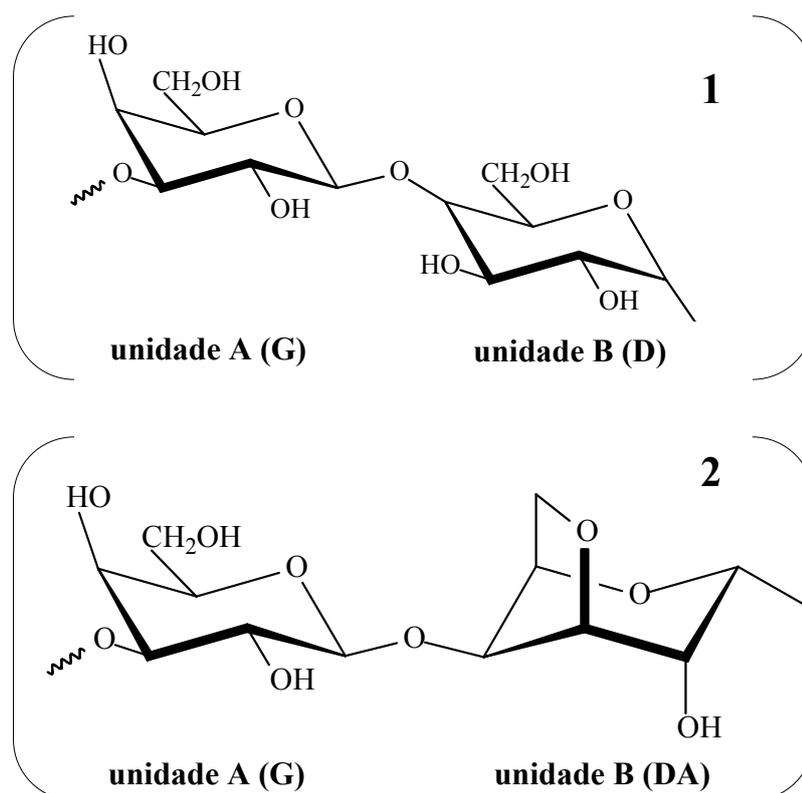


Figura 4. Estrutura química básica de carragenanas (1) e carragenoses (2). O primeiro polímero é formado por repetições de unidades de (1→3)-β-D-galactopiranosose (representado pela letra G) e (1→4)-α-D-galactopiranosose (representado pela letra D) enquanto o segundo polissacarídeo apresenta o mesmo resíduo representado pela letra “G” ligado a (1→4)- 3,6-anidro-α-D-galactose (representado pelas letras DA) como segundo resíduo.

Os diferentes tipos de carragenanas são obtidos de espécies distintas do grupo Rhodophyta. Kappa-carragenana é predominantemente obtida a partir da alga *Kappaphycus alvarezii* enquanto *Eucheuma denticulatum* é a principal espécie produtora de iota-carragenana (CAMPO *et al.*, 2009; VAN DE VELDE *et al.*, 2002; DE RUITER; RUDOLPH, 1997). Contudo, as carragenanas naturais geralmente produzem estruturas complexas híbridas, formadas por misturas de diferentes tipos de carragenanas, dependendo do ciclo de vida, estágio de desenvolvimento e condições ambientais (DE RUITER; RUDOLPH, 1997; VAN DE VELDE *et al.*, 2002). As espécies dos gêneros *Gigartina* e *Chondrus* apresentam ciclo de vida com alternância de gerações gametofítica haplóide e esporofítica diplóide, onde

a fase esporofítica produz lambda-carragenana enquanto a fase gametofítica produz uma carragenana híbrida do tipo kappa / iota (DE RUITER; RUDOLPH, 1997).

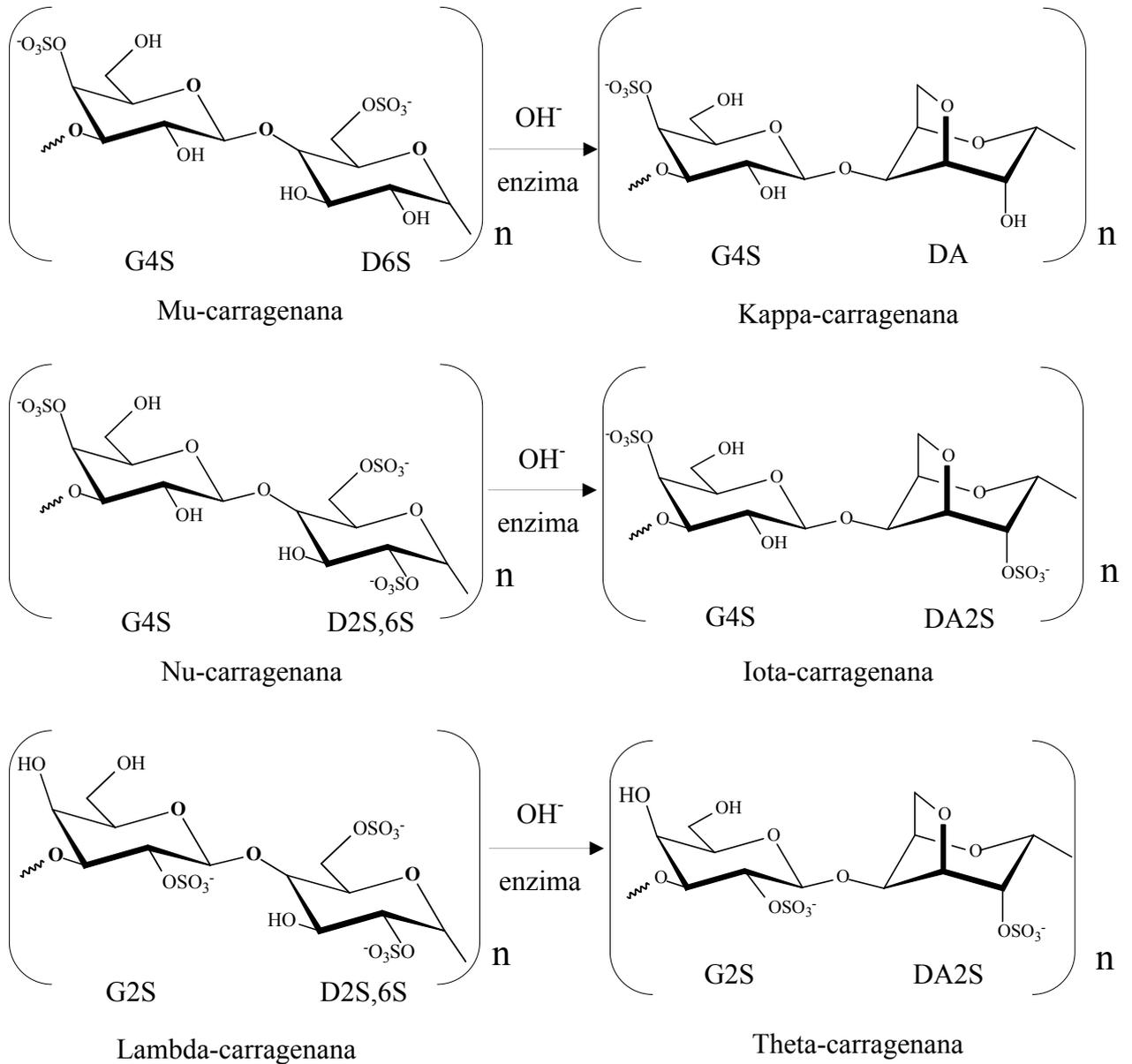


Figura 5. Representação esquemática de diferentes estruturas da unidade dimérica repetitiva das carragenanas comerciais e estruturas relacionadas. Adaptado de Campo *et al.* (2009) e Van De Velde *et al.* (2002).

1.5 Considerações gerais sobre o câncer

1.5.1 Incidência de câncer no Brasil e no mundo

Segundo recente relatório da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC)/OMS (*World Cancer Report 2008*), a incidência global de casos de câncer dobrou nos últimos 30 anos do século XXI e é estimado que esse número dobre novamente entre os anos 2000 e 2020 e quase triplique até 2030. Estimou-se que, no ano de 2008, ocorreriam cerca de 12 milhões de casos novos de câncer e 7 milhões de óbitos. Até pouco tempo, o câncer era considerado uma doença do mundo ocidental industrializado. Atualmente a situação tem mudado dramaticamente, com a maioria dos casos de câncer descobertos em países pobres ou em desenvolvimento (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008).

Ainda de acordo com a IARC/OMS, estimou que em 2008 ocorreriam 12,4 milhões de casos novos e 7,6 milhões de óbitos por câncer no mundo. Destes, os mais incidentes seriam o câncer de pulmão (1,52 milhões de casos novos), mama (1,29 milhões) e cólon e reto (1,15 milhões). Devido ao mau prognóstico, o câncer de pulmão foi estimado como a principal causa de morte (1,31 milhões óbitos), seguido pelo câncer de estômago (780 mil óbitos) e pelo câncer de fígado (699 mil óbitos). Para América do Sul, Central e Caribe, estimou-se em 2008 cerca de um milhão de casos novos de câncer e 589 mil óbitos. Em homens, o mais comum seria o câncer de próstata, seguido por pulmão, estômago e cólon e reto. Nas mulheres, o mais frequente seria o câncer de mama, seguido do colo do útero, cólon e reto, estômago e pulmão (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2010 serão válidas também para o ano de 2011, e apontam para a ocorrência de 489.270 casos novos de câncer, sendo 236.240 casos novos para o sexo masculino e 253.030 para o sexo feminino (TABELA 1). Estima-se que o câncer de pele do tipo não melanoma (114 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (52 mil), mama feminina (49 mil), cólon e reto (28 mil), pulmão (28 mil), estômago (21 mil) e colo do útero (18 mil) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

A importância do câncer na área de saúde pública vem aumentando à medida que ocorre o controle progressivo de outras doenças. Atualmente, mesmo após importantes

avanços no entendimento das neoplasias, o câncer representa a segunda principal causa de mortalidade por doença no mundo, sendo diagnosticados mais de 10 milhões de novos casos a cada ano (SCHOTTENFELD; BEEBE-DIMMER, 2005).

Tabela 2 – Estimativas para o ano 2010 de número de casos novos por câncer no Brasil em homens e mulheres, segundo localização primária.

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa de novos casos		
	Masculino	Feminino	Total
Próstata	52.350	-	52.350
Mama feminina	-	49.240	49.240
Traquéia, brônquio e pulmão	17.800	9.830	27.630
Cólon e reto	13.310	14.800	28.110
Estômago	13.820	7.680	21.500
Colo de útero	-	18.430	18.430
Cavidade oral	10.330	3.790	14.120
Esôfago	7.890	2.740	10.630
Leucemias	5.240	4.340	9.580
Pele melanoma	2.960	2.970	5.930
Outras localizações	59.130	192.590	375.420
Subtotal	182.830	192.590	375.420
Pele não melanoma	53.410	60.440	113.850
Todas as neoplasias	236.240	253.030	489.270

Fonte: Instituto Nacional de Câncer - INCA/MS (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

1.5.2 Características intrínsecas do câncer

O câncer é uma doença caracterizada pelo crescimento descontrolado e espalhamento anormal de células. Se o espalhamento não for controlado, pode resultar em morte. Essa patologia pode ser causada por fatores externos (tabaco, agentes químicos, radiação e organismos infecciosos) e fatores internos (mutações hereditárias, desbalanço hormonal,

defeitos no sistema imune e mutações decorrentes do metabolismo). Esses fatores podem agir juntos ou em sequência para iniciar a carcinogênese e o tratamento envolve desde procedimentos cirúrgicos até quimioterapia, radioterapia e terapia hormonal (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2008).

Todos os tipos de câncer envolvem mudanças dinâmicas no genoma celular que resultam em oncogenes capazes de gerar ganho de funções celulares e bloqueio de genes supressores de tumores, causando alterações no ciclo celular (BISHOP; WEINBERG, 1996; HANAHAN; WEINBERG, 2000; ZITVOGEL; TESNIERE; KROEMER, 2006). Cerca de 5% de todos os cânceres são fortemente hereditários, onde alterações genéticas hereditárias conferem elevado risco de desenvolver um ou mais tipos específicos de câncer. Contudo, a maioria dos cânceres resulta de mutações genéticas que ocorrem durante a vida do indivíduo (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2008).

Evidências indicam que a tumorigênese em seres humanos é um processo que ocorre em várias etapas, em função de alterações genéticas que levam à transformação de células normais em derivados altamente malignos (HANAHAN; WEINBERG, 2000; ZITVOGEL; TESNIERE; KROEMER, 2006).

Modelos transgênicos de tumorigênese em ratos demonstraram que a transformação de células normais em variantes malignas envolve múltiplas etapas limitantes (BERGERS; HANAHAN; COUSSENS, 1999). Informações obtidas da observação de cânceres humanos e modelos animais sugerem que o desenvolvimento de tumores ocorre mediante uma sucessão de mudanças genéticas, cada uma conferindo um tipo de vantagem para o crescimento celular, levando à progressiva conversão de células normais em células cancerosas (HANAHAN; WEINBERG, 2000; NOWELL, 1976).

Segundo Hanahan e Weinberg (2000) existem mais de 100 tipos diferentes de câncer, além de subtipos desses tumores dependendo do órgão acometido. Ainda de acordo com esses autores, as células cancerosas possuem defeitos nos circuitos regulatórios que governam a proliferação celular normal e a homeostase. Tais defeitos são causados por pelo menos sete alterações essenciais na fisiologia celular: auto-suficiência em fatores de crescimento; insensibilidade a fatores antiproliferativos; evasão da morte celular programada (apoptose); potencial replicativo ilimitado; neo-vascularização (angiogênese); invasão tecidual e metástase.

Posteriormente, outras duas características intrínsecas ao desenvolvimento de tumores foram sugeridas: a habilidade de células malignas em evadirem-se da supressão de tumores

promovida pelo sistema imune (DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004) e a inflamação (MANTOVANI, 2009; COLOTTA *et al.*, 2009), em virtude de várias doenças inflamatórias aumentarem o risco de câncer e um componente inflamatório ser observado no microambiente da maioria dos tecidos neoplásicos, inclusive daqueles não epidemiologicamente relacionados com inflamação (COLOTTA *et al.*, 2009). As principais características de cada alteração fisiológica são descritas a seguir (FIGURA 6).

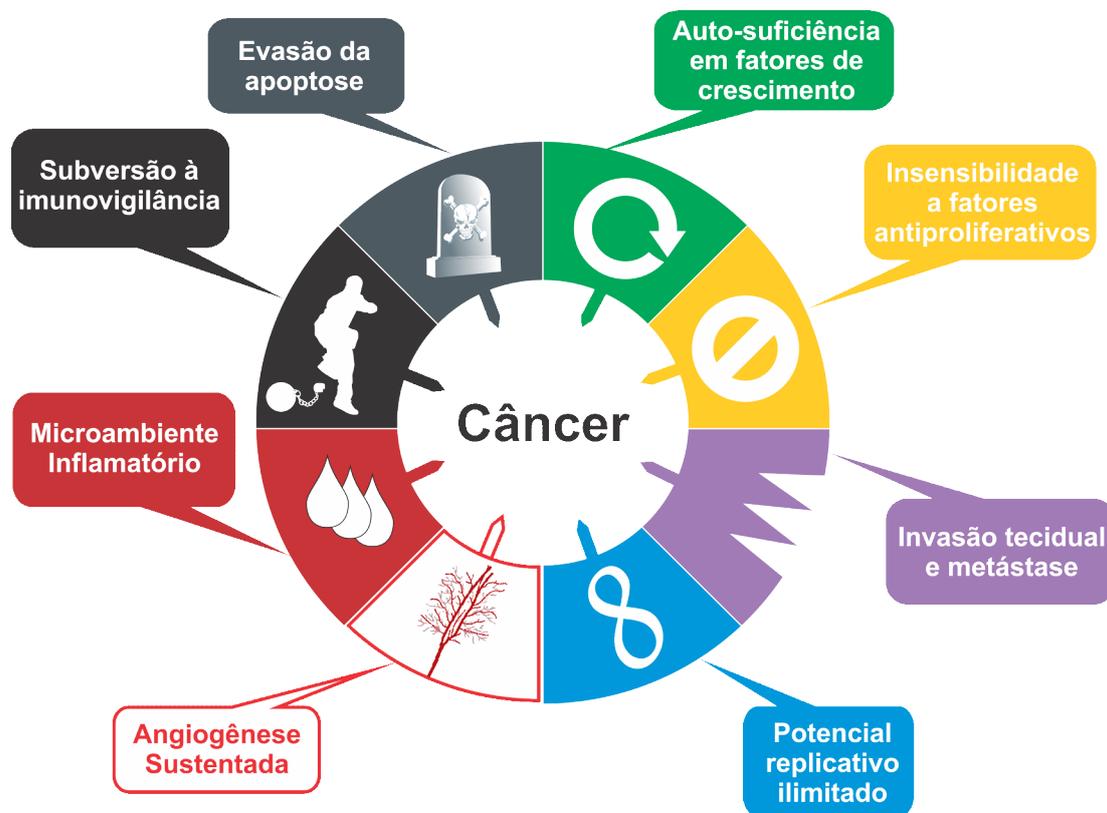


Figura 6 – Capacidades adquiridas por células neoplásicas, necessárias ao desenvolvimento de tumores malignos. Adaptado de Hanahan e Weinberg (2000); Dunn, Old e Schreiber (2004); Mantovani (2009); Colotta *et al.* (2009).

Auto-suficiência em fatores de crescimento. Células normais necessitam de sinais mitogênicos de crescimento para entrar no estado proliferativo. Na ausência de tais fatores nenhuma célula normal é capaz de sair do estado quiescente. Esse comportamento contrasta

fortemente com o exibido por células tumorais, as quais invariavelmente demonstram dependência bastante reduzida de estimuladores de crescimento exógenos (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Embora a maioria dos fatores mitogênicos de crescimento (do inglês *Growth factor*, GF) sejam produzidos por um tipo celular para estimular a proliferação de outra célula, processo conhecido como sinalização heterotípica, muitas células cancerosas adquirem a habilidade de sintetizar fatores de crescimento os quais a própria célula produtora responde, criando uma auto-sinalização por “*feed back*” positivo, denominado estimulação autócrina (ZITVOGEL; TESNIERE; KROEMER, 2006; HANAHAN; WEINBERG, 2000). A estimulação autócrina pode também subverter a resposta do sistema imune simultaneamente. As moléculas sinalizadoras, como as interleucinas IL-4 e IL-10, podem polarizar a resposta dos linfócitos T, convertendo-os para células T_H2 ao invés de T_H1, portanto inativando a imunidade contra tumores, frequentemente desencadeada por células T_H1 (ZITVOGEL; TESNIERE; KROEMER, 2006).

Insensibilidade a fatores antiproliferativos. Em tecidos normais, múltiplos sinais antiproliferativos atuam para manter as células quiescentes e a homeostase tecidual. Esses sinais são recebidos por receptores transmembranares de superfície acoplados a uma cascata de sinalização intracelular. Para haver desenvolvimento tumoral as células cancerosas devem evadir-se desses fatores antiproliferativos, geralmente pela desarticulação do circuito de sinalização interna, impedindo a produção desses sinais (ZITVOGEL; TESNIERE; KROEMER, 2006; HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Evasão da apoptose. A morte celular programada (apoptose) é uma das principais barreiras contra o desenvolvimento de tumores malignos. A adesão ou não à morte celular programada é estreitamente regulada. Sensores intracelulares monitoram o bem estar celular e ativam a via de morte em resposta à detecção de anormalidades, incluindo lesão no DNA, expressão de oncogenes, diminuição de nutrientes, insuficiência de fatores de sobrevivência e hipóxia (EVAN; LITTLEWOOD, 1998; WYLLIE; KERR; CURRIE, 1980; HANAHAN; WEINBERG, 2000; KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972). A resistência à apoptose pode ser atingida por células tumorais através de várias estratégias. Contudo, a mais comum é uma mutação no gene supressor de tumor p53, que impede a produção da proteína p53, resultando na remoção de um componente chave na indução da apoptose (EVAN; LITTLEWOOD, 1998).

Potencial replicativo ilimitado. O potencial replicativo ilimitado das células tumorais requer a manutenção das extremidades dos cromossomos, conhecidos como telômeros. O

progressivo encurtamento dos telômeros após sucessivos ciclos de replicação resulta na desproteção da extremidade cromossomal ocasionando desordem e fusão das extremidades de cromossomos distintos. As células tumorais desenvolvem a capacidade de replicação ilimitada devido à expressão em altos níveis da enzima telomerase, que adiciona repetições de um hexanucleotídeo na extremidade telomérica do DNA, impedindo o encurtamento do mesmo (SHAY; WRIGHT, 2000; RHYU, 1995; HANAHAN; WEINBERG, 2000; ZITVOGEL; TESNIERE; KROEMER, 2006; KELLAND, 2007).

Neo-vascularização (angiogênese). O suprimento de oxigênio e nutrientes fornecido pelo sistema vascular é fundamental para a sobrevivência celular. Por isso, praticamente todas as células corporais residem entre 100 e 200 µm de um vaso sanguíneo, distância limite para difusão do oxigênio. Para organismos multicelulares crescerem além desse tamanho é necessário recrutar novos vasos sanguíneos por vasculogênese e angiogênese. Esse processo é regulado pelo balanço entre moléculas pro e antiangiogênicas e é desencadeado por células cancerosas (CARMELIET; JAIN, 2000; HANAHAN; WEINBERG, 2000). A ativação da angiogênese pode ser desencadeada por vários fatores, incluindo estresse metabólico, como redução da pressão de oxigênio e hipoglicemia, estresse mecânico, como a pressão gerada por células proliferativas, resposta imune / inflamatória e mutações genéticas como ativação de oncogenes ou deleção de genes supressores de tumores (CARMELIET; JAIN, 2000; BOUCK; STELLMACH; HSU, 1996).

Invasão tecidual e metástase. O estabelecimento de células tumorais em locais distantes do tumor primário, chamado de metástase, é a causa de 90% das mortes por câncer (ZITVOGEL; TESNIERE; KROEMER, 2006; HANAHAN; WEINBERG, 2000). Para criar uma colônia metastática, uma célula ou grupo de células tumorais devem ser capazes de se dissociar do tumor primário, invadir a matriz extracelular circundante, entrar no espaço vascular ou linfático, escapar da imunovigilância, extravasar da circulação sanguínea ou linfática, penetrar no tecido alvo e proliferar como uma colônia secundária (STETLER-STEVENSON; AZNAVOORIAN; LIOTTA, 1993; LIOTTA; STETLER-STEVENSON, 1991). Várias classes de proteínas são alteradas em células tumorais capazes de invadir tecidos e causar metástases. Dentre estas, destacam-se as moléculas de adesão célula-célula (CAM), especialmente membros das famílias de imunoglobulinas e caderinas que são mediadoras de interações intercelulares, e integrinas, que ligam células a substratos na matriz extracelular (APLIN *et al.*, 1998). Também ocorre o aumento da expressão de proteases extracelulares e a expressão reduzida de genes inibidores de proteases (WERB, 1997).

Microambiente inflamatório tumoral. A inflamação envolve uma resposta bem coordenada do sistema immune inato e adquirido após infecção ou injúria tecidual por fatores exógenos ou endógenos. Qualquer distúrbio na homeostase tecidual ativa as células da imunidade inata, que são a primeira linha de defesa corporal (HUSSAIN; HARRIS, 2007). O microambiente tumoral é caracterizado pela infiltração de leucócitos como macrófagos (especialmente macrófagos associados a tumores chamados de TAM, do inglês “tumor-associated macrophages”), neutrófilos, células dendríticas, eosinófilos, mastócitos e linfócitos, presença de polipeptídeos mensageiros da inflamação, representados pelas citocinas, como o fator de necrose tumoral (TNF), interleucina (IL)-1, IL-6, interferons, quimiocinas como CCL2 e CXCL8, mediadores citotóxicos incluindo espécies reativas de oxigênio (ERO’s), proteases serínicas e cisteínicas e metaloproteinases (COUSSENS; WERB, 2002; COLOTTA *et al.*, 2009).

Qualquer falha no preciso controle dos componentes imunes pode levar à inflamação crônica, gerando um microambiente patológico que pode favorecer a iniciação e progressão do câncer. O microambiente inflamatório sustentado provém de um constante suprimento de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio, aldeídos reativos, citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento capazes de perturbar a homeostase celular, levando a um quadro de instabilidade genética e risco de desenvolvimento de células malignas (HUSSAIN; HARRIS, 2007; BALKWILL; MANTOVANI, 2001).

Dados recentes sugerem que um mecanismo adicional envolvido na inflamação relaciona ao câncer (CRI, do inglês “cancer-related inflammation”) é a indução de instabilidade genética por mediadores inflamatórios, levando ao acúmulo de alterações genéticas em células cancerosas (COLOTTA *et al.*, 2009).

Todas ou a maioria das capacidades intrínsecas ao desenvolvimento de tumores devem ser adquiridas direta ou indiretamente através de mudanças no genoma de células cancerosas. Contudo, mutações em genes específicos ao desenvolvimento de cada uma das novas habilidades das células tumorais parecem um processo pouco eficiente e difícil de acontecer devido ao sofisticado mecanismo de monitoramento e reparo do DNA celular, capaz de assegurar que qualquer mutação seja um evento raro (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

A maioria das alterações genéticas que contribuem para a transformação de células normais em malignas acontece em genes reguladores de crescimento e em genes envolvidos no controle do ciclo celular. Acredita-se que o mau funcionamento desses genes seja o responsável pela instabilidade genética observada em células malignas (HANAHAN;

WEINBERG, 2000; LENGAUER; KINZLER; VOGELSTEIN, 1998; RAPTIS; BAPAT, 2006).

A instabilidade genética pode se apresentar através de alterações no comprimento de pequenas sequências de DNA, resultando em instabilidade microssatélite (MIN, do inglês “microsatellite instability”), uma consequência da inativação de genes envolvidos em reparo de danos no DNA. Pode também resultar de grandes mudanças cromossômicas, como translocações ou ampliações, que levam a instabilidade cromossômica (CIN, do inglês chromosomal instability) ou alterações no comprimento dos telômeros e atividade da telomerase. Em adição, o silenciamento de genes através de hipermetilação de regiões promotoras ou aumento da expressão gênica através da hipometilação destas regiões também levam à instabilidade genética (RAPTIS; BAPAT, 2006; LENGAUER; KINZLER; VOGELSTEIN, 1998).

Vários genes supressores de tumores têm sido descobertos. O membro mais proeminente desses genes é a família de proteínas supressoras de tumores p53 que, em resposta a uma lesão no DNA, é capaz de elicitar a suspensão do ciclo celular, para evitar a replicação do DNA lesionado, permitir o seu reparo e restabelecer a integridade genômica, ou desencadear a apoptose se a lesão no DNA for muito extensa (GASSER; RAULET, 2006; EVAN; LITTLEWOOD, 1998).

1.5.3 O sistema imune

O sistema imune humano é composto por dois compartimentos distintos, a imunidade inata ou natural e a imunidade adquirida ou adaptativa (DE VISSER; EICHTEN; COUSSENS, 2006; BALKWILL; MANTOVANI, 2001; COUSSENS; WERB, 2002).

As células da imunidade inata, tais como células dendríticas (DC, do inglês “dendritic cells”) natural killer (NK), macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos e mastócitos são a primeira linha de defesa contra patógenos. DCs, macrófagos e mastócitos servem como sentinelas que residem nos tecidos e continuamente monitoram o seu microambiente por sinais de perigo. Quando a homeostase tissular é perturbada, macrófagos e mastócitos imediatamente liberam mediadores solúveis, tais como citocinas, quimiocinas, proteases remodeladoras da matriz extracelular, espécies reativas de oxigênio (ERO's) e espécies

reativas de nitrogênio, além de ativar mediadores como a histamina, capaz de induzir mobilização e infiltração adicional de leucócitos para o tecido afetado. Esse processo culmina com o desenvolvimento de um quadro inflamatório que leva à eliminação dos patógenos e reparo do tecido lesado (DE VISSER; EICHTEN; COUSSENS, 2006; HUSSAIN; HARRIS, 2007; COLOTTA *et al.*, 2009).

Os macrófagos e mastócitos podem também ativar respostas vasculares e fibroblásticas para promover a eliminação dos organismos invasores e iniciar o reparo tecidual. As células dendríticas são as principais células apresentadoras de antígenos (APC's, do inglês antigen-presenting cells). Essas células apanham antígenos exógenos e migram para os órgãos linfóides onde apresentam os antígenos para as células da imunidade adaptativa, atuando como componentes – chave na interface entre imunidade inata e imunidade adaptativa. As células NK também participam da comunicação entre as células da imunidade inata e a adaptativa, por sua capacidade de interagir bidireccionalmente com DC's. Certos subgrupos das células NK eliminam DC's imaturos enquanto outros promovem a maturação destas células (DE VISSER; EICHTEN; COUSSENS, 2006; HUSSAIN; HARRIS, 2007; BALKWILL; MANTOVANI, 2001; MEDZHITOV, R.; JANEWAY, 1997).

A característica única que define a imunidade inata é a habilidade em responder rapidamente a uma injúria tecidual, sem ataque prévio, memória ou especificidade antigênica. Os microrganismos são reconhecidos através de um limitado número de receptores de reconhecimento padrão de microrganismos (PRR, do inglês 'germline-encoded Pattern-Recognition Receptors'). Esses receptores reconhecem componentes microbianos conhecidos como padrões moleculares associados a patógenos (PAMP, do inglês Pathogen Associated Molecular Patterns), tais como LPS ou DNA CpG bacteriano e ativam diretamente as células imunes (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006; JANEWAY; MEDZHITOV, 2002).

A principal classe de PRR's é representada pela família de receptores 'Toll-like' (TLR, do inglês 'Toll-like receptors'). Os receptores 'toll-like' são expressos em várias células imunes como macrófagos, células dendríticas, alguns linfócitos B e T e até mesmo em células não imunes como fibroblastos e células epiteliais (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006; JANEWAY; MEDZHITOV, 2002).

A ativação aguda da imunidade inata desencadeia a ativação do mais sofisticado sistema imune adquirido. A indução eficiente da resposta imune adaptativa primária requer interações diretas com células apresentadoras de antígenos e um ambiente pró-inflamatório (DE VISSER; EICHTEN; COUSSENS, 2006).

Após reconhecimento de um PAMP por um TLR, as células apresentadoras de antígenos endocitam e processam os antígenos, induzem a expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês ‘major histocompatibility complex’) e migram do foco infeccioso para o linfonodo regional, onde ativam a resposta imune adquirida. Esse processo é conhecido como maturação de APC’s. Os peptídeos ligados ao MHC classe II são reconhecidos por linfócitos T CD4⁺, enquanto o MHC classe I é reconhecido por linfócitos T CD8⁺ citotóxicos. No linfonodo as APC’s MHC classe II ativadas apresentam os antígenos derivados de patógenos aos receptores dos linfócitos T (TCR, do inglês ‘T cell receptors’) das células T CD4⁺ *naïve* e expressam moléculas co-estimulatórias, tais como CD80 e CD86. Esse reconhecimento ativa os linfócitos T CD4⁺ *naïve* e direcionam a diferenciação destes em linfócitos T helper 1 (Th1) ou T helper 2 (FEARON; LOCKSLEY, 1996; AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006; JANEWAY; MEDZHITOV, 2002).

As células Th1, em resposta à estimulação por peptídeos expostos pelo MHC classe II das células apresentadoras de antígenos, produzem interferón- γ (IFN- γ), linfotóxina e TNF- α , capazes de ativar e potencializar a resposta dos macrófagos, promovendo a eliminação de infecções virais ou bacterianas, enquanto as células Th2 produzem as interleucinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 que coletivamente promovem o crescimento e ativação de mastócitos e eosinófilos envolvidos na resposta contra infecções por helmintos e inibem a ativação de macrófagos. Assim, a imunidade inata é um componente chave da resposta inflamatória e da resposta imune contra patógenos (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006; JANEWAY; MEDZHITOV, 2002; FEARON; LOCKSLEY, 1996).

As células da imunidade adaptativa, tais como linfócitos B, linfócitos T helper CD4⁺ e linfócitos T citotóxicos CD8⁺ (CTL’s, do inglês CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes) se distinguem dos leucócitos da imunidade inata pela expressão de receptores antígeno-específicos diversos somaticamente gerados, que são formados a partir de rearranjos genéticos randômicos e possibilitam um repertório de respostas mais amplo e flexível do que as células da imunidade natural (FEARON; LOCKSLEY, 1996; JANEWAY; MEDZHITOV, 2002; DE VISSER; EICHTEN; COUSSENS, 2006).

Como os linfócitos B e T atuam contra um antígeno único específico, a expansão clonal após o reconhecimento do antígeno exógeno é necessário para obter linfócitos T ou B antígeno-específicos em quantidade suficiente para combater uma infecção. Portanto, a resposta adaptativa é mais lenta que a inata. Contudo, durante a resposta primária um grupo

de linfócitos se diferencia em células de memória de vida longa, que resultam em maiores respostas após exposição subsequente ao mesmo antígeno (DE VISSER; EICHTEN; COUSSENS, 2006; AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006; JANEWAY; MEDZHITOV, 2002).

Juntos, a ativação aguda dessas duas vias distintas de resposta imunológica removem eficientemente patógenos, células e matrizes extracelular lesadas. Após eliminação destes agentes, as células imunes entram em vias de normalização de proliferação e morte celular para permitir o restabelecimento das condições normais do tecido injuriado e da homeostase tecidual, com finalização da inflamação (DE VISSER; EICHTEN; COUSSENS, 2006).

1.5.4 A resposta imune contra o câncer

O estabelecimento de células malignas envolve interações complexas entre o tumor em desenvolvimento e o sistema imune do hospedeiro. Várias moléculas e células efetoras das imunidades inata e adquirida participam do reconhecimento e destruição de células cancerosas, um processo chamado de imunovigilância. Porém, as células tumorais podem escapar da imunovigilância através do crescimento de variantes de células tumorais fracamente imunogênicas (imunoseleção) e através da supressão ativa da resposta imune (imunossupressão). De fato, para o desenvolvimento completo de uma neoplasia, a célula cancerosa tem que superar barreiras intrínsecas e extrínsecas de defesa do hospedeiro (FIGURA 7) (ZITVOGEL; TESNIERE; KROEMER, 2006; DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004; ZITVOGEL *et al.*, 2008).

Dunn; Old; Schreiber (2004) propuseram a substituição do termo imunovigilância por imunoedição, para enfatizar o duplo papel da imunidade em não apenas prevenir, mas também modelar a doença neoplásica. Esses autores sugeriram que o processo de imunoedição é composto por três fases: Eliminação, equilíbrio e escape.

A fase de eliminação representa o conceito original de imunovigilância. O início da resposta imune antitumoral ocorre quando as células do sistema imune inato são alertadas quanto à presença de um tumor. A remodelagem da matriz extracelular induzida pelo crescimento tumoral pode produzir moléculas pró-inflamatórias que, junto com quimiocinas

produzidas pelas células tumorais, recrutam células do sistema imune inato para o local de perigo (DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004).

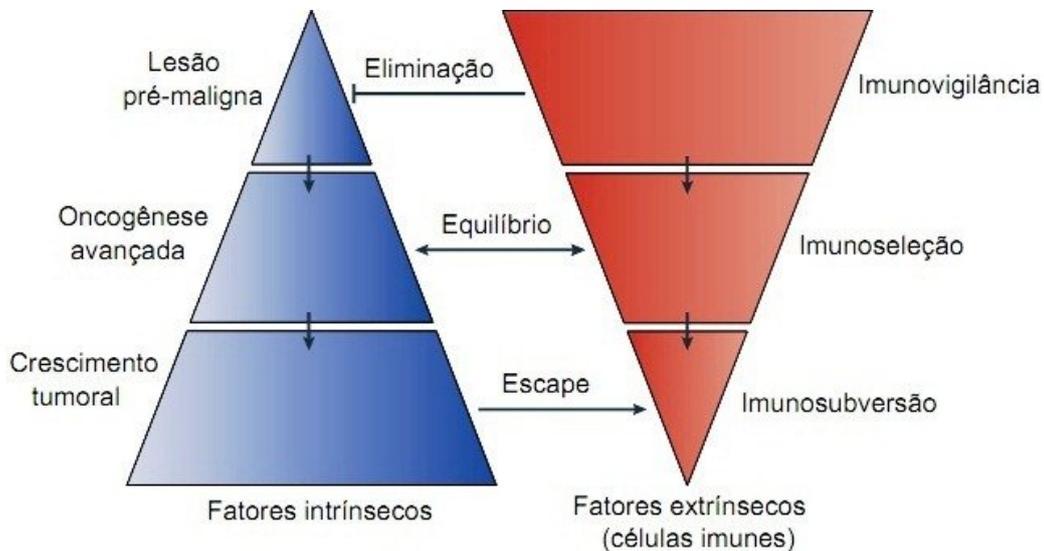


FIGURA 7 – Relação entre os aspectos intrínsecos (autônomos) e extrínsecos (células imunes) da progressão tumoral. Essa figura ilustra as várias etapas do desenvolvimento de tumores que resultam das inter-relações entre fatores intrínsecos (celulares) e extrínsecos (efetores mediados pelo sistema imune). Adaptado de Zitvogel, Tesniere e Kroemer (2006).

Uma vez recrutados para o local de crescimento tumoral, células natural killers T (NKT, células T caracterizadas pela produção de TCR semi-invariáveis e pela co-expressão de marcadores de células NK), células T $\gamma\delta$ (subgrupo de células T capaz de ligar-se a antígenos intactos sem a participação do MHC e que apresenta TCR formado por um heterodímero $\gamma\delta$, em oposição ao heterodímero $\alpha\beta$ das demais células T), células NK e/ou macrófagos podem reconhecer moléculas tais como os ligantes do receptor de células da imunidade inata NKG2D, que foi induzido nas células tumorais pela inflamação incipiente ou pelo próprio processo de transformação celular. Em adição, células T $\gamma\delta$ e células NKT podem reconhecer tumores em desenvolvimento via interação de receptores de células T (TCR) com ligantes de NKG2D ou complexos CD1-glicolipídeos expressos em células tumorais, respectivamente. Indiferentemente do mecanismo de reconhecimento, esses eventos

levam à produção de IFN- γ , evento crítico para a progressão da resposta antitumoral (DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004; ZITVOGEL; TESNIERE; KROEMER, 2006).

Posteriormente, os efeitos do reconhecimento do tumor pelo sistema imune inato são amplificados. O IFN- γ liberado no local do tumor induz a produção local de quimiocinas que recrutam mais células da imunidade inata para o tumor. Produtos gerados durante o remodelamento da matriz extracelular podem induzir os macrófagos tumor-infiltrantes a produzir pequenas quantidades de IL-12, que estimula células NK tumor-infiltrantes a produzir pequenas quantidades de IFN- γ , que novamente ativam macrófagos no tumor a produzir mais IL-12, levando ao aumento da produção de IFN- γ pelas células NK (DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004).

Em adição a essa retroalimentação positiva, a ligação de receptores ativadores de células NK aos seus ligantes cognatos nas células tumorais estimulam ainda mais a produção de IFN- γ por essas células (BANCROFT; SCHREIBER; UNANUE, 1991). A produção de IFN- γ em níveis elevados ativa vários processos dependentes de IFN- γ , incluindo efeitos antiproliferativos, pró-apoptóticos e angiostáticos, que resultam na morte de acentuado número de células tumorais. Concordantemente, macrófagos ativados por IFN- γ que expressam produtos tumoricidas como espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e células NK podem matar tumores via TRAIL (ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral, do inglês *tumour-necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*) ou via mecanismo dependente de perforina (componente de grânulos citolíticos que altera a permeabilidade da membrana plasmática). Como resultado desse processo, uma fonte de antígenos de células tumorais mortas é liberada, direcionando o desenvolvimento da resposta imune adaptativa tumor-específica (DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004; TAKEDA *et al.*, 2001; ZITVOGEL; TESNIERE; KROEMER, 2006).

Contudo, devido à enorme plasticidade e capacidade de produzir grande quantidade de citocinas, quimiocinas, metaloproteinases, espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, histamina e outros mediadores bioativos, as células da imunidade inata, quando cronicamente ativadas, são moduladores-chave da sobrevivência celular (proliferação e morte celular) assim como reguladores do metabolismo da matriz extracelular. Portanto, vários processos fisiológicos necessários ao desenvolvimento tumoral, tais como aumento de sobrevivência celular, remodelagem tecidual, angiogênese e supressão da imunidade adaptativa são regulados por leucócitos infiltrados em ambientes neoplásicos (DE VISSER; EICHTEN; COUSSENS, 2006).

As células dendríticas imaturas (DCs) que foram recrutadas para o local do tumor tornam-se ativas pela exposição às citocinas pró-inflamatórias ou por interação com células NK tumor-infiltrantes (GEROSA *et al.*, 2002). As DCs maduras contendo o antígeno migram para o linfonodo, onde induzem a ativação de células T CD4⁺ Th1 *naïve* tumor-específicas. As células Th1 facilitam o desenvolvimento de linfócitos T citotóxicos CD8⁺ induzidos via apresentação cruzada de peptídeos antigênicos tumorais em moléculas MHC classe I presentes nas DCs (HUANG *et al.*, 1994; ALBERT; SAUTER; BHARDWAJ, 1998; DE VISSER; EICHTEN; COUSSENS, 2006).

Posteriormente, as células T CD4⁺ e CD8⁺ tumor-específicas migram para o local do tumor, onde participam da eliminação de células tumorais antígeno-positivas. As células T CD4⁺ produzem IL-2 que, juntamente com a produção de IL-15 pelas células do hospedeiro, auxiliam a manter o funcionamento e viabilidade das células T CD8⁺ tumor-específicas, que levarão à morte celular tumoral por mecanismos diretos e indiretos. A resposta imune adaptativa proporciona ao hospedeiro a capacidade de eliminar completamente tumor em desenvolvimento. Por isso é notável o desenvolvimento de câncer em populações mais velhas, onde o sistema imune e conseqüentemente a imunovigilância começa a declinar (DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004; TAKEDA *et al.*, 2001; ZITVOGEL; TESNIERE; KROEMER, 2006).

Em muitos casos, o ataque promovido pelo sistema imune é suficiente para conter, mas não para extinguir completamente as células tumorais. A pressão seletiva do sistema imune sobre células tumorais mutantes e geneticamente instáveis pode levar ao surgimento de variantes tumorais com diferentes mutações que proporcionam um aumento de resistência aos ataques do sistema imune. O resultado desse processo é uma nova população de clones tumorais com reduzida imunogenicidade, criada pela força esculpadora do sistema imune. Essa fase de equilíbrio dinâmico pode ocorrer durante muitos anos. Contudo, variantes das células tumorais selecionadas na fase de equilíbrio podem crescer em um ambiente imunologicamente intacto. Essa brecha da defesa imune do hospedeiro ocorre provavelmente quando mudanças genéticas e epigenéticas nas células tumorais conferem resistência à imunodeteção e/ou imunoeliminação, evitando o ataque de um ou ambos os mecanismos de imunidade do hospedeiro (DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004; TAKEDA *et al.*, 2001; ZITVOGEL; TESNIERE; KROEMER, 2006).

Células tumorais individuais devem desenvolver múltiplas estratégias imunoevasivas para iludir a poderosa resposta antitumoral integrada da imunidade inata e adquirida antes do

fenótipo imunogênico final ser estabelecido. Com esse objetivo, os tumores podem impedir o desenvolvimento da resposta imune antitumoral pela liberação de citocinas imunossupressivas, como TGF- β e IL-10, ou via mecanismos envolvendo células T com atividade imunossupressora, como as células T reguladoras (Treg, células T reguladoras CD4⁺CD25⁺) (SAKAGUCHI *et al.*, 2001; KHONG; RESTIFO, 2001).

Um subgrupo de células do sistema imune inato (por exemplo, células mielóides supressoras GR⁺ CD11b⁺) podem se acumular em órgãos linfóides e induzir a disfunção de linfócitos T por contato célula-célula ou por produção de mediadores imunossupressivos. Dessa forma, essas células inibem a resposta imune adaptativa. Em adição, lesões malignas atraem células T regulatórias, conhecidas por seu efeito supressor de células T citotóxicas efetoras contra tumores (ZOU, 2005; DE VISSER; EICHTEN; COUSSENS, 2006).

Muitos tumores induzem a produção de citocinas relacionadas com o escape da imunovigilância. Células T recrutadas para o ambiente tumoral produzem IL-4 e IL-5 e não produzem IFN γ . IL-4 e IL-5 são associadas com a resposta mediada por células T helper tipo 2, enquanto o interferon está associado com a resposta Th1. As respostas Th2 polarizadas são geralmente ineficientes contra tumores e vírus (BALKWILL; MANTOVANI, 2001; MIZOGUCHI *et al.*, 1992). Essa estratégia contribui a auxiliar o tumor a subverter o sistema imune pelo estabelecimento de células imunes e citocinas que suprimem qualquer resposta anticâncer específica (BALKWILL; MANTOVANI, 2001).

A imunossupressão pode resultar de alterações que afetem o reconhecimento tumoral por células efetoras do sistema imune, como perda de expressão de antígenos, perda de componentes do MHC, mudança nos ligantes de NKG2D e desenvolvimento de insensibilidade ao IFN- γ , ou prover os tumores com mecanismos de escape da destruição pelo sistema imune, como defeitos na via de sinalização de receptores de morte ou expressão de sinais antiapoptóticos, tais como aqueles induzidos constitutivamente por STAT3 (transdutor de sinal e ativador de transcrição 3, do inglês *signal transducer and activator of transcription 3*) (DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004; MARINCOLA *et al.*, 2000; GROH *et al.*, 2002).

Uma célula tumoral pode permanecer na fase de equilíbrio durante décadas, podendo restabelecer o crescimento tumoral em função da rede de mediadores presentes no microambiente tumoral. Portanto, o sucesso permanente dos tratamentos contra o câncer pode depender do uso de quimioterápicos imunogênicos, capazes de restabelecer a resposta imune antitumoral (ZITVOGEL; TESNIERE; KROEMER, 2006).

Tumores primários são frequentemente tratados pela combinação de terapias, na maioria dos casos incluindo cirurgia, radioterapia local e quimioterapia. Mesmo quando o tumor foi aparentemente derrotado, micrometástases de células tumorais dormentes (células tronco tumorais) frequentemente levam à reincidência do tumor e fracasso do tratamento. Para vencer a luta contra o câncer é necessário não apenas desenvolver estratégias eficientes para matar as células tumorais pelo uso de agentes quimioterapêuticos, mas também tentar estimular uma resposta imune do hospedeiro para manter as possíveis células tumorais residuais sob controle (ZITVOGEL *et al.*, 2008).

Muito procedimentos terapêuticos usados em oncologia atualmente podem diminuir a resposta imune contra tumores. Muitas drogas quimioterápicas possuem notável efeito colateral imunossupressivo tanto diretamente, pela morte ou inativação das células efectoras assassinas de tumores, quanto indiretamente, pela anergia ou paralisia do sistema imune (ZITVOGEL *et al.*, 2008).

O efeito imunossupressor de algumas drogas antitumorais é tão acentuado que alguns quimioterápicos usados em oncologia são também utilizados como imunossupressores para o tratamento de doenças autoimunes severas, como é o caso da ciclofosfamida (WEINER; COHEN, 2002) e metotrexato (GENESTIER *et al.*, 1998), os quais enfraquecem as funções efectoras e proliferativas das células T periféricas por promoção de apoptose e deleção clonal.

A instabilidade genética das células tumorais, juntamente com a pressão seletiva do sistema imune sobre as células neoplásicas, leva ao surgimento de populações heterogêneas de células tumorais com diferenças na responsividade às drogas quimioterápicas, sejam elas citotóxicas ou imunoterapêuticas (DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004; TAKEDA *et al.*, 2001; ZITVOGEL; TESNIERE; KROEMER, 2006). Em virtude da heterogeneidade das células tumorais, têm sido discutidas estratégias diversificadas para aperfeiçoar o combate ao câncer, dentre as quais se destaca a administração combinada de drogas citotóxicas e substâncias imunomoduladoras (ARLEN *et al.*, 2007).

Estudos clínicos em pacientes que receberam tratamento de vacina à base de células dendríticas, tratadas previamente com antígenos específico, anterior à administração dos quimioterápicos paclitaxel ou carboplatina mostraram melhores resultados na redução do tumor, quando comparados ao tratamento isolado com os quimioterápicos, além de aumentar a sobrevida dos pacientes, indicando efeito antitumoral sinérgico da vacinação com o composto citotóxico (ANTONIA *et al.*, 2006). Em adição, os mecanismos de tolerância induzida por tumor, incluindo as células supressoras (células T reguladoras, células

supressoras mielóides e DC's tolerogênicas) ou seus mecanismos efetores (com TGF- β ou IL-10) podem ser superados pelo uso de terapias específicas que podem incluir anticorpos, antagonistas de citocinas ou moléculas com propriedades imunoestimulatórias (ZITVOGEL *et al.*, 2008).

Vários fatores podem ser utilizados para aprimorar os resultados das terapias anticâncer convencionais, dentre eles a indução da morte celular tumoral por drogas citotóxicas ou radiação, a produção de anticorpos monoclonais e outros imunomoduladores que ativam e maturam as células dendríticas e co-estimulam células T e outros linfócitos, além da inibição de moléculas derivadas de tumores capazes de desencadear anergia do sistema imune. Em adição, a terapia com imunoadjuvantes pode potencializar e sustentar a resposta imune antitumoral subsequente, evitando a reincidência do tumor neoplásico (HAYNES *et al.*, 2008; ZITVOGEL *et al.*, 2008).

1.5.5 Propriedades farmacológicas de polissacarídeos

Os polissacarídeos representam uma classe diversa de macromoléculas de ocorrência amplamente dispersa na natureza. Diferentemente de proteínas e ácidos nucleicos, esses compostos contêm estruturas repetitivas, formadas pela união de monossacarídeos. Entre essas macromoléculas, os polissacarídeos oferecem a maior capacidade em carregar informações biológicas, pois possuem o maior potencial para variabilidade estrutural (OOI; LIU, 2000).

Várias propriedades terapêuticas foram encontradas em polissacarídeos, incluindo atividade antiviral (JUNG *et al.*, 2004; NISHINO *et al.*, 1994; SASAKI *et al.*, 2001), antibacteriana (LI, *et al.*, 2004), antifúngica (SAKURAI *et al.*, 1995), antiparasitária (HRCKOVA; VELEBNY, 2001) e antitumoral (HAYASHI *et al.*, 2000; NISHINO *et al.*, 1994; OHNISHI, *et al.*, 1994; YALIN *et al.*, 2005). Nas últimas décadas as atividades biológicas de polissacarídeos tem atraído cada vez mais atenção de pesquisadores na área biomédica. Entre as mais promissoras atividades biofarmacológicas dos polissacarídeos estão os seus efeitos imunomodulatório e antitumoral (OOI; LIU, 2000).

Compostos capazes de interagir com o sistema imune e hiper-regular ou hiporregular aspectos específicos da resposta imune do hospedeiro são classificados como imunomoduladores ou modificadores da resposta biológica (BRM, do inglês “Biological

Response Modifiers”). Várias moléculas têm sido caracterizadas como potentes imunomoduladoras, como peptídeos (citocinas e quimiocinas), lipopolissacarídeos, glicoproteínas e derivados lipídicos. Contudo, certos polissacarídeos têm demonstrado potente atividade modificadora da resposta biológica (TZIANABOS, 2000).

Apesar de o mecanismo de ação dos polissacarídeos não ter sido completamente elucidado, provavelmente um dos primeiros mecanismos envolve a estimulação não específica do sistema imune do hospedeiro (TZIANABOS, 2000; SCHEPETKIN; QUINN, 2006).

Polissacarídeos modificadores da resposta biológica são reconhecidos por proteínas receptoras de reconhecimento padrão (PRR's) e proteínas plasmáticas. O reconhecimento de ligantes por um PRR aciona eventos de sinalização mediados pelo fator de transcrição NF- κ B, levando à indução de genes da imunidade inata (LEUNG *et al.*, 2006). Os receptores Toll-like (TLR) e os receptores scavenger (SR) são dois grupos diferentes de PRRs que reconhecem os polissacarídeos BRMs (MEANS; GOLENBOCK; FENTON, 2000). Além desses, os polissacarídeos imunomoduladores podem se ligar aos receptores β -glucanos, receptores de manose e receptores de complemento tipo 3 (CR3) (CZOP; KAY, 1991; TAYLOR; GORDON; MARTINEZ-POMARES, 2005; ROSS; VETVICKA, 1993) e a proteínas plasmáticas do complemento (FUJITA; MATSUSHITA; ENDO, 2004).

A resposta biológica induzida por polissacarídeos imunomoduladores é determinada pelo padrão de expressão e pelos eventos celulares e moleculares desencadeados pelos seus receptores e proteínas ligantes. Os TLR's são expressos em células mielóides (monócitos, macrófagos e células dendríticas), células epiteliais, mastócitos e neutrófilos (IWASAKI; MEDZHITOV, 2004). Dez TLRs foram identificados em humanos, dentre os quais TLR-2 e TLR-4 demonstraram capacidade de reconhecer polissacarídeos BRM's (LI *et al.*, 2004; BROWN *et al.*, 2003).

SRs são expressos em macrófagos, células dendríticas, células endoteliais e células da musculatura lisa (PEISER; MUKHOPADHYAY; GORDON, 2002) e reconhecem polissacarídeos sulfatados, como fucoidanas sulfatadas de algas marinhas (KIM; ORDIJA; FREEMAN, 2003). Os receptores β -glucanos são amplamente expressos em monócitos, macrófagos, DCs, neutrófilos, eosinófilos e linfócitos T e B (WILLMENT, 2005). Receptores de manose são expressos em macrófagos, DCs, células endoteliais hepáticas, renais, células da musculatura lisa da traquéia e células epiteliais retinóicas (SHEPHERD; TARNOWSKI; MCLAUGHLIN, 1991; LEW *et al.*, 1994; LINEHAN *et al.*, 1999). Os receptores CR3 são

principalmente expressos em macrófagos e neutrófilos, além de pequenos subtipos de células B, T e NK (ROSS; VETVICKA, 1993).

As células mielóides são o principal alvo estimulatório dos polissacarídeos imunomoduladores, possivelmente devido à participação de macrófagos, DCs e monócitos tanto na imunidade inata quanto na adquirida (LEUNG *et al.*, 2006). Os efeitos estimulatórios dos polissacarídeos imunomodulatórios sobre macrófagos incluem aumento da fagocitose (ZHANG *et al.*, 1997; SHIN *et al.*, 2002), produção de espécies reativas de oxigênio e secreção de citocinas (KODAMA; MURATA; NANBA, 2004). Dessa forma, os polissacarídeos modificadores da resposta biológica potencializam a função efetora de macrófagos, a capacidade de processar antígenos e de modular a imunidade adquirida através da secreção de citocinas (LEUNG *et al.*, 2006). A ativação de macrófagos parece ser o principal evento envolvido na atividade imunomoduladora de polissacarídeos. Contudo, a ativação direta de outras células imunes como células NK (LIM *et al.*, 2004) e linfócitos (CHUN *et al.*, 2001) também pode acontecer como evento secundário.

Além de melhorar a resposta imune do hospedeiro, os polissacarídeos BRMs são inibidores de apoptose (HWANG *et al.*, 2005), ativadores das vias clássica e alternativa do complemento do sistema imune (GLOVSKY *et al.*, 1983) e são frequentemente fortes mitogênicos para macrófagos, células T, B e células NK, que proliferam em resposta à estimulação por esses polímeros (GARCIA-LORA *et al.*, 2003; HAN *et al.*, 2003).

A busca por polissacarídeos como agentes antitumorais intensificou-se nas últimas décadas devido à descoberta de suas propriedades terapêuticas e sua baixa toxicidade, diferentemente dos efeitos adversos causados pela quimioterapia e radioterapia (TZIANABOS, 2000; PAULSEN, 2001; SCHEPETKIN; QUINN, 2006). Muitas drogas potencialmente antitumorais apresentam consideráveis efeitos colaterais. A toxicidade dessas substâncias contra células normais limitam o seu uso clínico. Assim, a descoberta de novas drogas ativas contra tumores com baixa toxicidade associada para células não tumorais e poucos efeitos colaterais se tornou um importante alvo da ciência biomédica (OOI; LIU, 2000). Nesse contexto, os polissacarídeos são fortes candidatos a fármacos com ação imunomodulatória e antitumoral (SCHEPETKIN; QUINN, 2006).

Estudos mostraram que o estabelecimento e desenvolvimento de tumores estão relacionados com o estado imune do hospedeiro. A função imune decresce progressivamente com o crescimento do tumor, ocasionando imunodeficiência associada em hospedeiro com tumores em estágio final (HADDEN, 2003). Portanto, o aumento ou potencialização do

mecanismo de defesa do hospedeiro emerge como um possível meio de inibição de crescimento tumoral sem toxicidade associada (OOI; LIU, 2000; BEUTLER, 2004).

1.5.5.1 Propriedades farmacológicas de polissacarídeos de algas marinhas

As algas marinhas têm sido consideradas fontes de importantes substâncias ativas de interesse biomédico com grande potencial como drogas anti-inflamatórias, antibacterianas, antivirais e antitumorais (YE et al., 2008; BLUNDEN, 1993; SMIT, 2004).

Alguns polissacarídeos sulfatados de algas vermelhas apresentam atividade antiviral contra vírus responsáveis por doenças infecciosas humanas. A galactana sulfatada isolada da alga *Aghardhiella tenera* (WITVROUW et al., 1994) e a xilomanana sulfatada da alga *Nothogenia fastigiata* (DAMONTE et al., 1994; KOLENDER et al., 1995) mostraram potente atividade antiviral contra o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), vírus do Herpes simplex (HSV) tipos 1 e 2 e vírus sincicial respiratório (RSV). Além do elevado potencial antitumoral esses polissacarídeos apresentam baixíssima toxicidade contra células de mamíferos. A baixa toxicidade é uma característica presente na maioria dos polissacarídeos de algas marinhas (DE CLERCQ, 1996), tornando-os candidatos ao desenvolvimento de formulações utilizadas terapêuticamente.

As carragenanas isoladas da espécie *Gigartina skottsbergii* (CARLUCCI et al., 1999; MANDAL et al., 2008) e *Stenogramme interrupta* (CÁCERES et al., 2000) apresentaram potente efeito antiviral contra diferentes cepas de HSV tipos 1 e 2 durante o estágio de adsorção. Uma lambda-carragenana isolada ainda da espécie *Gigartina skottsbergii* apresentou importante efeito protetor contra infecção genital pelo Vírus Herpes Simplex em dose letal (CARLUCCI et al., 2004). Um microbicida vaginal baseado em carragenana é capaz de bloquear o HIV e outras doenças *in vitro* e está em fase avançada de testes clínicos para uso terapêutico na prevenção de doenças (SPIELER, 2002). Vários outros polissacarídeos de algas marinhas também apresentaram atividade antiviral contra HIV (SUGAWARA et al., 1989; NAKASHIMA et al., 1987), HSV (MALHOTRA et al., 2003; MAZUMDER et al., 2002; FELDMAN et al., 1999; MAJCZAK et al., 2003; PONCE et al., 2003).

Formulações de heparina são amplamente utilizadas para o tratamento e prevenção de trombose venosa e arterial devido aos seus efeitos anticoagulante e antitrombótico (FAREED *et al.*, 2000). Contudo, esses glicosaminoglicanos apresentam várias limitações devido aos seus efeitos colaterais e limitada fonte de material (MOURÃO, 2004). Tais limitações levaram à busca de novas substâncias com potencial anticoagulante e antitrombótico, sendo as fucanas sulfatadas de algas pardas (COSTA *et al.*, 2010; CUMASHI *et al.*, 2007; BERTEAU; MULLOY, 2003; CHURCH *et al.*, 1989; COLLIEC *et al.*, 1991; MATOU *et al.*, 2002) e as galactanas sulfatadas de algas vermelhas (PEREIRA *et al.* 2005) e algas verdes (COSTA *et al.*, 2010; MATSUBARA *et al.*, 2001) moléculas promissoras possuidoras dessas atividades.

Vários polissacarídeos de macroalgas marinhas apresentam atividade citotóxica. As fucoïdanas (heterofuconas) são conhecidas por apresentarem atividade antitumoral, antimetastática e fibrinolítica em camundongos (COOMBE *et al.*, 1987; MARUYAMA; NAKAJIMA; YAMOTO, 1987), além de reduzir a proliferação celular (RELIGA *et al.*, 2000).

A fucoïdana isolada da alga parda *Cladosiphon okamuranus tokida* suprimiu a proliferação celular de 13 das 15 linhagens de células tumorais testadas, obtendo a maior ação antiproliferativa contra carcinoma hepatocelular, colangiocarcinoma e carcinoma de vesícula biliar (FUKAHORI, *et al.*, 2008). O alginato extraído de *Sargassum vulgare* foi capaz de inibir o crescimento do tumor Sarcoma 180 *in vivo* (SOUSA *et al.*, 2007). Os polissacarídeos extraídos da alga *Sargassum pallidum* apresentaram elevada atividade antitumoral contra as linhagens de células tumorais HepG2, A549 e MGC-803 (YE *et al.*, 2008), enquanto as fucanas isoladas da alga *Sargassum thunbergii* apresentaram atividade antitumoral e antimetastática (ITOH *et al.*, 1995).

A carragenana de baixo peso molecular obtida da alga vermelha *Solieria chordalis* apresentou notável propriedade imunoestimulante, aumentando a fagocitose por neutrófilos, a citotoxicidade por células “*natural killers*”, citotoxicidade celular dependente de anticorpo e estimulação da proliferação de linfócitos, sugerindo sua utilização em tratamento imunoterápico e anticâncer (STEPHANIE *et al.*, 2010).

A carragenana de baixo peso molecular isolada de *Chondrus ocellatus* mostrou moderada inibição de crescimento do tumor sólido Sarcoma 180 *in vivo*. Quando administrado conjuntamente com o 5-fluorouracil (5-FU), droga utilizada na quimioterapia, foi capaz de aumentar o efeito antitumoral do 5-FU, melhorando a imunocompetência dos

animais, comprometida pelo quimioterápico (ZHOU *et al.*, 2004). Em adição, um polissacarídeo obtido da alga vermelha *Gracilaria verrucosa* apresentou atividade imunostimulatória de macrófagos (YOSHIZAWA *et al.*, 1996), enquanto o polissacarídeo sulfatado extraído da alga marinha vermelha *Champia feldmannii* mostrou atividade antitumoral *in vivo* contra camundongos implantados com tumor Sarcoma 180. Esse composto foi capaz ainda de potencializar a ação antitumoral da droga 5-fluorouracil (5-FU), além de prevenir a leucopenia desencadeada pelo 5-FU e aumentar a produção específica de anticorpos (LINS *et al.*, 2009).

Embora o mecanismo de ação das atividades antitumoral e imunomodulatória dos polissacarídeos não estejam completamente esclarecidos, tais propriedades são atribuídas à ativação inespecífica do sistema imune do hospedeiro, com modulação do sistema complemento e estimulação de macrófagos (WANG *et al.*, 1997; CHIHARA, 1992).

1.5.5.2 Propriedades farmacológicas de polissacarídeos do gênero *Gracilaria*

O gênero *Gracilaria* compreende macroalgas marinhas vermelhas amplamente distribuídas em todos os continentes e suas espécies são algumas das algas mais utilizadas para fins comerciais em todo o mundo. A exploração desses indivíduos deve-se principalmente à produção do polissacarídeo ágar, de elevado valor comercial, associado à rápida taxa de crescimento, facilidade de reprodução vegetativa e outros atributos facilitadores de seu cultivo (KAIN; DESTOMBE, 1995).

Além de suas propriedades gelificantes e espessantes, as galactanas sulfatadas tipo ágar têm sido consideradas importantes fontes de atividades biológicas, como a atividade antiviral do polissacarídeo sulfatado tipo ágar extraído da alga *Gracilaria corticata* (MAZUMDER *et al.*, 2002), a atividade estimuladora de macrófagos do polissacarídeo sulfatado da alga *Gracilaria verrucosa* (YOSHIZAWA *et al.*, 1996) e a atividade antitumoral do polissacarídeo tipo ágar de *Gracilaria domingensis* (FERNANDEZ *et al.*, 1989).

Apesar de haver poucos estudos relacionados à atividade citotóxica e antitumoral dos polissacarídeos sulfatados de algas do gênero *Gracilaria*, a avaliação de suas propriedades antitumorais é extremamente válida, devido principalmente, aos efeitos observados por outros polissacarídeos sulfatados de algas marinhas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Elucidar a estrutura química dos polissacarídeos hidrossolúveis extraídos da alga marinha vermelha *Gracilaria caudata* J. Agardh e investigar suas propriedades antitumorais em modelos *in vitro* e *in vivo* de células tumorais.

2.2 Objetivos Específicos

- Estimar a massa molar dos polissacarídeos extraídos de *G. caudata* (PGC) através de Cromatografia de Permeação em Gel (GPC);
- Determinar a estrutura química fina dos polissacarídeos por Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FT-IR) e por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de próton (^1H) e carbono (^{13}C);
- Determinar o potencial citotóxico *in vitro* de PGC contra as linhagens de células tumorais HL-60, MDA-MB-435, SF-295, e HCT-8 pelo ensaio MTT;
- Avaliar o potencial antitumoral *in vivo* de PGC em camundongos transplantados com tumor Sarcoma 180;
- Avaliar a toxicidade dos polissacarídeos sobre alguns órgãos de camundongos como baço, fígado, rim e coração através de exame histopatológico, hematológico e bioquímico dos animais transplantados com tumor Sarcoma 180.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Alga marinha – Coleta e processamento

A alga marinha vermelha *Gracilaria caudata* J. Agardh (FIGURA 8) foi coletada junto ao substrato arenoso na região de mesolitoral, durante maré de sizígia, na praia do Pacheco, município de Caucaia – CE. Após a coleta, os exemplares da alga foram transportados em recipiente térmico a 4°C para o Laboratório de Algas Marinhas I do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, onde foram retirados sal e epifitas, e os exemplares coletados foram estocados a – 20 °C para posterior utilização.



Classificação:

Divisão – Rhodophyta

Ordem – Gracilariales

Família – Gracilariaceae

Gênero – *Gracilaria*

Espécie – *Gracilaria caudata*

Figura 8 – Fotografia da alga marinha vermelha *Gracilaria caudata*.

3.2 Extração e isolamento dos Polissacarídeos da alga *Gracilaria caudata*

A alga marinha *G. caudata* úmida foi incubada em estufa a 50°C para secagem e descoloração, seguido de maceração utilizando grau e pistilo com auxílio de nitrogênio líquido. Após ter sido triturada, uma amostra de 5g da farinha obtida foi submetida à extração aquosa em água destilada (1,5 % m/v) com auxílio de agitador mecânico para produtos aquosos durante 2 horas à temperatura de 100 °C. Posteriormente, o extrato aquoso contendo o polissacarídeo foi filtrado exaustivamente em tecido fino até obtenção de filtrado livre de partículas insolúveis. A solução filtrada resultante foi lentamente adicionada a recipiente contendo três vezes o seu volume de etanol absoluto (3:1 v/v), sob agitação branda, e deixada em repouso por 24h a 4°C para precipitação dos polissacarídeos. Os polissacarídeos precipitados foram separados por filtração à vácuo em funil de Buchner com placa porosa de vidro sinterizado N° 2 (porosidade média). Em seguida foi adicionada acetona de grau analítico para remoção do etanol residual e desidratação do material. Os polissacarídeos passaram então por processo de secagem sob aquecimento (50 °C) até completa remoção da acetona. Posteriormente, o material foi redissolvido em água destilada (1,5 % m/v) e submetido às mesmas etapas de precipitação em etanol absoluto (3:1 v/v), filtração à vácuo e secagem em acetona sob aquecimento para eliminação de eventuais contaminantes e obtenção do polissacarídeo extraído da alga *G. caudata* (FIGURA 9).

3.3 Determinação de Proteínas

A determinação de proteínas nos polissacarídeos extraídos foi realizada por microanálise elementar (equipamento Perkin-Elmer CHN 2400) a partir da porcentagem de nitrogênio total (%N) da amostra, utilizando o fator de correção de 6,25 ($N \times 6,25$) (MARKS; BUCHSBAUM; SWAIN, 1985). Esse método baseia-se na capacidade de reação da ninidrina com grupos amino primários, assim como outros grupamentos químicos presentes em aminoácidos como os grupos imina (prolina), guainidina (arginina), amida (asparagina), anel indólico (triptofano), sulfidrila (cisteína) e grupamentos amino de citosina e guanina (FRIEDMAN, 2004).

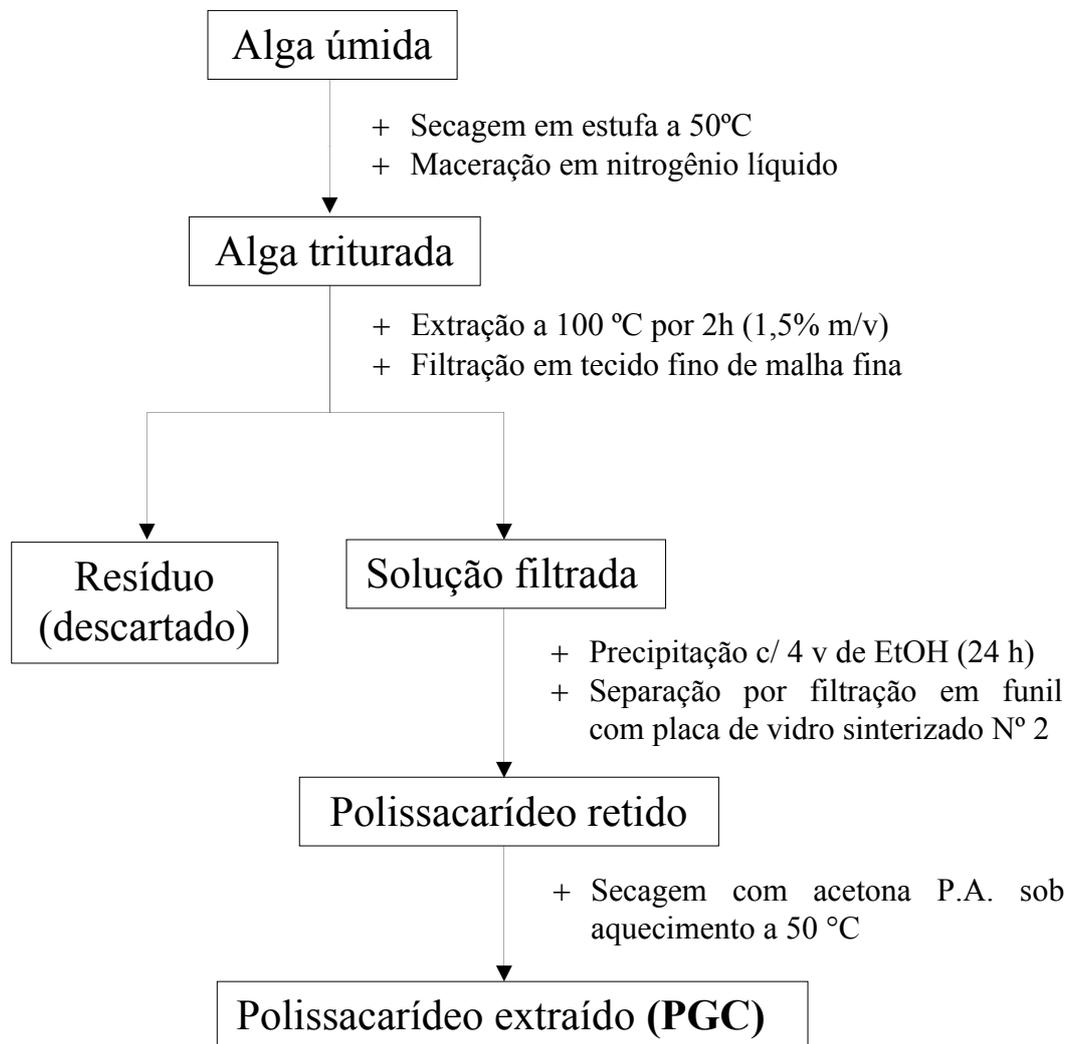


Figura 9 – Estratégia experimental para extração dos polissacarídeos da alga *Gracilaria caudata*.

3.4 Quantificação de Sulfato e Carbono

O conteúdo total de sulfato e o percentual de carbono nos polissacarídeos extraídos de *G. caudata* foram determinados por microanálise elementar (equipamento Perkin-Elmer CHN 2400). O grau de sulfatação foi determinado a partir dos percentuais de carbono (%C) e enxofre (%S) obtidos, utilizando a equação apresentada abaixo (Equação 1) descrita por Melo *et al.* (2002). Essa equação é baseada na estrutura da agarobiose, que consiste de repetições de unidades alternadas de β -D-galactopiranosose e 3,6-anidro- α -L-galactose (ARAKI, 1966 citado por LAHAYE, 2001; USOV, 1998), considerando que o grau de sulfatação é definido como o número de OSO_3^- , ou átomos de enxofre, por unidade dissacarídica repetitiva, que possui 12 átomos de carbono. Logo, o número 12 multiplicado pela massa atômica do carbono corresponde ao número de átomos de carbono por unidade dissacarídica.

$$(S \% / \text{massa atômica do S}) / (C \% / \text{massa atômica do C} \times 12) = 4,5 (S \% / C \%) \quad \text{Eq. (1)}$$

3.5 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

A distribuição das massas molares dos polissacarídeos de *Gracilaria caudata* foi estimada através de Cromatografia de Permeação em Gel (GPC), utilizando cromatógrafo SHIMADZU LC-10AD, com detectores de índice de refração (RID-6A) e ultravioleta (UV-VIS SPD-10AV) a 254 nm. Foi utilizada coluna ULTRAHYDROGEL linear de 7,8 x 300 mm, sendo utilizado NaNO_3 0,1 M como fase móvel e fluxo de $0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ à temperatura ambiente.

Soluções dos polissacarídeos com concentração de $3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ foram preparadas em NaNO_3 0,1 M (solvente) e filtradas em membrana de acetato de celulose com poros de 0,45 μm . O volume injetado das amostras e dos padrões foi de 50 μL . Para construção da curva de calibração foram utilizadas pululanas, polissacarídeos neutros de cadeia linear, de diferentes massas molares em intervalo de grandeza de 10^3 a $10^6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$. A fórmula $\text{Log Mw} = 14,64656 + (-1,03196)\text{Ve}$ foi obtida a partir da equação da reta, onde “Mw” significa massa molecular do polissacarídeo e “Ve” volume de eluição dos padrões e das amostras em mL.

3.6 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho

Espectros de absorção na região do infravermelho dos polissacarídeos de *Gracilaria caudata* foram obtidos em espectrofotômetro de infravermelho Shimadzu IR modelo 8300 entre 400 cm^{-1} e 4000 cm^{-1} . As amostras foram analisadas em pastilhas de KBr.

3.7 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C uni (1D) e bidimensionais (2D) foram obtidos no Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN) da Universidade Federal do Ceará em espectrômetro Bruker Avance DRX 500. Os polissacarídeos da alga *Gracilaria caudata* foram dissolvidos em água deuterada (D_2O) a 2,5 % m/v em tubo apropriado com diâmetro externo de 5 mm. A análise dos polissacarídeo por RMN foi realizada a 70°C durante 12 horas, utilizando 2,2-dimetilsilapentano-5-sulfonato de sódio (DSS) como padrão interno (0.00 ppm for ^1H).

3.8. Atividade antitumoral de PGC *in vitro*

3.8.1. Linhagens de células tumorais

As linhagens de células tumorais de origem humana HL-60 (leucemia promielocítica), HCT-8 (carcinoma de cólon), SF-295 (carcinoma do sistema nervoso) e MDA-MB-435 (melanoma) utilizadas foram cedidas pelo NCI-USA (*National Cancer Institute, Bethesda, MD, USA*) e são cultivadas no Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará.

3.8.2 Manutenção das células tumorais

As células foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (Corning, 75 cm³, volume de 250 mL), utilizando o meio de cultura Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640), suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de antibióticos (concentração final de 100 U.mL⁻¹ de penicilina e 100 µg.mL⁻¹ de estreptomicina), 5,6 % de bicarbonato de sódio, 2 mM de glutamina e ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfônico (tampão HEPES) 1M, seguido de ajuste do pH para 7,2 e filtração em membrana esterilizante de nitrocelulose com poro de 0,22µm de diâmetro (Millipore). As células foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ (NUAIRE, modelo TS autoflow), sendo observado o crescimento celular com ajuda de microscópio de inversão (Nikon, modelo Diaphot) a cada 24 horas. Quando necessário, as células foram repicadas em meio de cultura estéril.

3.8.3 Determinação do efeito de PGC sobre células tumorais *in vitro*

As células tumorais foram plaqueadas em microplacas de 96 poços (2 x 10⁴ células por 100 µL). Os polissacarídeos da alga *G. caudata* (PGC) foram incubados durante 72 horas juntamente com a suspensão de células com volume final de 200 µL, em concentrações variando de 0,5 a 25 µg.mL⁻¹. Após o período de incubação as placas foram centrifugadas a 1500 rpm por 15 minutos e o sobrenadante descartado. Foram adicionados 200 µL da solução de metil tiazolil tetrazolium (MTT) a 0,5 mg.mL⁻¹ em cada poço, sendo as microplacas incubadas por mais 3 horas, em estufa a 37°C e 5% de CO₂. As placas foram novamente centrifugadas (3000 rpm/10 min), o sobrenadante desprezado e o precipitado ressuspensionado em 150 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). Para a quantificação do sal reduzido nas células viáveis, as absorbâncias foram lidas com auxílio de leitor multiplacas (DTX 880 Multimode Detector, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA) em comprimento de onda de 595 nm. A atividade citotóxica foi avaliada pela diferença de densidade óptica gerada pelo MTT em relação ao grupo controle e expressa como concentração inibitória média (CI₅₀).

3.9 Atividade Antitumoral de PGC *in vivo*

3.9.1 Obtenção e manutenção dos animais

Um total de 96 camundongos *Swiss (Mus musculus)* fêmeas pesando entre 25-30g foram utilizados, obtidos do biotério central da Universidade Federal do Ceará. Os animais (8 por grupo experimental) foram mantidos em gaiolas apropriadas com livre acesso a comida e água e submetidos a ciclos de 12 : 12h de claro e escuro. Os animais foram tratados de acordo com os princípios éticos de experimentação animal do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). Este trabalho foi avaliado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) no Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará sob o protocolo nº 13 do dia 23 de fevereiro de 2011.

3.9.2 Manutenção e obtenção da linhagem de células tumorais

O tumor sólido sarcoma 180 utilizado nos experimentos é proveniente do Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. O sarcoma 180, também conhecido como "Croker Tumor", foi identificado no Croker Laboratory (Columbia University, New York) em 1914. Este tumor foi inicialmente classificado como carcinoma mamário, por surgir na região axilar de camundongos. Em 1919, após muitos transplantes subcutâneos, assumiu a forma sarcomatosa sólida de crescimento rápido, mantendo-se nessa forma até o presente (SCHABEL JR., 1977).

As células do sarcoma 180 foram mantidas em cultura na cavidade peritoneal de camundongos sob a forma ascítica. A manutenção das células tumorais foi realizada por transferência destas de camundongos infectados para camundongos sadios.

3.9.3 Determinação do efeito de PGC sobre o crescimento tumoral *in vivo*

No décimo dia após a inoculação das células do tumor sarcoma 180 na cavidade peritoneal de camundongos sadios, um animal de manutenção foi sacrificado por

deslocamento cervical e, após assepsia da região abdominal com álcool iodado, o líquido ascítico da cavidade peritoneal coletado. Cerca de 0,5 mL do líquido ascítico foi retirado e diluído em 5 mL de solução Ringer lactato, suplementado com 0,2 mL de gentamicina (5 mg.mL⁻¹). Da suspensão celular preparada foi retirada uma alíquota e adicionado o corante azul de tripan (1:1 v/v) para determinar o número de células viáveis com auxílio de câmara de Neubauer e microscópio óptico. Cada animal dos grupos experimentais transplantados com Sarcoma 180 foi inoculado subcutaneamente na região axilar superior esquerda com 500 µL da suspensão celular contendo 2 x 10⁶ células tumorais.

Após 24h de inoculação do tumor iniciou-se o tratamento, com duração de sete dias consecutivos, onde foram administrados 200 µL das soluções aquosas de PGC dissolvidas em NaCl 0,9% estéril, nas concentrações de 25 e 50 mg.Kg⁻¹.dia⁻¹ para administração intraperitoneal (i.p.) e de 50 e 100 mg.Kg⁻¹.dia⁻¹ para o tratamento por via oral (v.o.). Dois grupos foram tratados com NaCl 0,9% estéril, um por via intraperitoneal (controle negativo i.p.) e o outro por via oral (controle negativo v.o.). O antineoplásico 5-fluorouracil (5-FU) na concentração de 25 mg.Kg⁻¹.dia⁻¹ administrado intraperitonealmente foi utilizado como controle positivo para ambos os experimentos (vias intraperitoneal e oral) devido à sua baixa absorção por via oral.

No 8º dia amostras de sangue do plexo orbital dos animais tratados foram coletadas para determinação de parâmetros hematológicos e bioquímicos, imediatamente antes do sacrifício. Posteriormente, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Tumor, fígado, estômago, baço, e rins foram retirados, pesados e fixados em formaldeído a 10% para análise histológica. O percentual de inibição do crescimento tumoral (IT) foi calculado pela seguinte fórmula: $IT (\%) = [(A-B)/A] \times 100$, onde A representa o peso médio do tumor do controle negativo e B o peso médio do tumor dos grupos tratados.

3.9.3.1 Análise dos dados

Todos os dados são apresentados como média ± desvio padrão. Para verificação de diferença significativa entre os grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Student Newman-Keuls ($p < 0,05$).

3.9.3.2 Análise morfológica e histopatológica

Posteriormente à fixação com formaldeído 10%, tumor, fígado, estômago, baço e rim foram examinados macroscopicamente quanto a mudanças de tamanho e cor e através da presença ou ausência de hemorragia. Em seguida foram realizados cortes histológicos do tumor e dos órgãos, seguidos de preparo de lâminas histológicas e coloração com hematoxilina e eosina. As lâminas contendo as células coradas foram levadas ao microscópio óptico composto para avaliação de suas características morfológicas e comparadas aos grupos controle para definir o perfil histopatológico da amostra.

3.9.3.3 Determinação do efeito de PGC sobre parâmetros hematológicos e bioquímicos

O sangue coletado do plexo orbital dos animais tratados foi utilizado para as análises bioquímicas e hematológicas. Animais saudáveis (sem tumor) foram também utilizados como controle. Para a contagem total de leucócitos, 20 µL de sangue foram adicionados a 380 µL de solução de Turk e uma alíquota da solução resultante transferida para uma câmara de Neubauer e observada ao microscópio óptico composto. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada através de contagem de esfregaço sanguíneo também com auxílio de microscopia. Os kits da “LABTEST sistemas para diagnóstico” foram utilizados para as análises bioquímicas, seguindo metodologia descrita pelo fabricante.

Os efeitos dos parâmetros hematológicos e bioquímicos foram avaliados utilizando programas estatísticos e apresentados como média ± desvio padrão. Para verificação de diferença significativa entre os grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Bonferroni ($p < 0,05$).

3.9.4 Determinação do efeito associado de PGC e 5-FU sobre o crescimento tumoral *in vivo*

Após determinação da dose e da via de administração com maior efeito antitumoral do polissacarídeo de *G. caudata* (PGC), este foi utilizado em novo experimento conjuntamente

com 5-FU na dose de 10mg/kg/dia, para avaliar o efeito associado do tratamento simultâneo com as duas substâncias. Para este ensaio foram utilizados 5-FU na dose de $10\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$ (i.p.) como controle positivo e NaCl 0,9% estéril (i.p.) como controle negativo. Os protocolos experimentais para obtenção das células neoplásicas viáveis, contagem e inoculação em animais sadios foram realizados de modo semelhante aos procedimentos experimentais descritos para o ensaio antitumoral *in vivo* inicial. As análises hematológicas, bioquímicas, morfológicas e histopatológicas também foram realizadas de modo similar à metodologia descrita anteriormente, assim como os métodos de análise de dados.

4 RESULTADOS

4.1 Extração, Rendimento e Análises Químicas do Polissacarídeo de *G. caudata*

A alga marinha *Gracilaria caudata* foi submetida a extração aquosa a 100 °C por 2 horas, seguido de filtração em tecido fino, precipitação em etanol e secagem a vácuo com auxílio de acetona. O material obtido foi ressolubilizado em água destilada e submetido aos mesmos processos de filtração, precipitação e secagem, originando o polissacarídeo extraído denominado PGC.

A extração aquosa do polissacarídeo da alga *G. caudata* mostrou que foram recuperados 1,64g de polissacarídeo a partir de 5g de alga utilizada na extração, correspondendo a um rendimento de 32,8%. Esse polissacarídeo apresentou ainda percentual de nitrogênio (N) de 1,4%, correspondendo a 8,75% de proteína quando utilizado o fator de correlação de 6,25 (TABELA 3). O teor de nitrogênio apresentado por PGC sugere pequena contaminação da amostra por proteínas, devido à extração concomitante destas moléculas.

A microanálise elementar permitiu ainda determinar os teores de enxofre (S) e carbono (C) na amostra, que foram de 1,0 e 35,88%, respectivamente. A partir dos percentuais de carbono (%C) e enxofre (%S) obtidos, foi possível determinar o grau de sulfatação do material, que foi de 0,13.

Tabela 3 – Rendimento e análise do polissacarídeo da alga *Gracilaria caudata* extraído a 100° C por 2 horas.

Substância	Rendimento ^a (%)	Umidade (%)	S ^b (%)	N ^b (%)	C ^b (%)	Grau de Sulfatação	Proteína ^c (%)
PGC	32,8	14,7	1,0	1,4	35,88	0,13	8,75

^a Rendimento obtido a partir de 5g de farinha de alga.

^b Determinado por microanálise elementar;

^c Determinado por microanálise elementar utilizando fator 6,25.

4.2 Determinação da massa molar por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

A distribuição de massas molares dos polissacarídeos extraídos de *Gracilaria caudata* foi estimada através de Cromatografia de Permeação em Gel (GPC). Para construção da curva de calibração foram utilizados pululanas, homopolissacarídeos lineares isolados do fungo *Aureobasidium pullulans* (LEATHERS, 2003) de diferentes massas molares, em intervalo de grandeza de 10^3 a 10^6 g.mol⁻¹.

O perfil cromatográfico dos polissacarídeos da alga *G. caudata* (PGC) é apresentado na Figura 10. O cromatograma mostra um único pico, com volume de eluição de 8,95 mL no seu ápice. A massa molar do pico foi estimada em $2,5 \times 10^5$ g.mol⁻¹ ou 250 kDa.

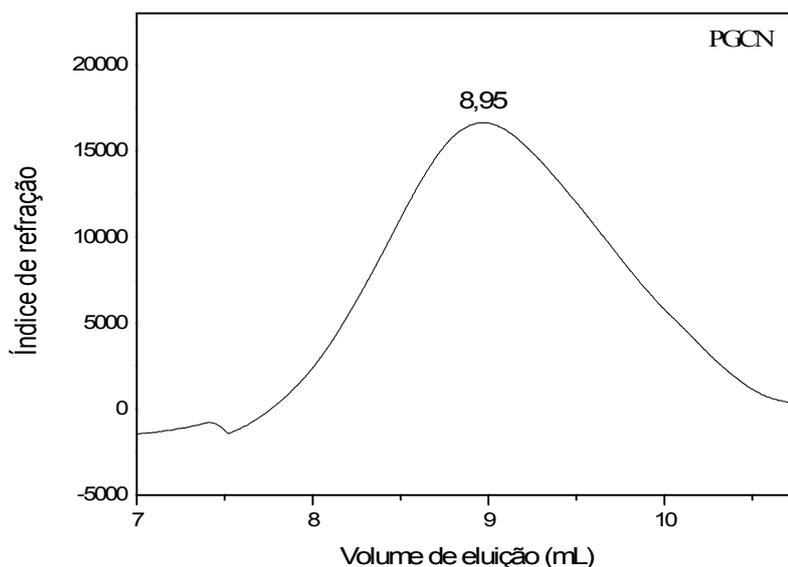


Figura 10 – Perfil cromatográfico dos polissacarídeos extraídos da alga *Gracilaria caudata* em cromatografia de permeação em gel.

4.3 Espectro de Absorção na Região do Infravermelho

A espectroscopia de absorção na região do infravermelho foi utilizada como ferramenta na determinação da estrutura química dos polissacarídeos extraídos da alga *G.*

caudata (PGC). O espectro de infravermelho de PGC é apresentado na Figura 11, onde é possível observar bandas bem resolvidas de interesse para análise estrutural do polissacarídeo.

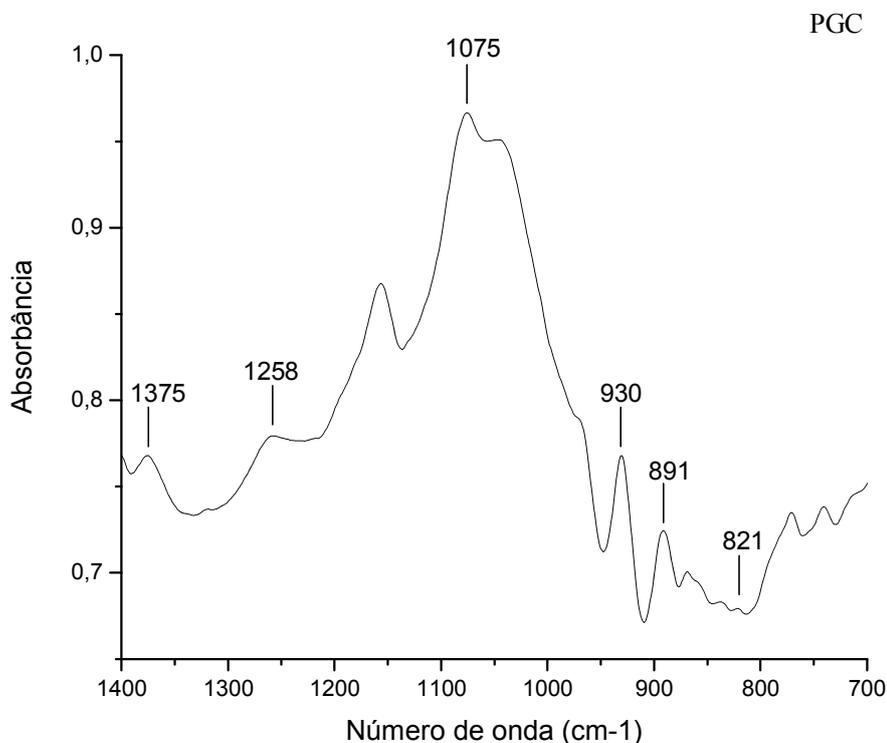


Figura 11 – Espectro de absorção na região do infravermelho do polissacarídeo PGC extraído da alga *Gracilaria caudata*.

4.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹³C e ¹H

A técnica de Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) em uma e duas dimensões foi utilizada para investigar a estrutura química do polissacarídeo PGC extraído da alga *Gracilaria caudata*. O espectro de RMN de ¹H é apresentado na Figura 12. O espectro de RMN de ¹³C do polissacarídeo PGC é mostrado na Figura 13, enquanto o espectro de carbono DEPT 135 é mostrado na Figura 14.

O Espectro de RMN em duas dimensões HSQC de ¹³C e ¹H, que correlaciona os resultados de RMN de próton e carbono é apresentado na Figura 15. Os resultados obtidos no espectro de HSQC foram compilados e plotados na Tabela 4.

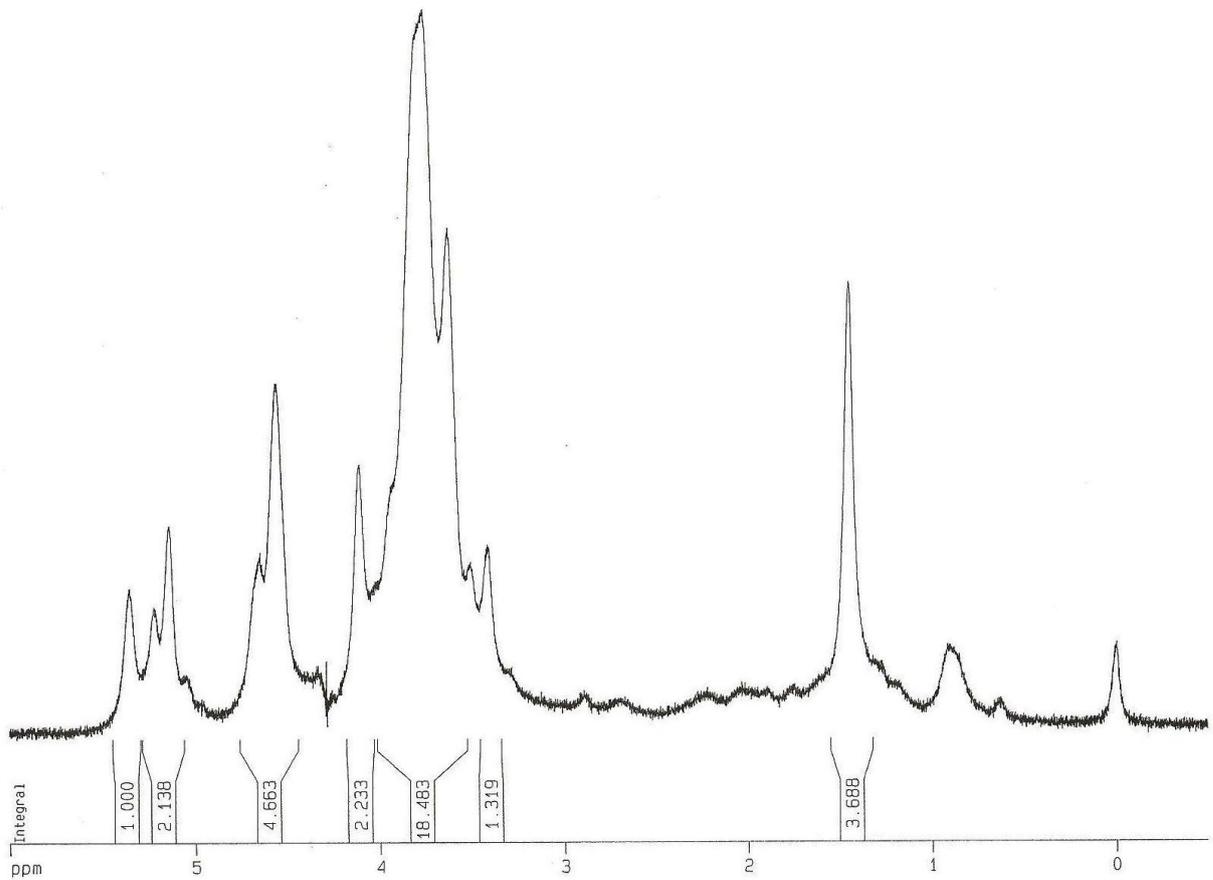


Figura 12 – Espectro de RMN de ¹H do polissacarídeo de *G. caudata* (PGC).

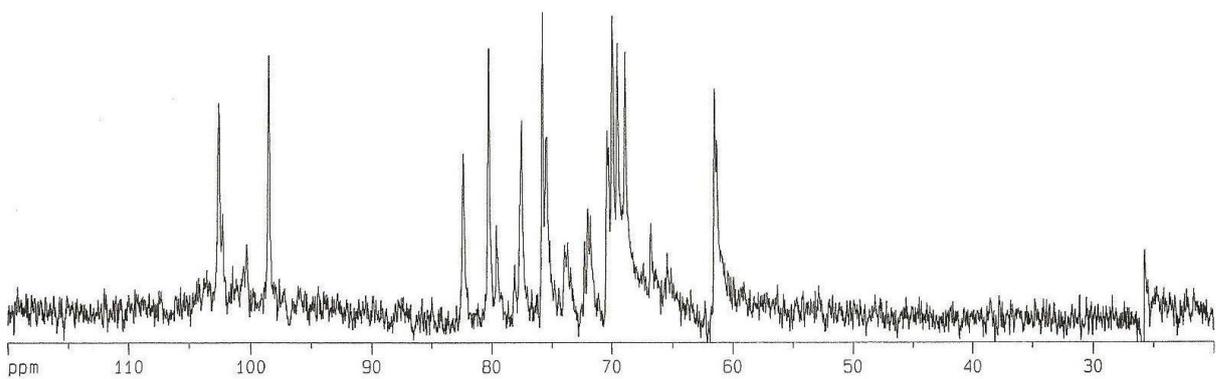


Figura 13 – Espectro de RMN de ¹³C do polissacarídeo de *G. caudata* (PGC).

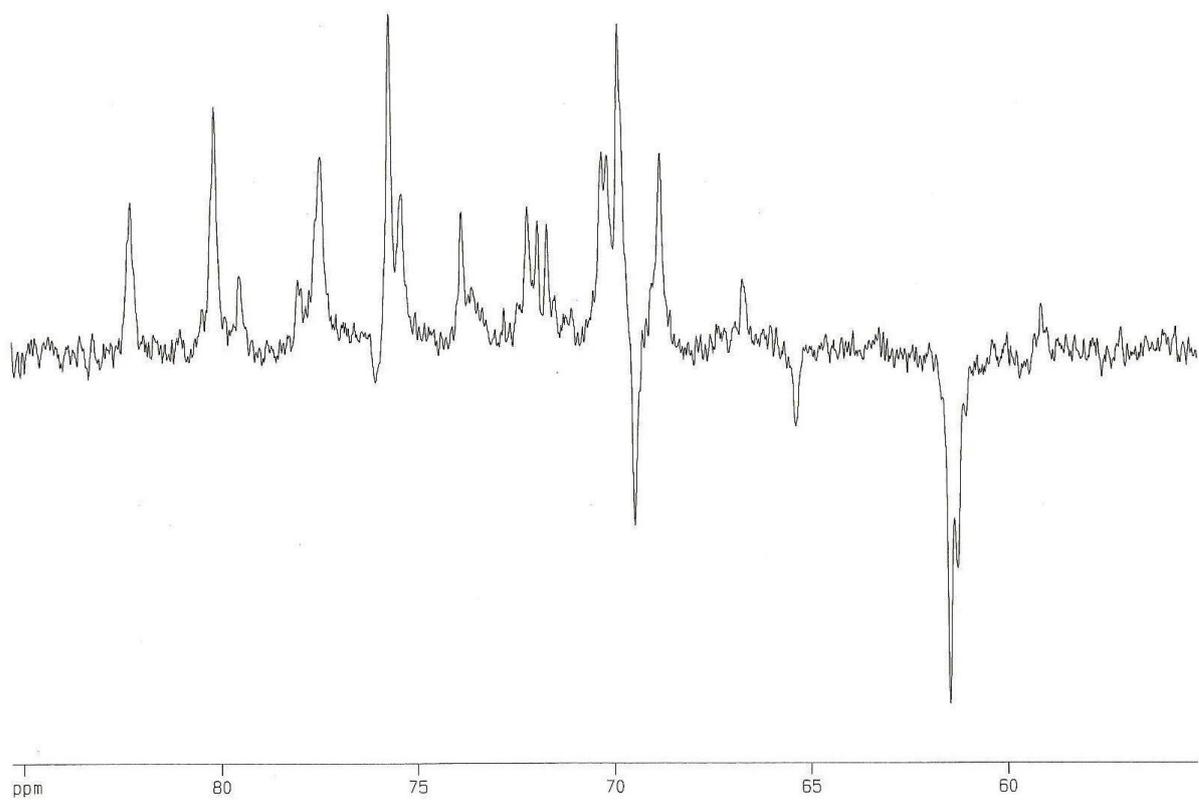


Figura 14 – Espectro de DEPT 135 do polissacarídeo PGC extraído da alga *Gracilaria caudata*.

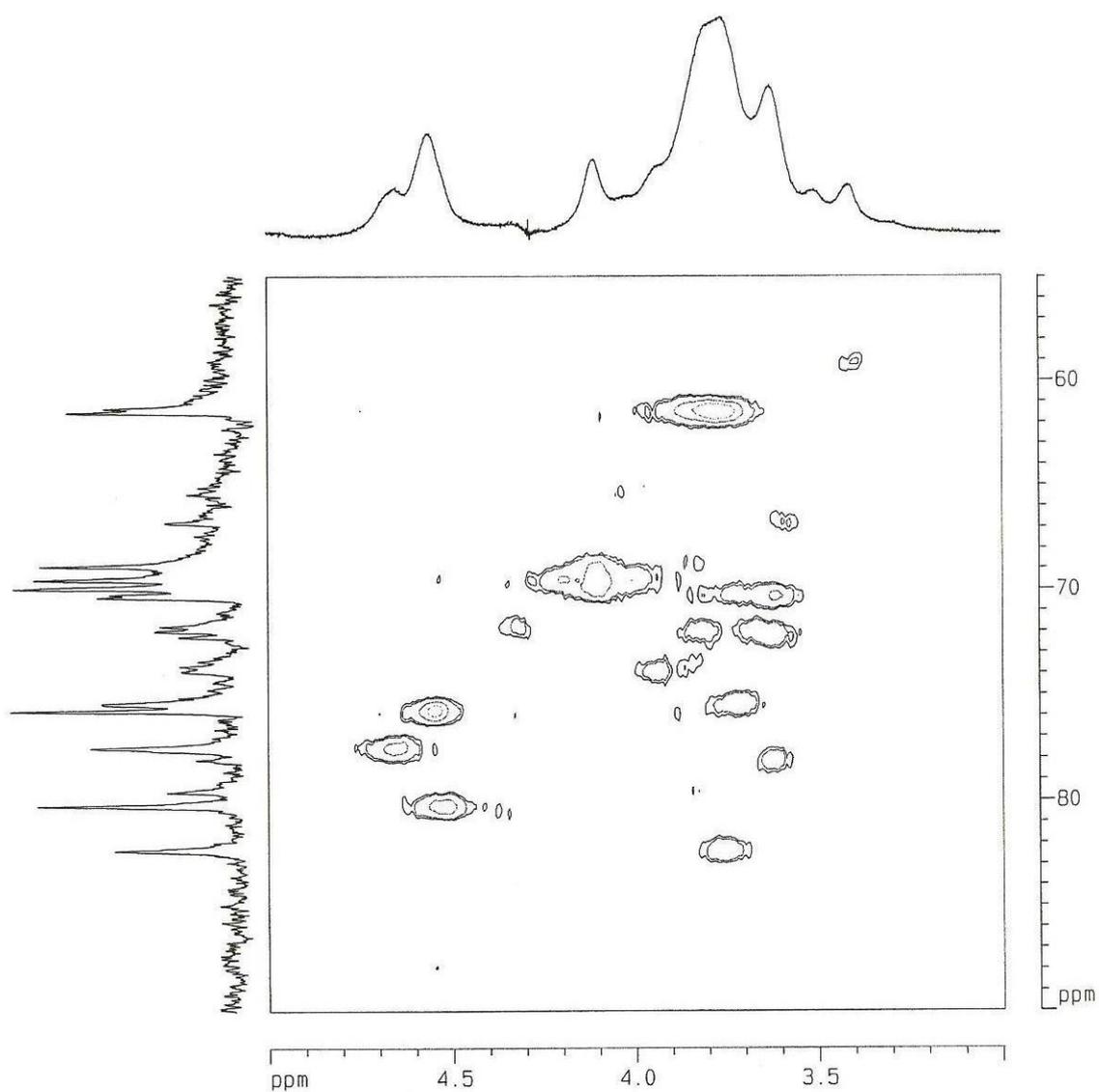


Figura 15 – Espectro de HSQC de ^{13}C e ^1H do polissacarídeo PGC extraído da alga *Gracilaria caudata*.

Tabela 4 – Assinalamentos de RMN de ^1H e ^{13}C para o polissacarídeo PGC.

Unit ^a	^1H deslocamento químico (ppm)						
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	O-Me
G	4.56	3.62	3.75	4.10	3.71	3.78	nd
LA	5.13	4.10	4.51	4.66	4.55	4.10	nd
L-6S	5.34	nd	nd	nd	nd	nd	nd
G6M	nd ^b	nd	nd	nd	nd	nd	3.41
LA2M	nd	nd	nd	nd	nd	nd	3.5

	^{13}C deslocamento químico (ppm)						
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	O-Me
G	102.5	70.37	82.3	68.87	75.44	61.5	nd
LA	98.4	69.95	80.2	77.5	75.6	69.5	nd
L-6S	100.26	nd	nd	nd	nd	68.86	nd
G6M	nd	nd	nd	nd	73.6	71.8	59.1
LA2M	nd	nd	nd	nd	nd	nd	59.1

^a nomenclatura proposta por Knutsen et al. (1994); nd: não detectado

4.5 Efeito de PGC sobre células tumorais *in vitro*

A citotoxicidade dos polissacarídeos extraídos da alga marinha *G. caudata* (PGC) foi avaliada contra as linhagens de células tumorais humanas SF-295, HL-60, HCT-8 e MDA-MB-435 através do ensaio colorimétrico do MTT.

O efeito do polissacarídeo PGC sobre as linhagens de células tumorais humanas foi determinado. O polissacarídeo PGC apresentou valores de concentração inibitória média superiores a 25µg/mL para todas as células tumorais testadas. Portanto, PGC foi considerado não citotóxico.

4.6 Efeito de PGC sobre o crescimento tumoral *in vivo*

O potencial antitumoral *in vivo* do polissacarídeo de *G. caudata* (PGC) foi avaliado utilizando camundongos *Swiss* transplantados com tumor Sarcoma 180. O tumor sólido de cada animal tratado foi pesado e sua massa úmida determinada. Os resultados foram expressos como a média da massa tumoral (g/100g de massa corpórea) de cada grupo \pm o erro padrão da média (E.P.M.).

A massa tumoral do grupo controle negativo (administrado com solução salina de NaCl 0,9%) foi de $3,32 \pm 0,13$ g, enquanto o grupo controle positivo, tratado com 5-fluorouracil (25mg/kg/dia), revelou ser da ordem de $0,88 \pm 0,13$ g. Nos grupos tratados com o polissacarídeo (PGC) por via intraperitoneal foram obtidos os valores médios de $1,75 \pm 0,17$ g e $1,56 \pm 0,08$ g para as doses de 25 e 50 mg/kg/dia, respectivamente (FIGURA 16). No experimento por via oral foram encontrados os valores de $2,09 \pm 0,1$ g para a dose de 50 mg/kg/dia e $2,14 \pm 0,22$ g quando administrados 100 mg/kg/dia (FIGURA 17).

A análise de variância da massa tumoral dos grupos tratados revelou que o polissacarídeo PGC foi capaz de reduzir o tamanho do tumor nos animais transplantados com Sarcoma 180. Os animais tratados por via intraperitoneal com o polissacarídeo PGC apresentaram percentuais de inibição tumoral da ordem de 47,59% para a dose de 25mg/kg/dia e 53,53% quando administrados 50 mg/kg/dia.

Os grupos tratados com PGC por via oral mostraram taxas de inibição de 37,27% e 35,98% para as doses de 50 mg/kg/dia e 100 mg/kg/dia, respectivamente, sendo considerado que o efeito antitumoral máximo promovido pelo polissacarídeo por via oral foi alcançado na menor dose testada. O controle positivo utilizado (5-FU 25mg/kg/dia) também foi eficiente em reduzir o tumor, apresentando percentual de inibição tumoral de 74,14% para os animais tratados.

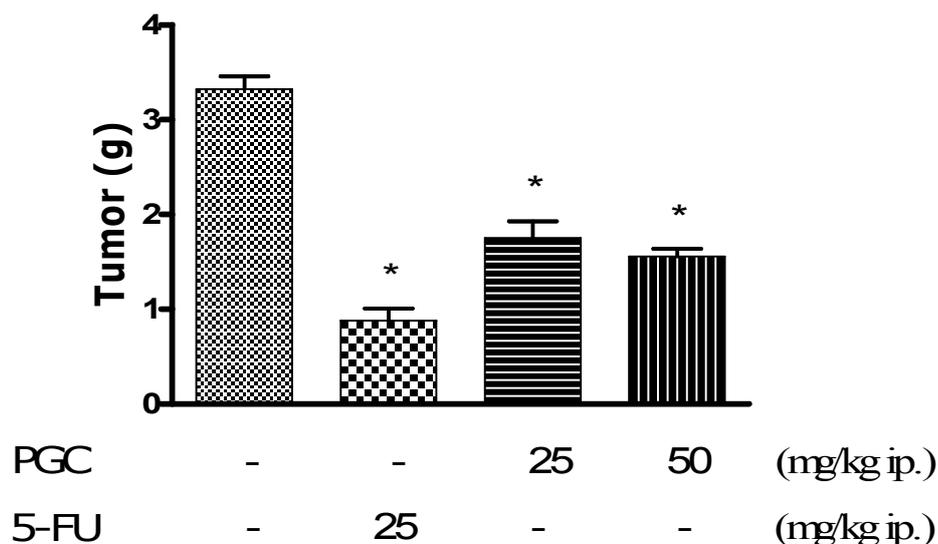


Figura 16 – Efeito do polissacarídeo extraído de *G. caudata* (PGC) sobre o crescimento tumoral em camundongos transplantados com Sarcoma 180 tratados por via intraperitoneal. O controle negativo foi administrado com NaCl 0,9% e o controle positivo com 5-FU. Resultados expressos como média \pm E.P.M. * $P < 0,05$ comparado com salina por ANOVA seguido por Student Newman Keuls, com $n = 8$ para cada grupo utilizado.

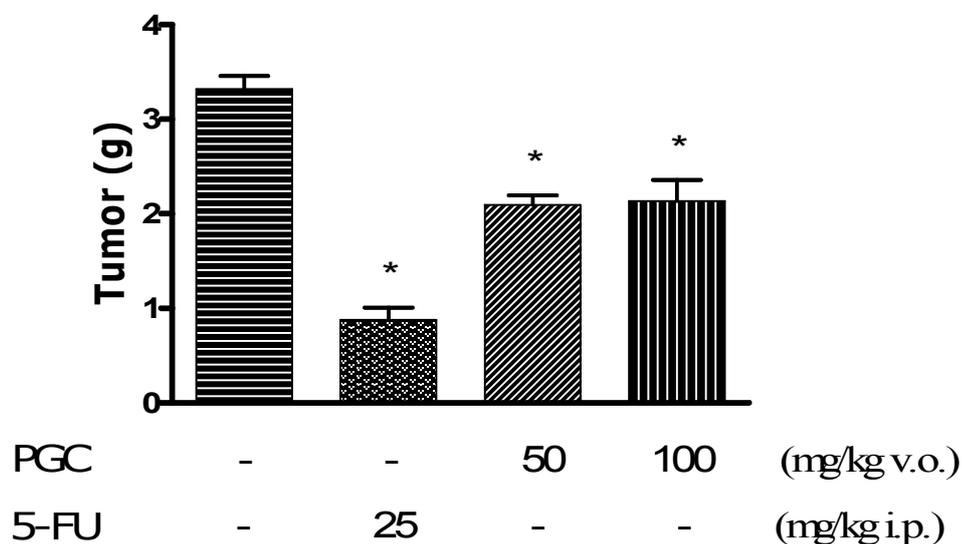


Figura 17 – Efeito do polissacarídeo extraído de *G. caudata* (PGC) sobre o crescimento tumoral em camundongos transplantados com Sarcoma 180 tratados por via oral. O controle negativo foi administrado com NaCl 0,9% e o controle positivo com 5-FU. Resultados expressos como média \pm E.P.M. * $P < 0,05$ comparado com salina por ANOVA seguido por Student Newman Keuls, com $n = 8$ para cada grupo utilizado.

4.7 Análise morfológica e histopatológica

Após sacrifício dos animais transplantados com tumor Sarcoma 180, foram realizados cortes histológicos do tumor e dos órgãos fígado, baço, rim e estômago (quando tratados por via oral), seguidos de preparo de lâminas histológicas e coloração com hematoxilina e eosina. A coloração por hematoxilina e eosina (H/E) foi utilizada para diferenciar citoplasma e núcleo. Esse procedimento permite analisar as estruturas celulares e identificar possíveis alterações toxicológicas nas amostras analisadas.

O tratamento dos animais com o polissacarídeo PGC não alterou significativamente a massa dos órgãos fígado e rim nas doses administradas intraperitonealmente (25 e 50 mg/kg/dia). Resultado semelhante foi obtido para os órgãos fígado, rim e estômago após tratamento por via oral nas doses de 50 e 100 mg/kg/dia (TABELA 5).

O polissacarídeo PGC administrado por via intraperitoneal foi capaz de aumentar significativamente o tamanho do baço dos camundongos em 65,2% na dose de 25 mg/kg/dia e 47,8% na dose de 50 mg/kg/dia, comparado com o grupo controle negativo transplantado com tumor ($P < 0,05$). O tratamento de PGC por via oral não ocasionou aumento significativo deste órgão, quando comparado com o grupo controle negativo transplantado ($P > 0,05$) (TABELA 5), enquanto o controle positivo 5-FU desencadeou um efeito contrário, reduzindo de modo significativo o peso do baço dos animais em 47,8%, quando comparado com o grupo controle negativo transplantado ($P < 0,05$).

A análise histopatológica dos tumores extirpados dos animais submetidos ao tratamento revelou ausência de diferença no padrão morfológico. Todos os grupos apresentaram neoplasia maligna de origem mesenquimal constituída por células poligonais exibindo anisocariose, pleomorfismo celular e nuclear e alguns núcleos vesiculosos (não corados uniformemente). Foram encontradas também numerosas figuras de mitose, invasão muscular e necrose de coagulação (FIGURAS 18 e 19).

A avaliação histopatológica do fígado dos animais revelou a presença de hiperplasia das células de Kupffer em todos os grupos testados. O grupo controle negativo transplantado apresentou moderada tumefação celular de hepatócitos e congestão portal e da veia centrolobular. Os animais tratados com 5-FU ip. exibiram moderada a intensa tumefação celular de hepatócitos, dilatação dos sinusóides, esteatose microvesicular e macrovesicular (FIGURAS 20 e 21).

O fígado dos animais tratados com PGC por via i.p. na dose de 25 mg.kg⁻¹ mostrou moderada tumefação celular de hepatócitos, congestão portal e da veia centrolobular, com pequenos focos inflamatórios dispersos, enquanto o tratamento com PGC (50 mg.kg⁻¹) revelou intensa tumefação celular de hepatócitos e focos inflamatórios (FIGURA 22). Já os animais tratados com PGC por via oral mostraram moderada a intensa tumefação celular de hepatócitos. Na dose de 100 mg.kg⁻¹ observou-se congestão portal e da veia centrolobular e focos inflamatórios dispersos (FIGURA 23).

Tabela 5 – Efeito do polissacarídeo extraído de *G. caudata* (PGC) sobre a massa úmida de órgãos (g/100g de massa corpórea) de camundongos transplantados com Sarcoma 180 (2.0 × 10⁶ células por animal, s.c.). Os animais foram tratados por sete dias consecutivos, a partir do primeiro dia após o implante tumoral. O antineoplásico 5-fluorouracil (5-FU) foi administrado como controle positivo e salina (NaCl 0,9%) como controle negativo.

Substância	Via	Dose (mg/kg/dia)	Fígado	Rim	Baço	Estômago
Camundongos saudáveis						
0,9% NaCl	ip.	-	4,59 ± 0,19	1,46 ± 0,05	0,18 ± 0,03	-
Camundongos transplantados com Sarcoma 180						
0,9% NaCl	ip.	-	5,5 ± 0,2	1,3 ± 0,04	0,69 ± 0,07 ^a	0,84 ± 0,04
5-FU	ip.	25	5,3 ± 0,19	1,27 ± 0,07	0,33 ± 0,02 ^{a,b}	-
PGC	ip.	25	6,1 ± 0,33	1,41 ± 0,06	1,02 ± 0,12 ^{a,b}	-
		50	5,1 ± 0,26	1,15 ± 0,07	1,14 ± 0,05 ^{a,b}	-
PGC	v.o.	50	5,7 ± 0,15	1,38 ± 0,12	0,66 ± 0,05 ^a	0,89 ± 0,04
		100	5,2 ± 0,11	1,17 ± 0,04	0,65 ± 0,04 ^a	0,8 ± 0,06

Resultados expressos como média ± E.P.M. do peso dos órgãos. ^a P < 0,05 comparado com camundongos sadios por ANOVA seguido por Student Newman Keuls; ^b P < 0,05 comparado com animais transplantados com tumor Sarcoma 180 tratado com salina por ANOVA seguido por Student Newman Keuls.

As análises histopatológicas do baço dos animais tratados com salina por via intraperitoneal e oral mostraram o órgão com tamanho homogêneo, discreta desorganização da polpa branca e presença de megacariócitos de permeio. Os animais tratados com o controle positivo 5-FU exibiram baço de tamanho reduzido e folículos linfóides circunscritos, congestão da polpa vermelha e pigmentos de hemossiderina. Já os animais tratados com PGC por via intraperitoneal revelaram desorganização da polpa branca e da polpa vermelha havendo mistura entre as duas, com presença de numerosos megacariócitos de permeio. Quando tratados com PGC por via oral os animais apresentaram desorganização da polpa vermelha, áreas hemorrágicas, pigmentos de hemossiderina e presença de numerosos megacariócitos de permeio (FIGURAS 24 e 25).

Todos os grupos tratados com PGC apresentaram alterações no baço, de modo gradativo em função do aumento da dose administrada. Este resultado pode ser devido à indução do sistema imune dos animais quando tratados com o polissacarídeo. Já os animais tratados com o 5-fluorouracil sofreram redução do tamanho do baço, com diminuição dos folículos linfóides, sugerindo depleção do sistema imune desses animais.

As análises histopatológicas dos rins dos animais tratados com salina por via oral e intraperitoneal mostraram arquitetura glomerular preservada. Todos os grupos experimentais apresentaram moderada tumefação celular do epitélio tubular e hemorragia glomerular e tubular. O tratamento com PGC por ambas as vias intraperitoneal e oral resultou em necrose nefrotóxica focal em áreas dispersas e raros cilindrohialinos nas maiores doses testadas de cada grupo. Tais alterações se apresentaram de forma discreta e a necrose identificada mostrou ser focal e rara, sugerindo possibilidade de reversão após interrupção do tratamento ou redução da dose (FIGURAS 27 e 28).

Os animais tratados por via oral tiveram ainda seus estômagos retirados e a análise histopatológica revelou aspecto pregueado mucoso preservado em todos os grupos. O grupo controle negativo mostrou a região cárdia com mucosa revestida por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado sem alterações no córion, mucosa fúndica constituída por células principais e parietais e submucosa sem alterações histológicas. Os animais tratados com PGC por via oral (50 mg/kg/dia) apresentaram na região cárdia mucosa revestida por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado com presença de numerosos vasos sanguíneos no córion e fúndica constituída por células principais e parietais e submucosa com áreas hemorrágicas. Na dose de 100 mg/kg/dia o polissacarídeo induziu as mesmas alterações

visualizadas na dose menor, com presença de focos inflamatórios no córion e vasos ectásicos. Tais alterações são indicativas de inflamação precoce na mucosa gástrica, sugerindo diminuição ou reversibilidade das mesmas por redução da dose ou descontinuidade do tratamento (FIGURA 29).

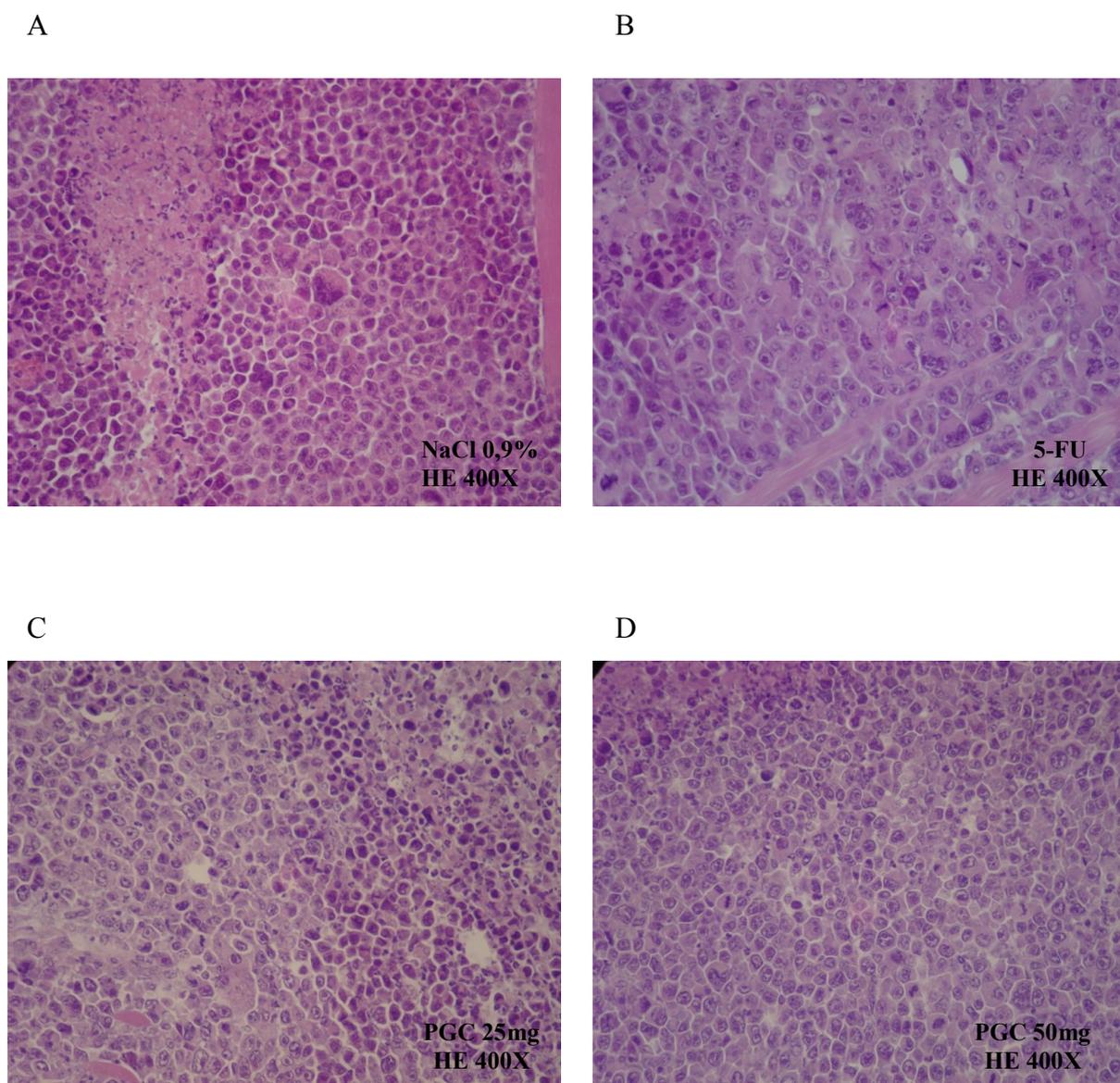


Figura 18 – Fotomicrografias de cortes histológicos (400x) do tumor de camundongos transplantados com tumor sarcoma 180 tratados por via intraperitoneal. A – Controle negativo (NaCl 0,9% ip.); B – Controle positivo (5-FU 25 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ ip.); C – PGC (25 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ ip.); D - PGC (50 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ ip.).

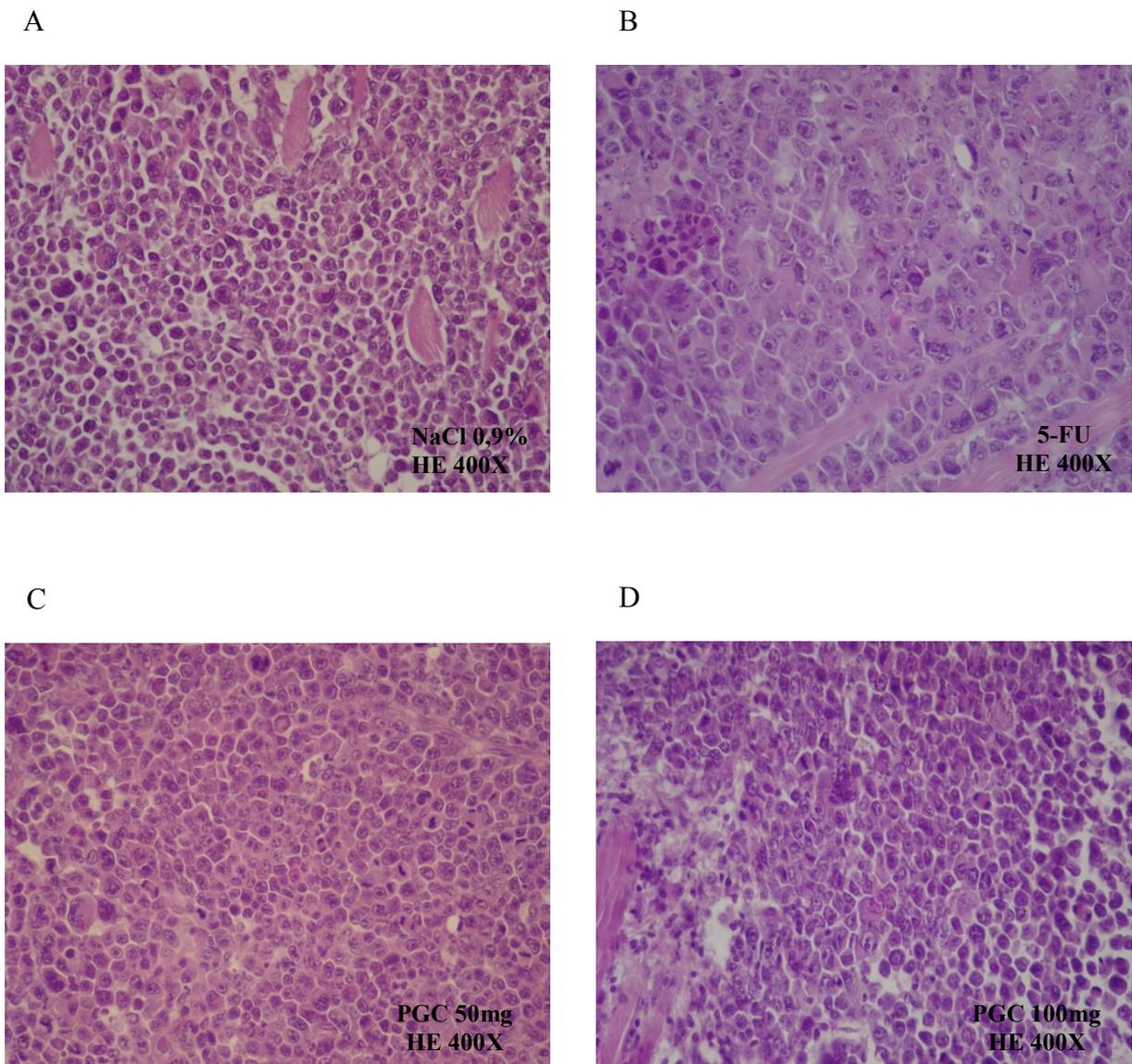


Figura 19 – Fotomicrografias de cortes histológicos (400x) do tumor de camundongos transplantados com tumor sarcoma 180 tratados por via oral. A – Controle negativo (NaCl 0,9% v.o.); B – Controle positivo (5-FU 25 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ ip.); C – PGC (50 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ v.o.); D - PGC (100 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ v.o.).

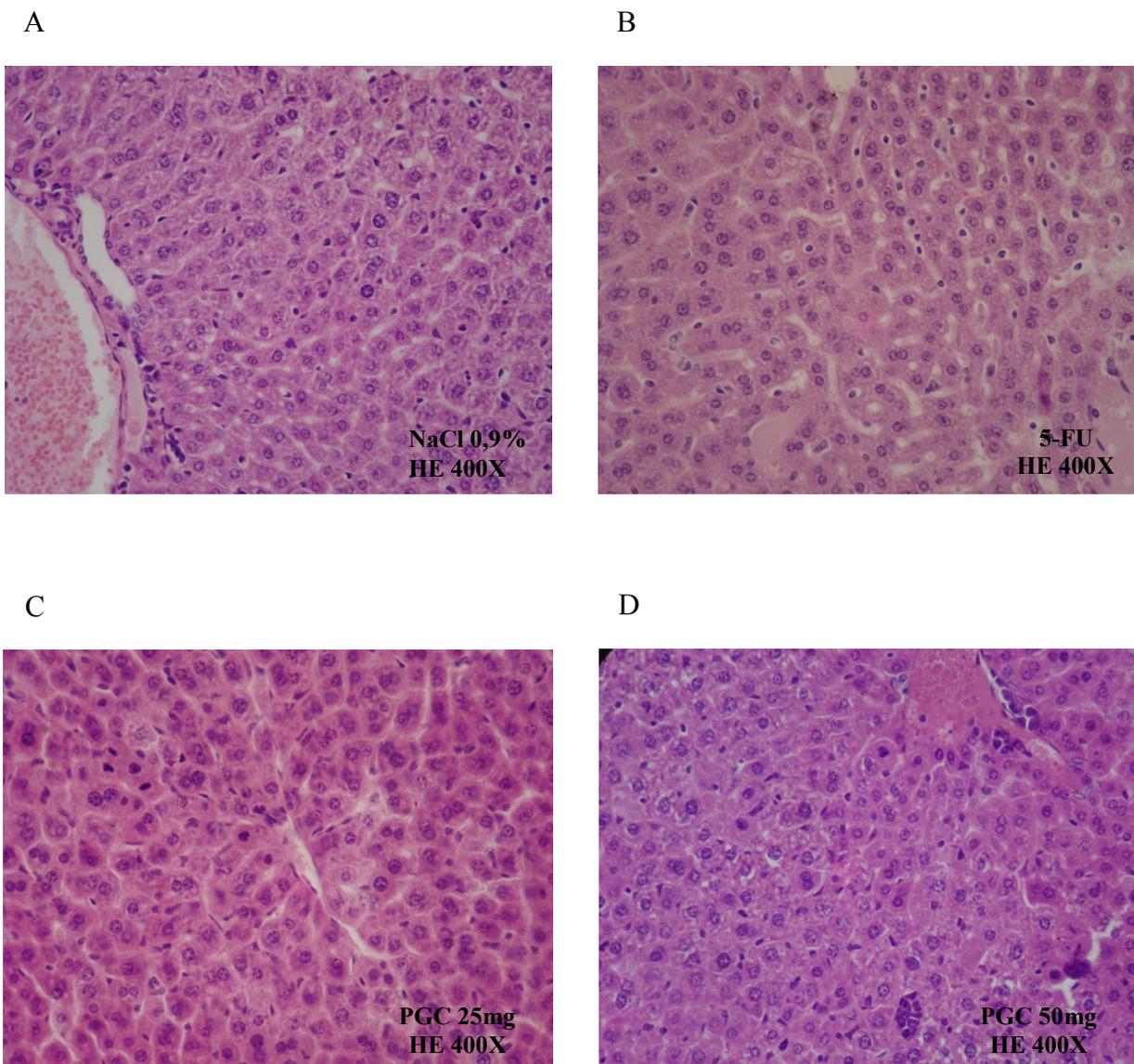


Figura 20 – Fotomicrografias de cortes histológicos (400x) do fígado de camundongos transplantados com tumor sarcoma 180 tratados por via intraperitoneal. A – Controle negativo (NaCl 0,9% ip.); B – Controle positivo (5-FU 25 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ ip.); C – PGC (25 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ ip.); D - PGC (50 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ ip.).

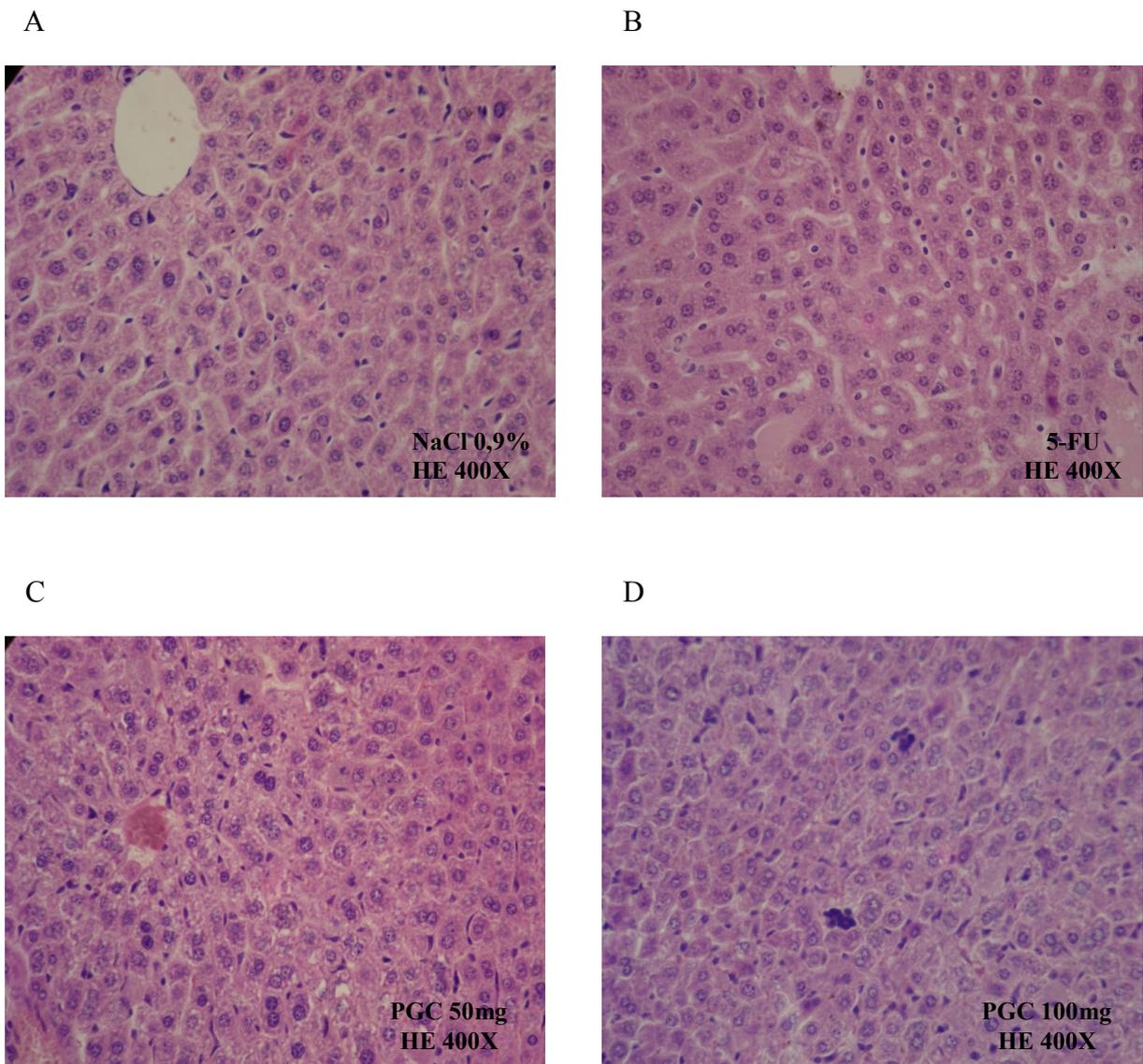


Figura 21 – Fotomicrografias de cortes histológicos (400x) do fígado de camundongos transplantados com tumor sarcoma 180 tratados por via oral. A – Controle negativo (NaCl 0,9% v.o.); B – Controle positivo (5-FU 25 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ ip.); C – PGC (50 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ v.o.); D - PGC (100 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ v.o.).

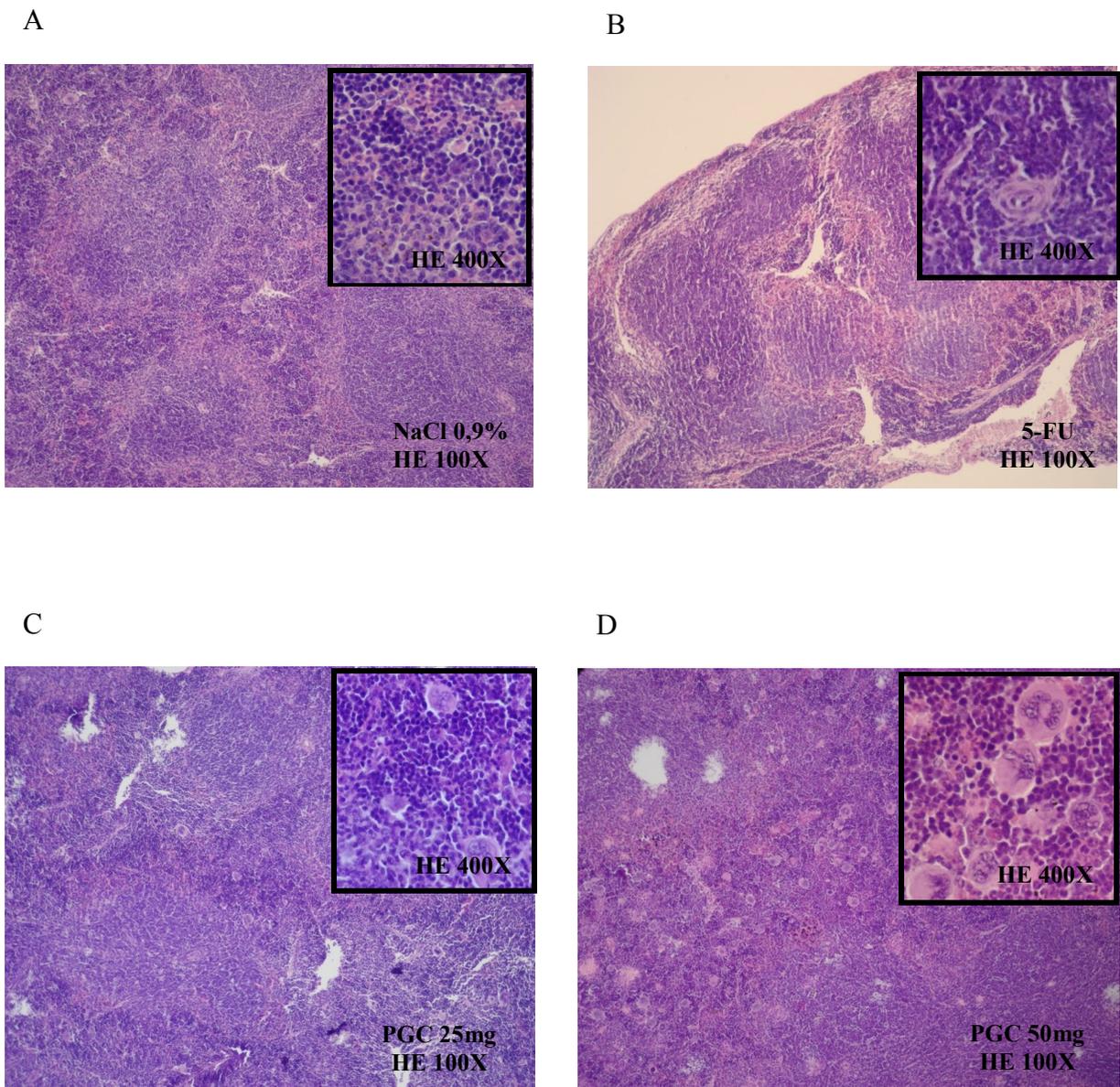


Figura 22 – Fotomicrografias de cortes histológicos (100 e 400x) do baço de camundongos transplantados com tumor sarcoma 180 tratados por via intraperitoneal. A – Controle negativo (NaCl 0,9% ip.); B – Controle positivo (5-FU 25 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ ip.); C – PGC (25 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ ip.); D - PGC (50 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ ip.).

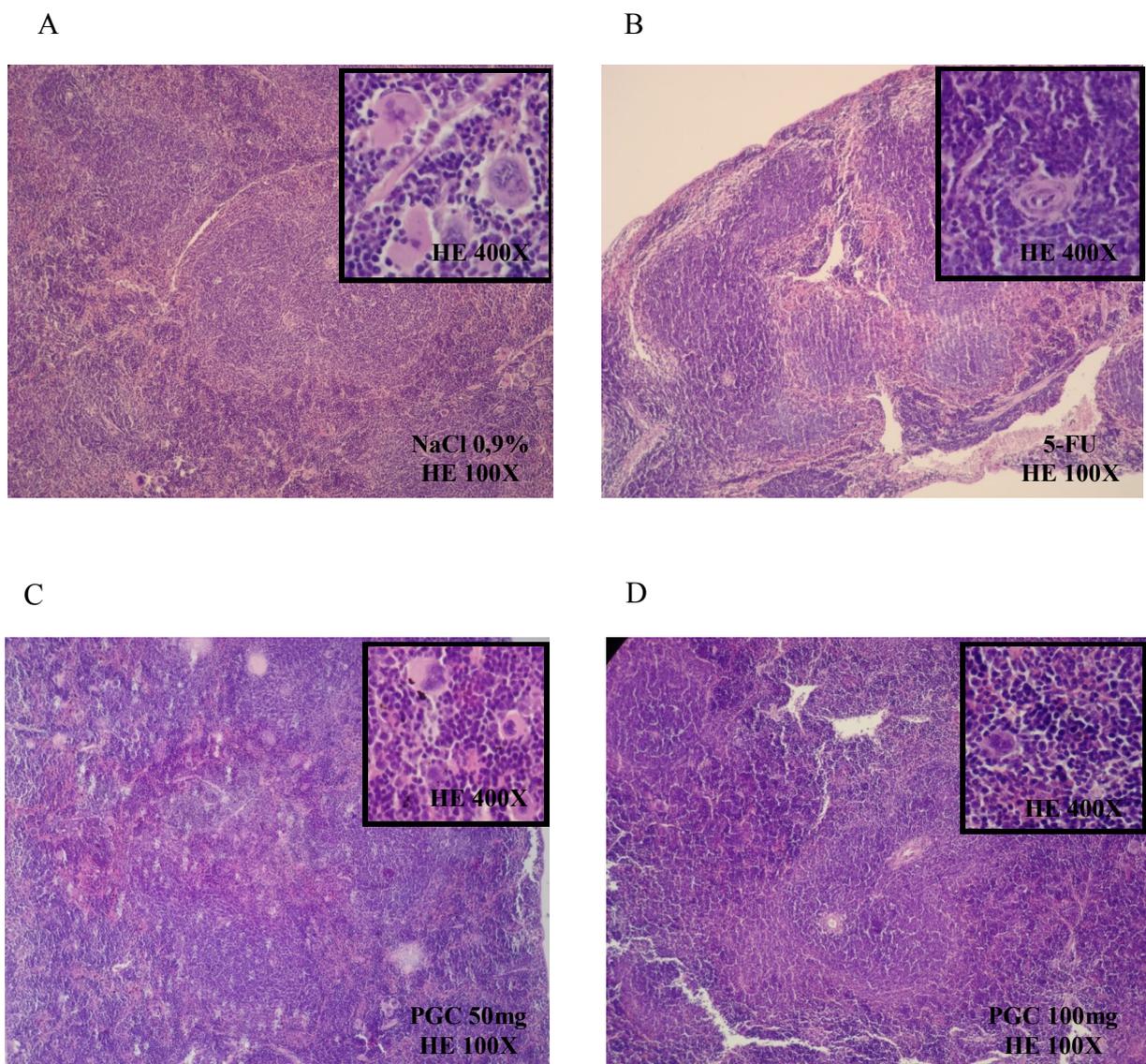


Figura 23 – Fotomicrografias de cortes histológicos (100 e 400x) do baço de camundongos transplantados com tumor sarcoma 180 tratados por via oral. A – Controle negativo (NaCl 0,9% v.o.); B – Controle positivo (5-FU 25 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ ip.); C – *PGC* (50 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ v.o.); D - *PGC* (100 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ v.o.).

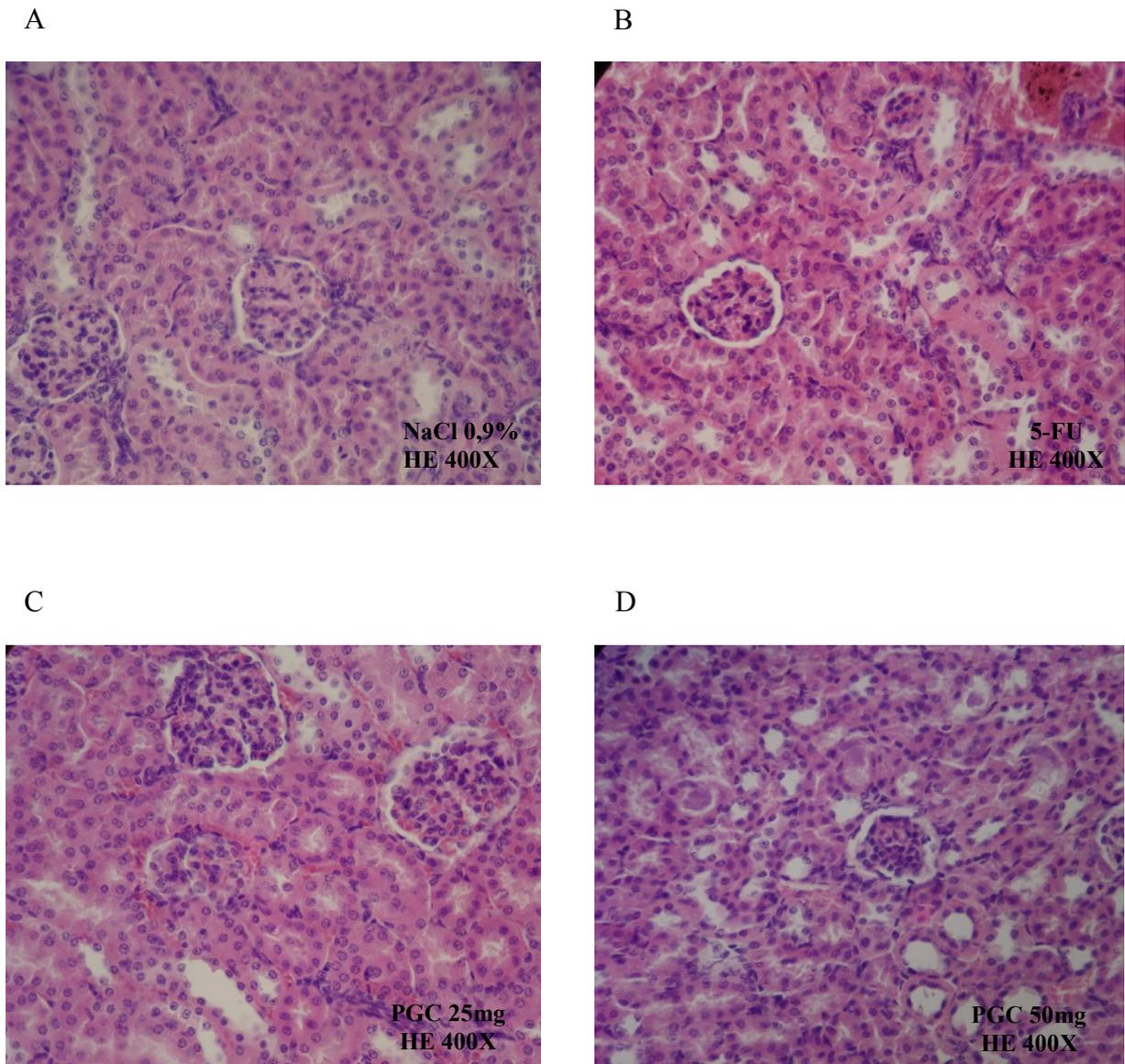


Figura 24 – Fotomicrografias de cortes histológicos (400x) do rim de camundongos transplantados com tumor sarcoma 180 tratados por via intraperitoneal. A – Controle negativo (NaCl 0,9% ip.); B – Controle positivo (5-FU 25 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ ip.); C – PGC (25 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ ip.); D - PGC (50 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ ip.).

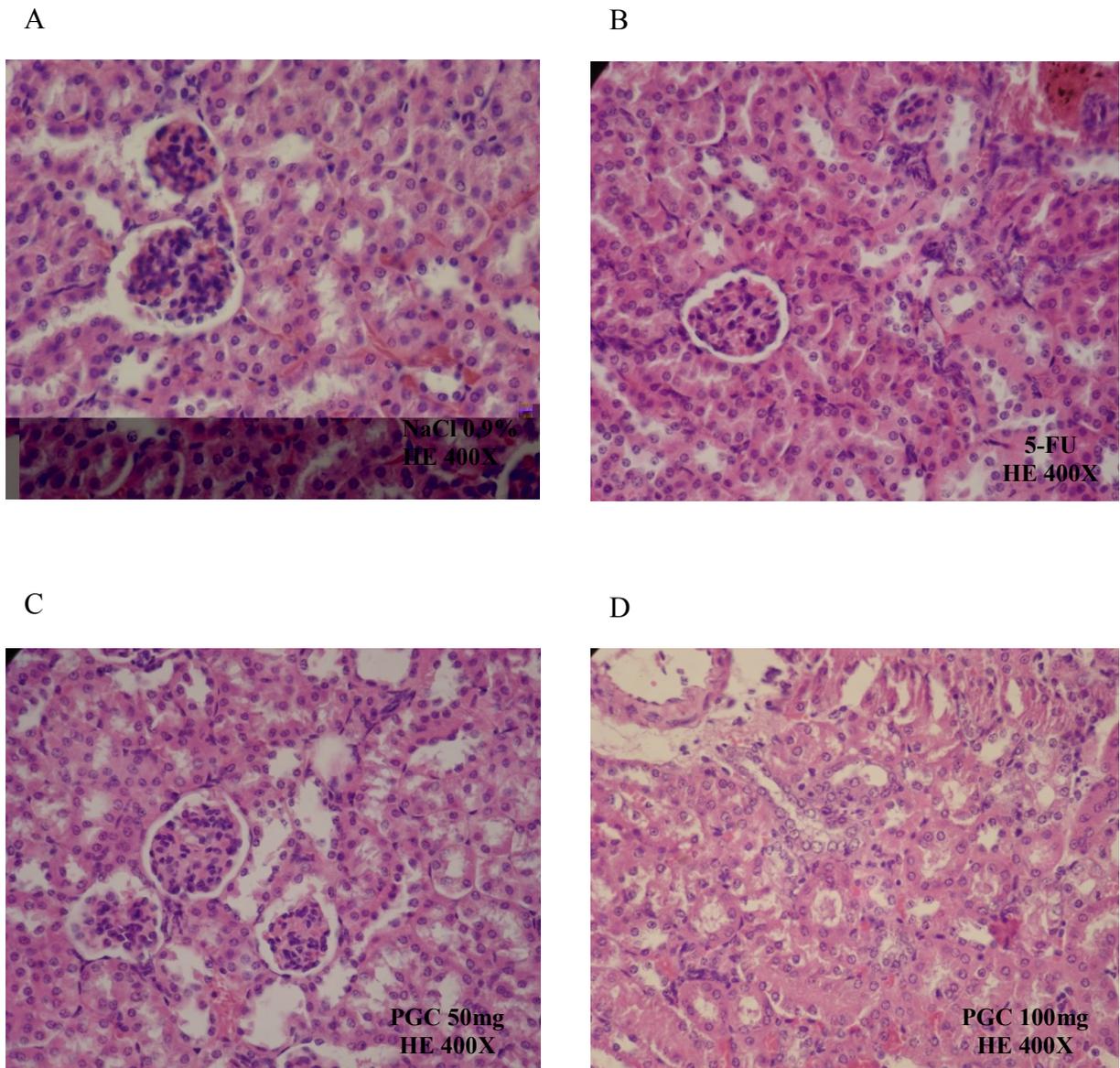


Figura 25 – Fotomicrografias de cortes histológicos (400x) do rim de camundongos transplantados com tumor sarcoma 180 tratados por via oral. A – Controle negativo (NaCl 0,9% v.o.); B – Controle positivo (5-FU 25 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ ip.); C – PGC (50 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ v.o.); D - PGC (100 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ v.o.).

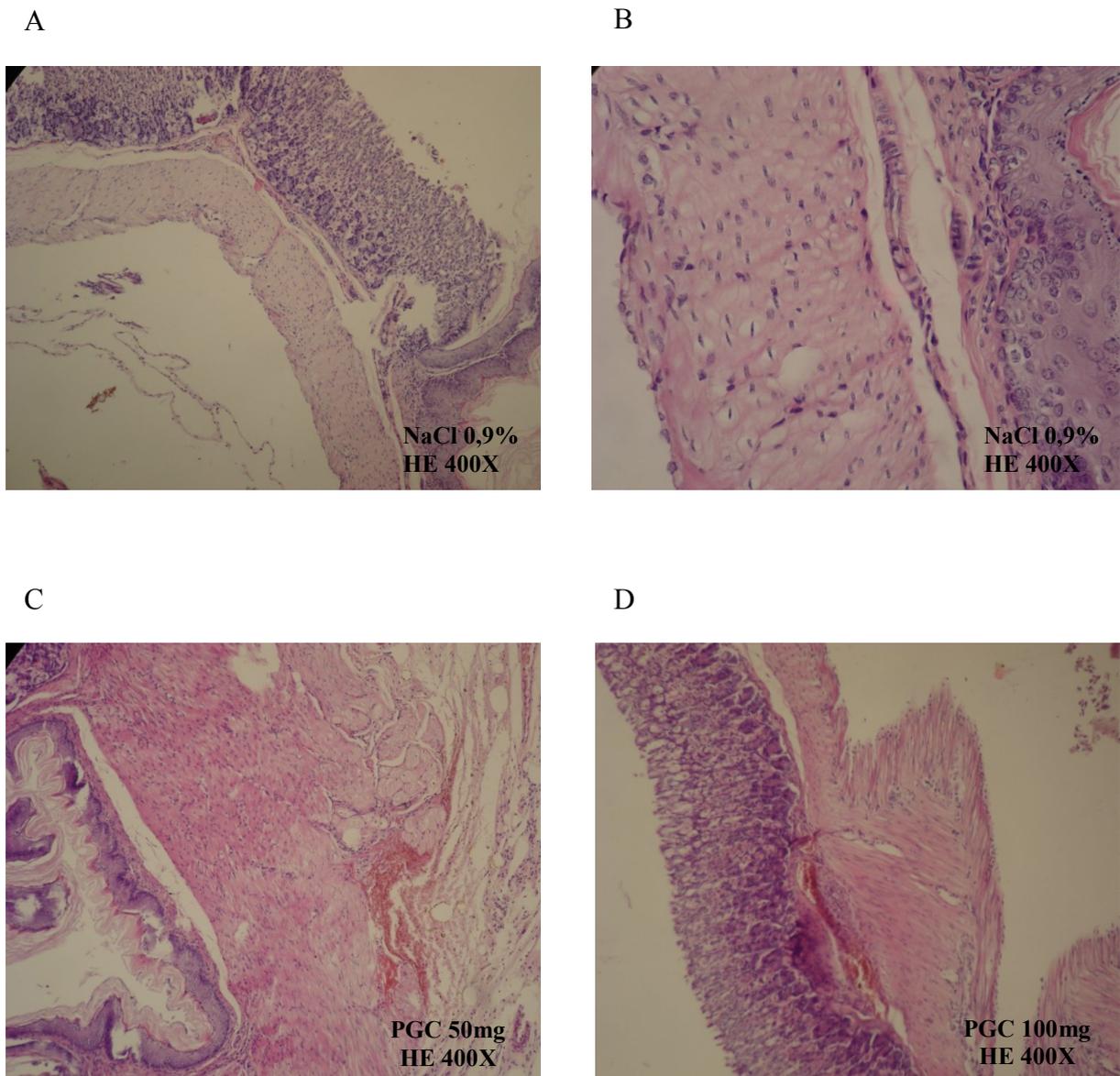


Figura 26 – Fotomicrografias de cortes histológicos (100 e 400x) do estômago de camundongos transplantados com tumor sarcoma 180 tratados por via oral. A e B – Controle negativo (NaCl 0,9% v.o.); C – PGC (50 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ v.o.); D - PGC (100 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ v.o.).

4.8 Efeito de PGC sobre parâmetros hematológicos e bioquímicos

O sangue periférico coletado do plexo retro-orbital de camundongos saudáveis e transplantados com tumor Sarcoma 180 foi utilizado para avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos dos animais.

A análise bioquímica do sangue dos camundongos saudáveis e transplantados com tumor Sarcoma 180 pertencentes aos grupos controle negativo (NaCl 0,9%), controle positivo (5-FU 25 mg.kg⁻¹.dia⁻¹) e aos grupos experimentais tratados com o polissacarídeo PGC revelou que não houve alteração nos níveis séricos das enzimas alanina aminotransferase (ALT), também conhecida como transaminase glutâmico pirúvica (TGP) e aspartato aminotransferase (AST), também chamada de transaminase glutâmico oxalacética (TGO), bem como nos níveis plasmáticos de uréia (TABELA 6).

A Tabela 7 mostra a análise hematológica dos animais saudáveis e transplantados com Sarcoma 180 submetidos ao tratamento com salina, 5-FU e PGC por via intraperitoneal. A contagem total de leucócitos foi drasticamente reduzida nos animais tratados com 5-FU na concentração de 25 mg.kg⁻¹ quando comparado ao grupo controle negativo transplantado com tumor ($P < 0,05$).

Os animais tratados com PGC por via intraperitoneal nas duas doses testadas apresentaram valores de leucócitos totais levemente aumentados comparados ao grupo controle negativo. Contudo, houve aumento significativo ($P < 0,05$) da percentagem de neutrófilos em ambas as doses tratadas por via i.p., chegando a 50% da contagem total de glóbulos brancos na dose de 50 mg.kg⁻¹.dia⁻¹, comparado com o grupo controle negativo transplantado com tumor tratado com solução salina (TABELA 7).

Tabela 6 – Efeito do polissacarídeo extraído de *G. caudata* (PGC) sobre parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos transplantados com Sarcoma 180. Os animais foram tratados por via intraperitoneal durante sete dias consecutivos, a partir do primeiro dia após o implante tumoral.

Droga	Dose (mg.kg⁻¹)	Uréia (mg.dL⁻¹)	ALT (U.LL⁻¹)	AST (U.LL⁻¹)
<i>Camundongos saudáveis</i>				
0.9% NaCl	-	36.0 ± 4.7	54.0 ± 9.3	134.0 ± 10.9
<i>Camundongos transplantados com Sarcoma 180</i>				
0.9% NaCl	-	38.2 ± 4.8	58.2 ± 3.9 ^a	114.4 ± 9.5
5-FU	25	35.2 ± 3	38.7 ± 2	94.6 ± 11
PGC	25	29.2 ± 2.1	52.6 ± 3.7	90.4 ± 8.8
PGC	50	29.0 ± 1.5	48.4 ± 3.1	101.8 ± 6.9

Resultados expressos como média ± E.P.M. de cinco animais.

Tabela 7 – Efeito do polissacarídeo extraído de *G. caudata* (PGC) sobre parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos transplantados com Sarcoma 180. Os animais foram tratados por via intraperitoneal durante sete dias consecutivos, a partir do primeiro dia após o implante tumoral.

Droga	Dose (mg.kg ⁻¹)	Plaquetas ¹	Leucócitos totais ²	Contagem diferencial de leucócitos (%)			
				Eosinófilo	Linfócito	Neutrófilo	Monócito
<i>Camundongos saudáveis</i>							
NaCl 0.9%	-	8.3 ± 1.1	1.8 ± 0.1	0.0	94.8	4.3	1.0
<i>Camundongos transplantados com Sarcoma 180</i>							
NaCl 0.9%	-	6.0 ± 0.7	1.8 ± 0.3	0.0	73.1 ^a	21.4 ^a	5.5 ^a
5-FU	25	2.3 ^{a,b}	0,25 ± 0 ^{a,b}	0.0	91.7	4.5	3.0
PGC	25	7.5 ± 0.9 ^c	2.0 ± 0.3 ^c	0.0	51.0 ^{a,b,c}	43.0 ^{a,b,c}	7.0 ^{a,c}
PGC	50	5.5 ± 1.1	1.9 ± 0.01 ^c	0.0	45.6 ^{a,b,c}	50.0 ^{a,b,c}	4.2

Resultados expressos como média ± E.P.M. de cinco animais. ¹(10⁵ células/mL); ² (10³ células/mL); ^a $P < 0,05$ comparado com camundongos saudáveis por ANOVA seguido por Bonferroni; ^b $P < 0,05$ comparado com camundongos transplantados com Sarcoma 180 tratados com NaCl 0,9% por ANOVA seguido por Bonferroni; ^c $P < 0,05$ comparado com camundongos transplantados com Sarcoma 180 tratados com 5-FU por ANOVA seguido por Bonferroni.

4.9 Efeito antitumoral associado de PGC e 5-fluorouracil

Após determinação do potencial antitumoral *in vivo* do polissacarídeo extraído de *G. caudata* (PGC), foi avaliado o efeito associado de PGC com o antineoplásico 5-fluorouracil utilizando camundongos *Swiss* transplantados com tumor Sarcoma 180. O tumor sólido de cada animal tratado foi pesado e sua massa úmida determinada.

Os animais transplantados com Sarcoma 180 tratados com NaCl 0,9% (controle negativo) apresentaram massa tumoral média de $1,77 \pm 0,19\text{g}$, enquanto o grupo controle positivo tratado com 5-fluorouracil (10 mg.kg^{-1}) exibiu massa tumoral média de $1,15 \pm 0,13\text{g}$, correspondendo a um percentual de inibição tumoral da ordem de 37,22%. Contudo, quando os animais transplantados foram tratados com 5-FU na dose de $10 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ conjuntamente com o polissacarídeo PGC na concentração de $25 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$, a massa tumoral média correspondeu a $0,6 \pm 0,09\text{g}$. Conseqüentemente, o percentual de inibição tumoral apresentado pela associação das duas substâncias foi de 70,74% (FIGURA 27).

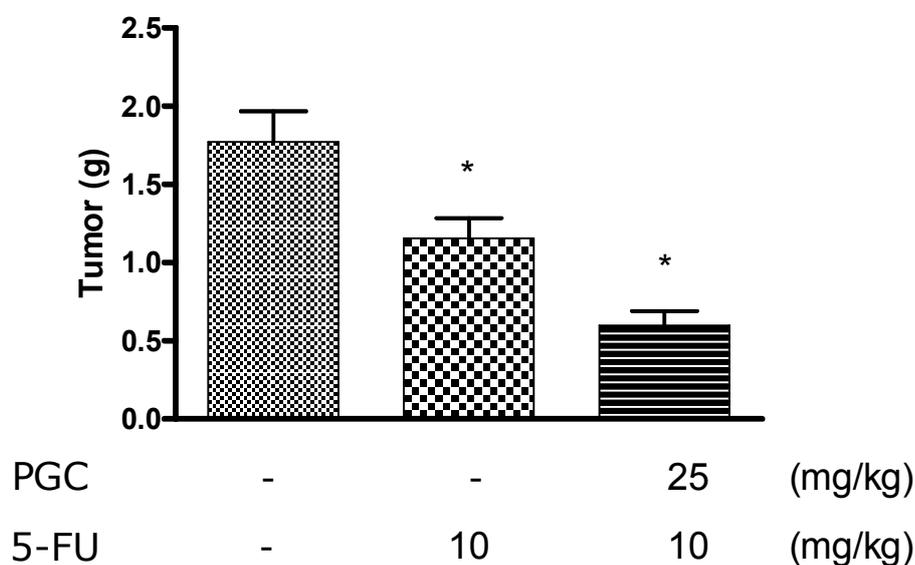


Figura 27 – Efeito do polissacarídeo extraído de *G. caudata* (PGC) associado com 5-fluorouracil sobre o crescimento tumoral em camundongos transplantados com Sarcoma 180. O controle negativo foi tratado com NaCl 0,9% e o antineoplásico 5-FU foi utilizado como controle positivo. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. * $P < 0,05$ comparado com NaCl 0,9% por ANOVA, seguido por Student Newman Keuls.

4.10 Análise morfológica e histopatológica do tratamento associado de PGC e 5-FU

Após sacrifício dos animais transplantados com tumor Sarcoma 180, foram realizados cortes histológicos do tumor e dos órgãos fígado, baço e rim. O tratamento dos animais com o polissacarídeo PGC (25 mg.kg^{-1}) não alterou significativamente a massa relativa dos rins na dose administrada, quando comparado com camundongos saudáveis. O grupo controle positivo (5-FU 10 mg.kg^{-1}) administrado por via intraperitoneal não mostrou alteração significativa na massa dos órgãos fígado, baço e rim dos animais. Contudo, o tratamento com 5-FU na dose de $10 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ associado com o polissacarídeo PGC na concentração de $25 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ resultou em discreto aumento da massa relativa do fígado dos camundongos, da ordem de 15%, comparado com camundongos saudáveis (TABELA 8).

Os animais tratados com 5-FU na concentração de $10 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ não apresentaram diferença na massa úmida relativa do baço em relação ao grupo controle negativo transplantado com Sarcoma 180 (TABELA 8). Entretanto, o polissacarídeo PGC na dose de $25 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ administrado conjuntamente com 5-FU na concentração de $10 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ por via intraperitoneal foi capaz de aumentar significativamente o tamanho do baço dos camundongos em 80%, comparado com o grupo controle negativo transplantado com tumor ($P < 0,05$).

A análise histopatológica dos tumores não revelou modificações do padrão morfológico das células tumorais. Em todos os grupos foi observada neoplasia maligna composta por células poligonais pleomórficas exibindo escasso citoplasma e anisocariose, células gigantes tumorais além de mitoses típicas e atípicas, necrose de coagulação e invasão muscular (FIGURA 29).

O fígado dos animais transplantados com Sarcoma 180 pertencentes ao grupo controle negativo (NaCl 0,9%) apresentou moderada tumefação celular, congestão portal, dilatação da veia centrolobular, hiperplasia das células de Kupffer, hemossiderófagos e pigmentos de hemossiderina. O grupo tratado com 5-FU (10 mg.kg^{-1}) exibiu degeneração hidrópica, tumefação celular de hepatócitos e hiperplasia das células de Kupffer, além de esteatose microvesicular, indicativo de toxicidade hepática. Os grupos experimentais submetidos ao tratamento com o polissacarídeo PGC (25 mg.kg^{-1}) e com 5-FU (10 mg.kg^{-1}) associado a PGC na concentração de 25 mg.kg^{-1} apresentaram discreta tumefação celular, raras células de Kupffer hiperplasiadas, congestão portal e da veia centrolobular, com perfil semelhante ao do grupo controle negativo (FIGURA 30).

Tabela 8 – Efeito do polissacarídeo extraído de *G. caudata* (PGC) associado com 5-fluorouracil sobre a massa úmida relativa de órgãos (g/100g de massa corpórea) de camundongos transplantados com Sarcoma 180 ($2,0 \times 10^6$ células por animal, s.c.). Os animais foram tratados por sete dias consecutivos, a partir do primeiro dia após o implante tumoral. O antineoplásico 5-fluorouracil (5-FU) foi administrado como controle positivo e salina (NaCl 0,9%) como controle negativo.

Substância	Via	Dose (mg/kg/dia)	Fígado	Rim	Baço
<i>Camundongos saudáveis</i>					
NaCl 0,9%	ip.	-	4,59 ± 0,19	1,46 ± 0,05	0,18 ± 0,03
<i>Camundongos transplantados com Sarcoma 180</i>					
NaCl 0,9%	ip.	-	4,4 ± 0,15	1,1 ± 0,03	0,5 ± 0,05 ^a
5-FU	ip.	10	4,5 ± 0,15	1,1 ± 0,06	0,5 ± 0,02 ^a
PGC		25			
+	ip.	+	5,3 ± 0,13 ^b	1,3 ± 0,04 ^b	0,9 ± 0,06 ^{a,b}
5-FU		50			

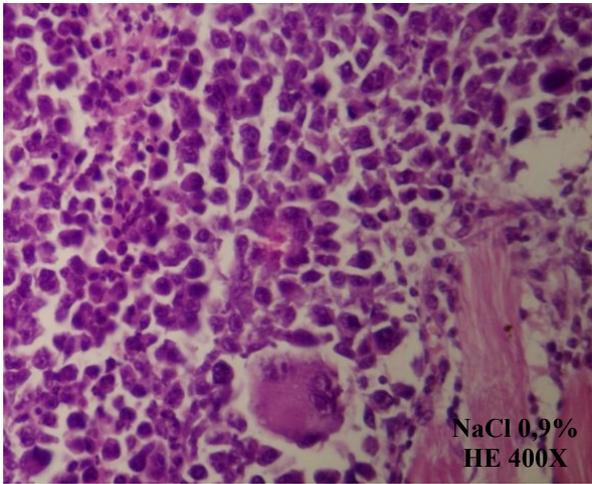
Resultados expressos como média ± E.P.M. do peso dos órgãos. ^a $P < 0,05$ comparado com camundongos sadios por ANOVA seguido por Student Newman Keuls; ^b $P < 0,05$ comparado com animais transplantados com tumor Sarcoma 180 tratado com salina por ANOVA seguido por Student Newman Keuls.

As análises histopatológicas dos rins dos animais tratados com NaCl 0,9% mostraram arquitetura glomerular preservada, discreta tumefação celular do epitélio tubular, hemorragia glomerular e tubular. Quando PGC (25 mg.kg⁻¹) foi administrado, pôde-se observar moderada tumefação celular do epitélio tubular, hemorragia glomerular e tubular e raros indícios de necrose nefrotóxica focal em áreas dispersas. O tratamento associado de PGC (25 mg.kg⁻¹) com 5-FU na concentração de 10 mg.kg⁻¹ revelou moderada tumefação celular do epitélio tubular, vacuolização isomérica do epitélio tubular, hemorragia glomerular e tubular.

Entretanto, tais alterações são consideradas leves e a necrose identificada mostrou ser focal e rara, sugerindo possibilidade de reversão após interrupção do tratamento ou redução da dose (FIGURA 31).

O perfil histopatológico do baço dos animais transplantados com Sarcoma 180 revelou a presença de megacariócitos de permeio em todos os grupos analisados. O controle negativo apresentou arquitetura lobular mantida, folículos linfóides visíveis, numerosos megacariócitos e pigmentos de hemossiderina, enquanto os animais tratados com 5-FU apresentaram folículos linfóides visíveis, numerosos megacariócitos e congestão da polpa vermelha. Nos camundongos submetidos ao tratamento por via intraperitoneal com o polissacarídeo PGC na dose de 25 mg.kg^{-1} , com ou sem associação com 5-FU, foi observado perda da arquitetura lobular, folículos amplos em meio à polpa vermelha igualmente extensa, numerosos megacariócitos, pigmentos de hemossiderina e hemorragia. Essas alterações percebidas no baço dos animais tratados com PGC sugerem um fenômeno de indução da resposta imune do hospedeiro (FIGURA 32).

A



B

5-FU 10mg
HE 400X

C

PGC 25mg
HE 400X

D

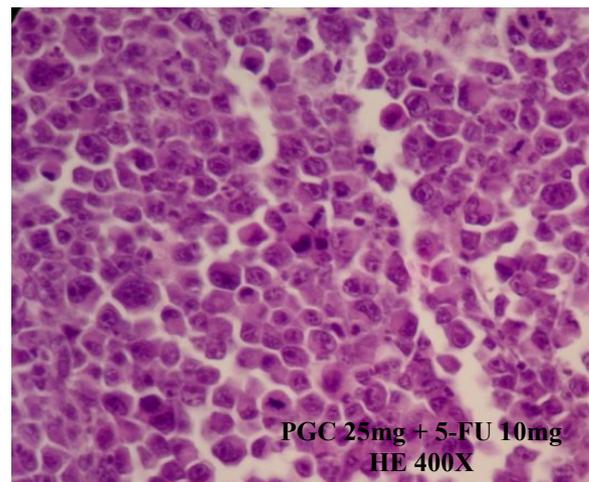
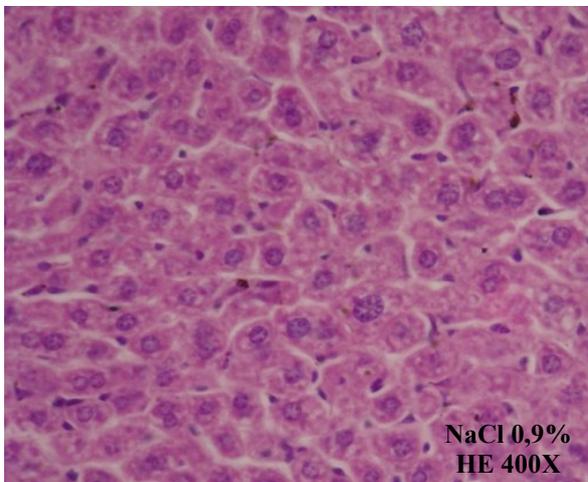


Figura 28 – Fotomicrografias de cortes histológicos (400x) do tumor de camundongos transplantados com tumor sarcoma 180 tratados por via intraperitoneal. A – Controle negativo (NaCl 0,9% ip.); B – Controle positivo (5-FU 10 mg/kg/dia ip.); C – *PGC* (25 mg/kg/dia ip.); D - *PGC* (25 mg/kg/dia ip.) + 5-FU (10 mg/kg/dia ip).

A



B

5-FU 10mg
HE 400X

C

PGC 25mg
HE 400X

D

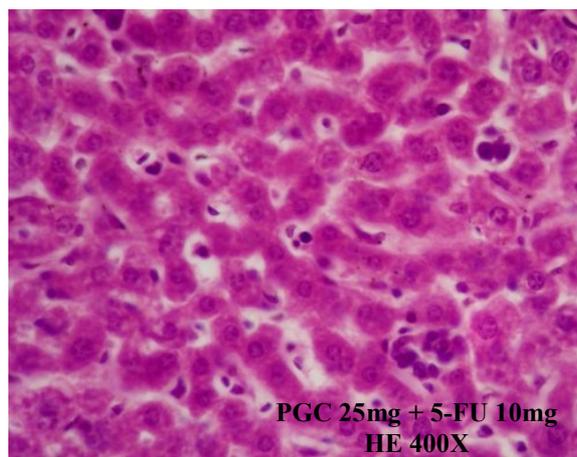
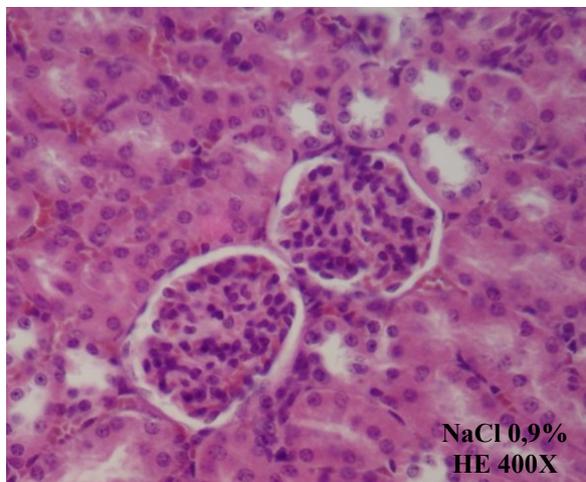


Figura 29 – Fotomicrografias de cortes histológicos (400x) do fígado de camundongos transplantados com tumor sarcoma 180 tratados por via intraperitoneal. A – Controle negativo (NaCl 0,9% ip.); B – Controle positivo (5-FU 10 mg/kg/dia ip.); C – *PGC* (25 mg/kg/dia ip.); D - *PGC* (25 mg/kg/dia ip.) + 5-FU (10 mg/kg/dia ip.).

A



B

5-FU 10mg
HE 400X

C

PGC 25mg
HE 400X

D

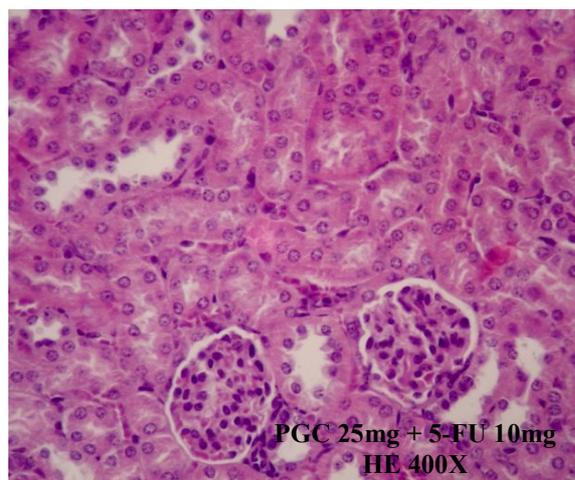


Figura 30 – Fotomicrografias de cortes histológicos (400x) do rim de camundongos transplantados com tumor sarcoma 180 tratados por via intraperitoneal. A – Controle negativo (NaCl 0,9% ip.); B – Controle positivo (5-FU 10 mg/kg/dia ip.); C – *PGC* (25 mg/kg/dia ip.); D - *PGC* (25 mg/kg/dia ip.) + 5-FU (10 mg/kg/dia ip).

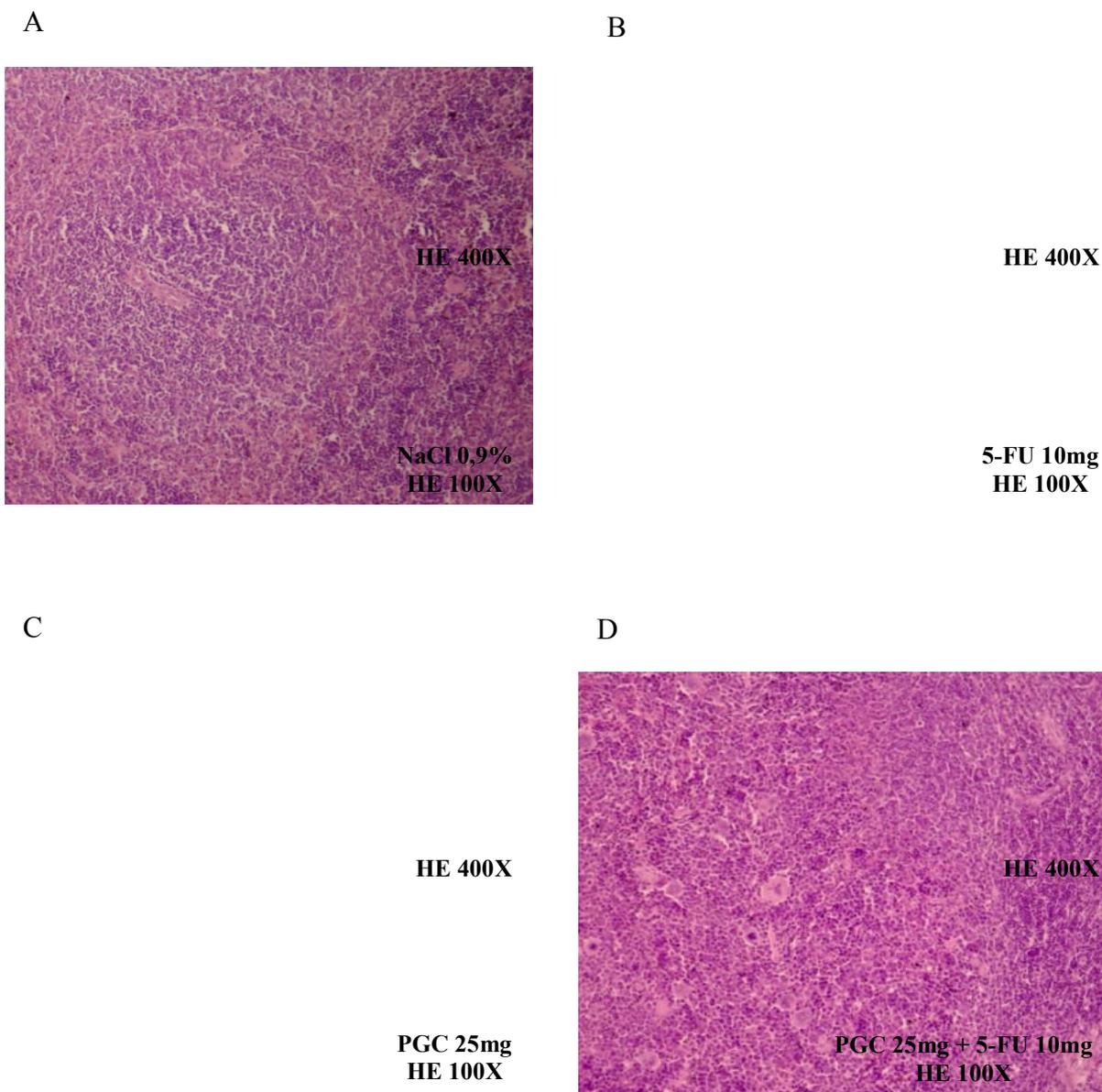


Figura 31 – Fotomicrografias de cortes histológicos (100 e 400x) do baço de camundongos transplantados com tumor sarcoma 180 tratados por via intraperitoneal. A – Controle negativo (NaCl 0,9% ip.); B – Controle positivo (5-FU 10 mg/kg/dia ip.); C – *PGC* (25 mg/kg/dia ip.); D - *PGC* (25 mg/kg/dia ip.) + 5-FU (10 mg/kg/dia ip).

4.11 Efeito do tratamento associado de PGC e 5-FU sobre parâmetros hematológicos e bioquímicos

O sangue periférico coletado do plexo retro-orbital de camundongos saudáveis e animais transplantados com tumor Sarcoma 180 foi utilizado para avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos dos animais submetidos ao tratamento simultâneo do polissacarídeo PGC com o quimioterápico 5-FU por via intraperitoneal.

A análise bioquímica do sangue dos camundongos transplantados com Sarcoma 180 pertencentes aos grupos controle negativo (NaCl 0,9%), controle positivo (5-FU 10 e 25 mg.kg⁻¹) e aos grupos experimentais tratados com o polissacarídeo PGC revelou que não houve alteração nos níveis séricos das enzimas alanina aminotransferase (ALT), também conhecida como transaminase glutâmico pirúvica (TGP) e aspartato aminotransferase (AST), também chamada de transaminase glutâmico oxalacética (TGO). Contudo, o tratamento simultâneo do polissacarídeo PGC o 5-FU ocasionou pequeno aumento nos níveis séricos de uréia (TABELA 9).

A análise hematológica dos animais transplantados com Sarcoma 180 tratados por via intraperitoneal revelou que a contagem total de leucócitos foi bastante reduzida nos animais tratados com 5-FU (10 e 25 mg.kg⁻¹) comparado ao grupo controle negativo transplantado com Sarcoma 180 (TABELA 10).

O tratamento dos animais com PGC (25 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ i.p.) apresentou contagem total de leucócitos um pouco maior que o observado para o controle negativo, além de aumentar a proporção de neutrófilos em relação aos linfócitos. Contudo, quando administrados concomitantemente PGC (25 mg.kg⁻¹) e 5-FU (10 mg.kg⁻¹), a contagem total de leucócitos não é reduzida acentuadamente como acontece após tratamento com 5-FU isoladamente. Esse resultado sugere que PGC foi capaz de prevenir parcialmente a leucopenia induzida pelo tratamento dos animais com 5-Fluorouracil.

Tabela 9 – Efeito do polissacarídeo extraído de *G. caudata* (PGC) sobre parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos transplantados com Sarcoma 180. Os animais foram tratados por via intraperitoneal durante sete dias consecutivos, a partir do primeiro dia após o implante tumoral.

Droga	Dose (mg kg⁻¹)	Uréia (mg dl⁻¹)	ALT (UI l⁻¹)	AST (UI l⁻¹)
<i>Camundongos saudáveis</i>				
0.9% NaCl	-	36.0 ± 4.7	54.0 ± 9.3	134.0 ± 10.9
<i>Camundongos transplantados com Sarcoma 180</i>				
0.9% NaCl	-	38.2 ± 4.8	58.2 ± 3.9 ^a	114.4 ± 9.5
5-FU	10	43.0 ± 2.3	38.4 ± 2.9 ^{a,b}	101.0 ± 13
5-FU	25	35.2 ± 3	38.7 ± 2 ^{a,b}	94.6 ± 11
PGC	25	29.2 ± 2.1	52.6 ± 3.7	90.4 ± 8.8
PGC + 5-FU	25 + 10	56.3 ± 1.7 ^a	44 ± 3.7	101.3 ± 10

Resultados expressos como média ± E.P.M. de cinco animais. ^a $P < 0,05$ comparado com camundongos saudáveis por ANOVA seguido por Student Newman Keuls. ^b $P < 0,05$ comparado com camundongos transplantados com Sarcoma 180 tratados com salina por ANOVA seguido por Student Newman Keuls.

Tabela 10 – Efeito do polissacarídeo extraído de *G. caudata* (PGC) sobre parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos transplantados com Sarcoma 180. Os animais foram tratados por via intraperitoneal durante sete dias consecutivos, a partir do primeiro dia após o implante tumoral.

Droga	Dose (mg.kg ⁻¹)	Plaquetas ¹	Leucócitos totais ²	Contagem diferencial de leucócitos (%)			
				Eosinófilo	Linfócito	Neutrófilo	Monócito
<i>Camundongos saudáveis</i>							
0.9% NaCl	-	8.3 ± 1.1	1.8 ± 0.1	0.0	94.8	4.3	1.0
<i>Camundongos transplantados com Sarcoma 180</i>							
0.9% NaCl	-	6.0 ± 0.7	1.8 ± 0.3	0.0	73.1 ^a	21.4 ^a	5.5 ^a
5-FU	10	3.3 ± 0.4 ^a	0.7 ± 0.1 ^{a,b}	0.0	89.0 ^b	8.2 ^b	2.8 ^b
5-FU	25	2.3 ^{a,b}	0,3± 0.0 ^{a,b}	0.0	91.7	4.5	3.0
PGC	25	7.5 ± 0.9 ^c	2.0±0.3 ^{a,b,c}	0.0	51.0 ^{a,b,c}	43.0 ^{a,b,c}	7.0 ^{a,c}
PGC	25						
+	+	10.8 ± 1 ^{b,c}	1.2±0.2 ^{a,b,c}	0.0	84.2	13.2	2.6 ^b
5-FU	10						

Resultados expressos como média ± E.P.M. de cinco animais. ¹(10⁵ células/mL); ² (10³ células/mL); ^a P < 0,05 comparado com camundongos saudáveis por ANOVA seguido por Bonferroni; ^b P < 0,05 comparado com camundongos transplantados com Sarcoma 180 por ANOVA seguido por Bonferroni; ^c P < 0,05 comparado com camundongos transplantados com Sarcoma 180 e 5-FU 25mg.kg⁻¹ por ANOVA seguido por Bonferroni.

5 DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do polissacarídeo da alga *Gracilaria caudata* (PGC)

O polissacarídeo gelificante da alga *Gracilaria caudata*, obtido por extração aquosa sob aquecimento apresentou rendimento de 32,8% com relação à massa seca inicial de alga utilizada. Esse resultado mostrou ser semelhante ao encontrado para polissacarídeos de algas do mesmo gênero (TABELA 11), que variaram de aproximadamente de 10 a 40% (CHAVES, 2008; ADRIAMANANTOANINA *et al.*, 2007; PRAIBOON *et al.*, 2006; MARINHO-SORIANO; BOURRET, 2005; FREIRE-PEREGRIN; MURANO, 2005; BURIYO; KIVAISI, 2003; MELO *et al.*, 2002; MARINHO-SORIANO, 2001; MARINHO-SORIANO *et al.*, 1999).

O percentual de nitrogênio no polissacarídeo PGC foi de 1,4%, correspondendo a 8,7% de proteínas. As proteínas presentes na amostra são contaminantes provenientes do processo de extração dos polissacarídeos. Contudo, esses contaminantes não impossibilitaram a elucidação da estrutura química de PGC. Esse valor está próximo do teor de nitrogênio encontrado para as galactanas isoladas das algas *Gracilaria birdiae*, igual a 7,6% (MACIEL *et al.*, 2008). O teor de proteínas encontrado na literatura é bastante variável, oscilando desde 3,22% para *G. bursa-pastoris* (MARINHO-SORIANO; BOURRET, 2003) e 3,97% para *G. gracilis* (MARINHO-SORIANO; BOURRET, 2003) até 18,2% para *Gracilaria dura* (MARINHO-SORIANO; BOURRET, 2005) e 29,8% para *Gracilaria gracilis* (RODRÍGUEZ *et al.*, 2009).

O grau de sulfatação do polissacarídeo extraído de *G. caudata* (PGC) foi determinado a partir das porcentagens de enxofre (S%) e carbono (C%) utilizando a equação 1. Tal equação foi proposta por Melo *et al.* (2002) e baseia-se na estrutura da agarobiose, dissacarídeo básico formador das galactanas do tipo ágar (ARAKI, 1966, *apud* LAHAYE, 2001; USOV, 1998). Os percentuais de enxofre (S%) e carbono (C%) encontrados foram 1,0 e 35,88%, respectivamente. O grau de substituição por sulfato (grau de sulfatação) calculado foi igual a 0,13. A quantidade de sulfato apresentada por PGC foi menor que o observado para os polissacarídeos de outras espécies de *Gracilaria*. O ágar proveniente da alga *Gracilaria sjoestedtii* apresentou 2,3% de sulfato (CRAIGIE *et al.*, 1984) enquanto o conteúdo de sulfato

demonstrado para *G. domingensis* e *G. mammillaris* foi de 7,6 e 8.9%, respectivamente (VALIENTE *et al.*, 1992).

Tabela 1 – Rendimento de polissacarídeos extraídos de algas do gênero *Gracilaria*.

Espécie	Coleta	Rendimento (%)	Fonte bibliográfica
<i>G. corticata</i>	Madagascar	21,8	Adriamanantoanina <i>et al.</i> , 2007
<i>G. birdiae</i>	Brasil	56	Chaves, 2008
<i>Gracilaria sp.</i>	Japão	39,4	Praiboon <i>et al.</i> , 2006
<i>G. fisheri</i>	Tailândia	13,3	Praiboon <i>et al.</i> , 2006
<i>G. edulis</i>	Tailândia	10,9	Praiboon <i>et al.</i> , 2006
<i>G. dura</i>	França	32 – 35	Marinho-Soriano; Bourret, 2005
<i>G. cervicornis</i>	México	39,3	Freire-Peregrin; Murano, 2005
<i>G. salicornia</i>	Tanzânia	30,2%	Buriyo; Kivaisi, 2003
<i>G. cornea</i>	Brasil	21,4	Melo <i>et al.</i> , 2002
<i>G. cervicornis</i>	Brasil	11 – 20	Marinho-Soriano, 2001
<i>G. bursa-pastoris</i>	França	34,8	Marinho-Soriano, 2001
<i>G. dura</i>	França	33,5	Marinho-Soriano, 2001
<i>G. gracilis</i>	França	30,0	Marinho-Soriano, 2001
<i>G. bursa-pastoris</i>	França	36,5 – 38,3	Marinho-Soriano <i>et al.</i> , 1999
<i>G. gracilis</i>	França	11,1 – 18,7	Mollet; Rahaoui; Lemoine, 1998

A massa molar do polissacarídeo de *Gracilaria caudata* (PGC) foi estimada através de cromatografia de permeação em gel, onde a massa molar do pico foi estimada em $2,5 \times 10^5$ g/mol ou 250 kDa. Elevados pesos moleculares foram encontrados para outros polissacarídeos sulfatados de algas marinhas, com valores iguais ou superiores a 100 kDa (POMIN, 2010).

Segundo Stanley (1995), polissacarídeos naturais são polímeros que não apresentam massas molares precisamente definidas. Esses compostos são polidispersos, pois possuem massas molares médias, representando uma distribuição de espécies moleculares quase idênticas em estrutura, variando apenas no tamanho da cadeia. O polissacarídeo PGC também apresentou perfil polidisperso. O cromatograma de PGC revelou a presença de um único pico,

comportando-se como um sistema homogêneo. Contudo, o pico observado possui base larga, refletindo a variação no tamanho dos polissacarídeos extraídos de *G. caudata*, formados por repetições de β -D-galactose e α -L-galactose. Esse resultado contrasta com o comportamento heterogêneo observado para os polissacarídeos naturais das macroalgas vermelhas *Gracilaria cornea* (MELO *et al.*, 2002), *Gracilaria Birdiae* (CHAVES, 2008), *Gracilaria domingensis* (MENDES, 2004) e *Botryocladia occidentalis* (FARIAS *et al.*, 2000), os quais apresentaram múltiplos picos.

A espectroscopia de Infravermelho é um método instrumental simples e rápido para a investigação de grupos funcionais em moléculas orgânicas. O espectro infravermelho de um composto químico é bastante característico para a molécula em questão e pode ser utilizado como assinatura química da mesma. Por isso, a espectroscopia na região do infravermelho possui extensa aplicação na identificação de compostos químicos (SOLOMONS, 2001).

O espectro de infravermelho do polissacarídeo PGC revelou bandas com números de onda característicos de agarocolóides (1375, 1258, 1075, 930, 891 cm^{-1}), como evidenciado pela Tabela 12. A banda com número de onda de 1075 cm^{-1} é atribuída ao esqueleto carbônico de polissacarídeos do tipo galactana (PRADO-FERNÁNDES *et al.*, 2003; MOLLET; RAHAOUI; LEMOINE, 1998), enquanto a banda com número de onda de 930 cm^{-1} encontrada no espectro de PGC é indicativa da presença de açúcar do tipo 3,6-anidrogalactose (ROCHAS; LAHAYE; YAPHE, 1986; PRADO-FERNANDES *et al.*, 2003; CHOPIN; WHALEN, 1993).

A partir do espectro de infravermelho é possível deduzir que o polissacarídeo PGC pertence ao grupo dos ágaros, em função da banda observada com número de onda 891 cm^{-1} (MOLLET; RAHAOUI; LEMOINE, 1998), além de evidenciar a presença de grupamentos sulfato na molécula, percebidos pelas bandas com números de onda de 1258 cm^{-1} (ROCHAS; LAHAYE; YAPHE, 1986; PRADO-FERNANDES *et al.*, 2003; CHOPIN; WHALEN, 1993) e 1375 cm^{-1} (ROCHAS; LAHAYE; YAPHE, 1986; GROSEV; BOZAC; PUPPELS, 2001). A baixa intensidade dessas bandas sugere que PGC possui um pequeno grau de sulfatação. Esse resultado foi confirmado pelo grau de sulfatação (0,13) determinado por microanálise elementar.

A região entre 800 e 850 cm^{-1} é usada para inferir a posição dos grupos sulfato em polissacarídeos do tipo ágar. As bandas em 845, 830, 805 e 820 cm^{-1} podem ser atribuídas, respectivamente, a 4-*O*-sulfato, 2-*O*-sulfato, sulfatação em C-2 de 3,6-anidro-L-galactose e 6-*O*-sulfato da unidade de D-galactose (ROCHAS; LAHAYE; YAPHE, 1986; LAHAYE;

YAPHE, 1989; CHOPIN; WHALEN, 1993; MOLLET *et al.*, 1998; PRADO-FERNANDES *et al.*, 2003; VILLANUEVA, 2010).

O polissacarídeo de *G. caudata* não apresentou nenhum sinal resolvido em 845, 830 e 805 cm^{-1} indicando a ausência de sulfatação em C-4 e C-2 dos resíduos de D-galactose. Apesar de ser considerado raro, esse padrão de sulfatação foi encontrado em ágares de diversas espécies de *Gracilaria* (MURANO *et al.*, 1995; MURANO *et al.*, 1992; MOLLET; RAHAOUI; LEMOINE, 1998; VILLANUEVA; MONTAÑO; VILLANUEVA; ROMERO, 1999). A pequena quantidade de grupamentos sulfato presente na galactana de *G. caudata* é uma característica compartilhada com outros agarocolóides responsável pelo aumento de suas propriedades reológicas (MURANO, 1995; USOV, 1998; LAHAYE, 2001).

Tabela 12 – Atribuições no espectro do infravermelho para polissacarídeos de algas marinhas.

Número de onda (cm^{-1})	Atribuições	Referência
1653	(COO ⁻), Amida I	a
1640	H ₂ O	c
1562	Amida II	a
1380 – 1355	Éster Sulfato	b, c
1250 – 1240	O = S = O (estiramento assimétrico)	b, c, d
1080 – 1040	Esqueleto de galactanas (C - O + C - OH)	b, e
930	C - O - C de 3,6-anidrogalactose	b, c, d
900 – 890	Banda específica do ágar	E
850	Galactose-4-sulfato	F
820 – 810	Galactose-6-sulfato	b, c, d
740 – 725	C - O - C de ligação glicosídica	e
716	C - O - C de ligação glicosídica	e
580	O = S = O	b

a: Grosev; Bozac; Puppels, 2001.

b: Prado-Fernández *et al.*, 2003.

c: Rochas; Lahaye; Yaphe, 1986.

d: Chopin; Whalen, 1993.

e: Mollet; Rahaoui, Lemoine, 1998.

f: Chopin ; Kerin ; Mezerolle. 1999.

A região em 820 cm^{-1} pode ser atribuída a sulfatação em C-6 dos resíduos de galactose. Todavia, a baixa intensidade do sinal no espectro de FT-IR apresentado por PGC pode ser devido à baixa quantidade de sulfato nessa posição. O padrão de sulfatação de polímeros tipo ágar de algas do gênero *Gracilaria* é dominado por esterificação do C-6 dos resíduos de L-galactose (MURANO, 1995). A análise do polissacarídeo PGC por espectroscopia de Infravermelho sugere que grupos sulfato ocorrem somente em C-6 dos resíduos de α -L-galactopirranose, como um precursor de 3,6-anidro- α -L-galactose, o qual é convertido para a forma anidro por enzimas sulfohidrolases (REES, 1961).

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C é uma técnica eficiente para analisar as características estruturais de polissacarídeos de algas marinhas (USOV, 1980; USOV, 1998). Neste trabalho o polissacarídeo de *G. caudata* foi analisado por RMN em uma e duas dimensões.

O espectro de RMN de ^1H de PGC revelou um padrão de metilação com sinais resolvidos em 3.41 e 3.5 ppm, atribuídos a prótons de grupamentos metil ligados a C-6 de β -D-galactose (G6M) e C-2 de 3,6-anidrogactose (LA2M), respectivamente. A ocorrência de metil éter em C-6 de β -D-galactose e C-2 de 3,6-anidrogactose têm sido amplamente descrita para diferentes espécies de *Gracilaria*, com o grau de substituição variando entre as espécies (MAZUMDER et al., 2002; DUCKWORTH et al., 1971; LAHAYE et al., 1986; CRAIGIE, 1990; FURNEAUX; MILLER; STEVENSON, 1990). Os resíduos G6M e LA2M foram observados como principais unidades repetitivas em ágaes extraídos de diferentes espécies, como *G. arcuata* (MONTAÑO; VILLANUEVA; ROMERO, 1999) e *G. tenuistipitata* (LAHAYE et al., 1986; MONTAÑO; VILLANUEVA; ROMERO, 1999).

O sinal em 5.13 ppm presente no espectro de RMN de ^1H de PGC foi assinalado como 3,6- α -L-anidrogactose (LA) enquanto o sinal em 4.56 foi atribuído a β -D-galactose (G) ligado a LA (MACIEL et al., 2008). Nenhum sinal foi observado em 4.43 ppm, o qual é representativo de H-1 de β -D-galactose ligado a α -L-galactose-6-sulfato (L-6S). O resíduo L-6S foi encontrado no experimento de FT-IR, apesar da baixa intensidade do pico.

O sinal intenso em 1.44 ppm foi atribuído a prótons do grupo metil do acetal de ácido pirúvico ligado nas posições C-4 e C-6 dos resíduos de β -D-galactose (IZUMI, 1973; MURANO et al., 1992; MURANO, 1995). A presença de sinal em 5.22 ppm foi descrita para o próton anomérico do resíduo de L-galactopirranose sendo desprotegido pelo piruvato adjacente (MURANO et al., 1992). Ácido pirúvico é um substituinte pouco frequente em agarocolóides de espécies de *Gracilaria* (DUCKWORTH et al., 1971; MURANO et al., 1992;

MURANO, 1995). No entanto, esse grupamento parece estar presente em grande quantidade em PGC devido à intensidade do sinal apresentado no espectro de ^1H RMN.

O espectro de RMN de ^{13}C do polissacarídeo de *G. caudata* apresentou um padrão típico de ágar com 12 sinais, atribuídos aos carbonos oriundos da agarobiose (USOV *et al.*, 1980; FREILE-PELEGRÍN; MURANO, 2005). Os valores obtidos foram comparados com dados da literatura, como os assinalamentos de referência descritos na Tabela 13. Os sinais em 102.5, 70.3, 82.3, 68.8, 75.4 e 61.5 ppm correspondem aos carbonos C (1-6) da unidade β -D-galactose (G), enquanto os sinais com concentrações de 98.4, 69.5, 80.2, 77.5, 75.7 e 69.9 ppm correspondem aos carbonos C (1-6) da unidade 3,6- α -L-anidrogalactose (LA). Sinais adicionais no espectro revelam a presença de grupos substituintes na estrutura repetitiva da agarobiose.

Tabela 13 – Assinalamentos de referência do espectro de RMN de ^{13}C .

Unidade de resíduo		Deslocamentos químicos de ^{13}C						
		C1	C2	C3	C4	C5	C6	Me
Usov <i>et al.</i> (1980)								
(G-LA)n	G	102.3	70.1	82.2	68.6	75.2	61.3	
	LA	98.2	69.7	80.0	77.2	75.5	69.7	
G6M-4S		102.4	70.0	80.0	71.5	70.8	70.0	59.0
Lahaye <i>et al.</i> (1989)								
(G-LA)n	G	102.4	70.2	82.2	68.8	75.3	61.4	
	LA	98.3	69.9	80.1	77.4	75.7	69.4	
(G'-L6S)	G'	103.7	69.8	81.2	69.1	75.9	61.8	
	L6S	101.3	69.3	71.1	79.1	70.3	67.9	
Miller; Furneaux (1997)								
(G6M-A)	G6M	102.3	70.1	82.1	69.0	73.5	71.7	59.1
	LA	98.2	69.9	80.1	77.3	75.5	69.3	
Lai; Huang; Lii (1998)								
(G-LA)n	G	102.4	70.2	82.3	68.7	75.3	61.4	
	LA	98.2	69.9	80.1	77.3	75.6	69.4	
Valiente <i>et al.</i> (1992)								
(G-LA)n	G	102.4	70.1	82.1	68.4	75.6	61.4	
	LA	98.3	69.8	80.1	77.4	75.6	69.3	

A presença de um sinal em 61.5 ppm foi assinalado como C-6 de β -D-galactose ligado a α -L-galactose-6-sulfato (ANDRIAMANANTOANINA *et al.*, 2007). Essa sulfatação foi confirmada no experimento de FT-IR através de uma pequena banda indicando que o precursor biológico do resíduo LA deve estar presente no polissacarídeo de *G. caudata*.

As ressonâncias em 73.6 e 71.7 ppm no espectro de ^{13}C RMN foram atribuídos aos carbonos C-5 e C-6 dos resíduos de β -D-galactose-6-O-metil (USOV *et al.*, 1983; LAHAYE *et al.*, 1986; MURANO, 1995; FREILE-PELEGRÍN, Y.; MURANO, 2005). Em adição, o sinal em 25.7 indica a presença de ácido pirúvico neste polissacarídeo (MURANO *et al.*, 1992). Esse resultado corrobora com os dados obtidos no experimento de ^1H RMN e com os resultados de DEPT 135 e RMN de HSQC (em duas dimensões) descritos a seguir.

O polissacarídeo PGC não apresentou sinal em 61.7 ppm, descrito para resíduos de 4-O-metil- α -L-galactose (BIRD *et al.*, 1987), demonstrando a ausência de grupamentos metil nessa posição. Esse resulta contrasta com os dados encontrados para os ágaros das espécies *G. cervicornis* (FREILE-PELEGRÍN, Y.; MURANO, 2005) e *G. verrucosa* (BIRD, 1990). Em adição, a falta de sinais em 97.51, 102.87 e 77.77 ppm, atribuídos a β -D-galactose-4-sulfato, indica que PGC também não apresenta sulfatação em C-4 dos resíduos de β -D-galactose (ANDRIAMANANTOANINA *et al.*, 2007).

O experimento de DEPT 135 de ^{13}C foi utilizado para investigar a presença de grupos de oximetileno no polissacarídeo de *G. caudata*, considerando que a sequência de sinais dos carbonos ligados a dois prótons apresentam amplitude oposta aos carbonos CH e CH_3 .

O espectro de DEPT 135 do polissacarídeo PGC revela a presença de 4 sinais de CH_2 . Os deslocamentos químicos encontrados foram 69,5 ppm, atribuído a 3,6-anidro- α -L-galatopiranoose (LA); 61,2 ppm, atribuído ao resíduo β -D-galatopiranoose ligado a 3,6-anidro- α -L-galatopiranoose (G-LA), enquanto os sinais em 65.4 e 61.5 foram descritos para α -L-galatopiranoose-6-sulfato (L-6S) e β -D-galatopiranoose ligado a α -L-galatopiranoose-6-sulfato (G'-L6S), respectivamente (MACIEL *et al.*, 2008). Esse espectro também mostrou um sinal em 59.2 ppm, indicando a presença de resíduos de monossacarídeos metilados no polissacarídeo. Esse resultado está de acordo com os dados encontrados por RMN de ^1H e ^{13}C , onde resíduos de β -D-galactose-6-O-metil (G-6M) e 3,6-anidrogalactose-2-O-metil (LA2M) foram descritos.

O espectro de HSQC de ^1H e ^{13}C foi utilizado para melhor caracterizar o polissacarídeo de *G. caudata*. Esse experimento correlaciona os carbonos anoméricos com seus respectivos prótons. Os resultados obtidos no experimento de HSQC (TABELA 4)

demonstram que o polissacarídeo PGC é uma galactana tipo ágar, formada principalmente por repetições dos resíduos de (\rightarrow 3) β -D-galactopiranosose e (\rightarrow 4)-3,6-anidro- α -L-galactose, com substituições desses monossacarídeos por β -D-galactopiranosose-6-metil (G-6M), 3,6-anidro- α -L-galactose-2-metil (LA2M) e α -L-galactose-6-sulfato (L-6S), além de apresentar substituições por 4,6-O-(1-carboxietilideno) ou acetal de ácido pirúvico em sua unidade de β -D-galactopiranosose. Baseado nos resultados obtidos, a estrutura química do polissacarídeo PGC é apresentada na Figura 32.

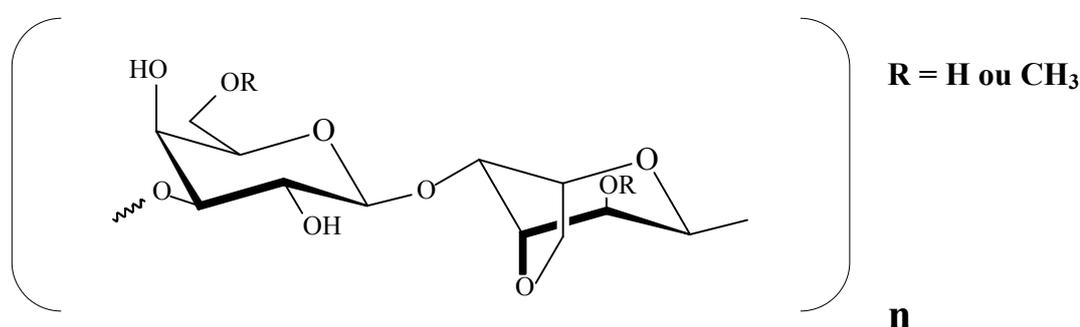


FIGURA 32. Estrutura básica repetitiva do polissacarídeo PGC extraído da alga *Gracilaria caudata*. O polissacarídeo é formado por repetições dos resíduos de (1 \rightarrow 3)- β -D-galactopiranosose e (1 \rightarrow 4)- α -L-anidrogalactopiranosose.

5.2 Efeito antitumoral do polissacarídeo PGC extraído da alga *Gracilaria caudata*

Apesar dos avanços obtidos no entendimento das neoplasias malignas, o câncer ainda representa a segunda principal causa de mortalidade por doença no mundo, sendo diagnosticados mais de 10 milhões de novos casos a cada ano (SCHOTTENFELD; BEEBEB-DIMMER, 2005).

A busca por polissacarídeos como agentes antitumorais tem se intensificado nas últimas décadas devido às suas propriedades terapêuticas e à sua baixa toxicidade, diferentemente dos efeitos adversos causados pela quimioterapia e radioterapia (TZIANABOS, 2000; PAULSEN, 2001; SCHEPETKIN; QUINN, 2006). Muitas drogas

potencialmente antitumorais apresentam consideráveis efeitos colaterais e sua toxicidade contra células normais limita o seu uso clínico. Assim, a descoberta de novas drogas ativas contra tumores com baixa toxicidade associada e poucos efeitos colaterais se tornou um importante alvo da ciência biomédica (OOI; LIU, 2000).

Vários polissacarídeos tem demonstrado ação imunomodulatória. Esses compostos são capazes de interagir com o sistema imune e modular aspectos específicos da resposta do hospedeiro (TZIANABOS, 2000). Apesar de o mecanismo de ação dessas substâncias não ter sido completamente elucidado, provavelmente um dos principais mecanismos envolve a indução não específica do sistema imune (SCHEPETKIN; QUINN, 2006; TZIANABOS, 2000).

Neste trabalho o potencial antitumoral do polissacarídeo extraído da alga marinha vermelha *Gracilaria caudata* (PGC) foi avaliado. O teste do MTT foi utilizado para avaliar a proliferação celular e determinar a citotoxicidade de PGC sobre as linhagens de células tumorais humanas SF-295, HL-60, HCT-8 e MDA-MB-435.

Esse teste é amplamente utilizado para avaliar a proliferação celular e determinar a citotoxicidade de compostos em estudos de atividade anticâncer devido à possibilidade de mensurar células viáveis (BERRIDGE; TAN, 1993; BERRIDGE *et al.*, 1996; BERNAS; DOBRUCKI, 2002; BERRIDGE; HERST; TAN, 2005). Esta análise colorimétrica permite quantificar indiretamente células viáveis, baseado na redução do sal brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-diphenil-2H-tetrazolium (MTT), um composto de cor amarela, a um produto denominado formazan, de coloração azul (MOSMANN, 1983). A maior parte da biorredução do MTT envolve a redução do nucleotídeo NADH e, em menor extensão, NADPH (BERRIDGE; TAN, 1993; BERRIDGE *et al.*, 1996; BERNAS; DOBRUCKI, 2002; BERRIDGE; HERST; TAN, 2005).

O polissacarídeo PGC não apresentou citotoxicidade direta sobre as células testadas até a concentração de $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ mas foi capaz de inibir fortemente o crescimento tumoral em animais transplantados com Sarcoma 180. A citotoxicidade direta de PGC sobre as células neoplásicas de Sarcoma 180 não foi avaliado devido à impossibilidade de cultivar tais células *in vitro*. Resultado semelhante foi encontrado para o alginato obtido da alga parda *Sargassum vulgare* (SOUSA *et al.*, 2007) e para o polissacarídeos extraídos das algas marinhas vermelhas *Chondrus ocellatus* (ZHOU *et al.*, 2004) e *Champia feldmannii* (LINS *et al.*, 2009). A habilidade em reduzir o crescimento tumoral *in vivo* desses polissacarídeos de ocorrência natural em algas marinhas tem sido atribuída ao reconhecimento desses compostos

por receptores endógenos envolvidos na resposta imune do hospedeiro (KODAMA; MURATA; NANBA, 2004; TAYLOR; GORDON; MARTINEZ-POMARES, 2005; IWASAKI; MEDZHITOV, 2004; TZIANABOS, 2000; SCHEPETKIN; QUINN, 2006; LEUNG *et al.*, 2006; CZOP; KAY, 1991; ROSS; VETVICKA, 1993; FUJITA; MATSUSHITA; ENDO, 2004; LI *et al.*, 2004; BROWN *et al.*, 2003; MEANS; GOLENBOCK; FENTON, 2000; ZHANG *et al.*, 1997; SHIN *et al.*, 2002).

O efeito do polissacarídeo PGC sobre o crescimento de células tumorais *in vivo* foi avaliado através de modelo experimental utilizando células tumorais de Sarcoma 180. O polissacarídeo PGC apresentou atividade antitumoral em animais transplantados com Sarcoma 180 em ambas as vias de administração oral e intraperitoneal. Quando administrado por via oral, foi encontrado percentual de inibição de 37% para a concentração de 50 mg.kg⁻¹, sendo considerado o valor máximo de inibição para o tratamento por via oral. A administração de quimioterápicos por via oral é menos agressiva, indolor e minimiza os riscos de infecção. Esse resultado é bastante expressivo considerando a invasividade ocasionada pela quimioterapia realizada com drogas injetáveis, além de proporcionar maior conforto para os indivíduos submetidos ao tratamento.

O tratamento com PGC por via intraperitoneal dos animais transplantados com Sarcoma 180 resultou em percentuais de inibição tumoral de 47% para a dose de 25 mg.kg⁻¹ e 53,5% para a concentração de 50 mg.kg⁻¹. Esses resultados sugerem que o tratamento dos animais com PGC não apresentou efeito dose dependente ou ainda que o efeito antitumoral máximo foi atingido já na dose de 25 mg.kg⁻¹.

Vários polissacarídeos de macroalgas marinhas apresentaram atividade antitumoral em modelos experimentais (COSTA *et al.*, 2011; SYNYSYA *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 2010; HYUN *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2008; YE *et al.*, 2005; AISA *et al.*, 2004; RELIGA *et al.*, 2000; RIOU *et al.*, 1996; ZHUANG *et al.*, 1995; ELLOUALI *et al.*, 1993; COOMBE *et al.*, 1987).

A fucoidana isolada da alga parda *Cladosiphon okamuranus tokida* inibiu o crescimento de 13 linhagens de células tumorais, obtendo a maior ação antiproliferativa contra carcinoma hepatocelular, colangiocarcinoma e carcinoma de vesícula biliar (FUKAHORI, *et al.*, 2008). Os polissacarídeos extraídos das algas pardas *Sargassum kjellmanianum* (YAMAMOTO *et al.*, 1984) e *Sargassum vulgare* (SOUSA *et al.*, 2007) demonstraram grande potencial antitumoral ao inibir o crescimento de células tumorais em animais transplantados com Sarcoma 180. Os polissacarídeos extraídos da alga *Sargassum*

pallidum apresentaram elevada atividade antitumoral contra as linhagens de células tumorais HepG2, A549 e MGC-803 (YE *et al.*, 2008), enquanto as fucanas isoladas da alga *Sargassum thunbergii* apresentaram atividade antitumoral e antimetastática (ITOH *et al.*, 1995).

Zhou *et al.* (2004) testaram o efeito antitumoral *in vivo* de carragenanas de diferentes pesos moleculares isoladas da alga *Chondrus ocellatus* contra os tumores Sarcoma 180 e H22 em animais transplantados. Essas moléculas foram capazes de aumentar o peso médio e a polpa branca do baço dos animais, além de elevar a atividade proliferativa de linfócitos e células NK. Uma galactana sulfatada do tipo carragenana obtida da alga vermelha *Solieria chordalis* induziu o aumento da fagocitose por neutrófilos e das citotoxicidades mediadas por células NK e citotoxicidade celular dependente de anticorpo, além de estimular a proliferação de linfócitos, demonstrando potencial para tratamento imunoterápico e anticâncer (STEPHANIE *et al.*, 2010).

A carragenana de baixo peso molecular isolada da alga *Kappaphycus striatum* foi capaz de inibir o crescimento de Sarcoma 180 em animais transplantados. Esse composto aumentou a fagocitose por macrófagos, o peso relativo do baço e a proliferação esplênica de linfócitos e anticorpos, potencializou a atividade de células NK e elevou os níveis séricos de IL-12 e TNF- α , sugerindo que seu efeito antitumoral é exercido pela indução do sistema imune do hospedeiro (YUAN *et al.*, 2006).

Como previsto, o antineoplásico 5-fluorouracil também apresentou atividade antitumoral frente aos animais transplantados com Sarcoma 180, com percentuais de inibição de 37 e 74% para as doses de 10 e 25 mg.kg⁻¹.dia⁻¹, respectivamente. O 5-fluorouracil (5-FU) é um quimioterápico antimetabólico amplamente utilizado na terapia contra o câncer. Por isso, a resposta antitumoral desse composto foi utilizada como controle positivo durante os experimentos. O 5-FU é um análogo do nucleotídeo uracila com um átomo fluorado substituindo um hidrogênio na posição C-5 que age inibindo processos biossintéticos essenciais e sendo incorporado em macromoléculas, tais como DNA e RNA. Sua incorporação em metabólitos ativos bloqueia a síntese de RNA e a ação da enzima timidilato sintase, causando morte celular (LONGLLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003).

O tratamento dos camundongos transplantados com 5-FU (25 mg.kg⁻¹) resultou em redução da massa relativa desse órgão, quando comparado com animais transplantados com Sarcoma 180 tratados com NaCl 0,9%. A análise histopatológica dos camundongos transplantados com Sarcoma 180 revelou também uma diminuição da polpa branca do baço

com congestão dos folículos linfóides, demonstrando o efeito imunossupressor clássico dessa substância.

Muitas drogas quimioterápicas possuem notável efeito colateral imunossupressor tanto diretamente, pela morte ou inativação das células efectoras contra tumores, quanto indiretamente, pela anergia ou paralisia do sistema imune (ZITVOGEL *et al.*, 2008). O efeito imunossupressor de algumas drogas antitumorais é tão acentuado que alguns quimioterápicos usados em oncologia são também utilizados como imunossupressores para o tratamento de doenças autoimunes severas, como é o caso da ciclofosfamida (WEINER; COHEN, 2002) e do metotrexato (GENESTIER *et al.*, 1998), os quais enfraquecem as funções efectoras e proliferativas das células T periféricas por promoção de apoptose e deleção clonal.

Neste trabalho pôde-se observar que a resposta antitumoral apresentada pelos animais transplantados com Sarcoma 180 tratados com PGC por via intraperitoneal foi acompanhada de aumento da massa úmida relativa do baço dos animais, em contraste com o resultado observado para o 5-FU. Em adição, a análise histopatológica desse órgão nos grupos experimentais submetidos ao tratamento com PGC por via intraperitoneal mostrou desorganização da arquitetura esplênica com hiperplasia das polpas branca e vermelha, havendo mistura entre as mesmas, com presença de numerosos megacariócitos de permeio.

As alterações observadas sugerem que o polissacarídeo PGC administrado por via intraperitoneal apresentou efeito potencializador da resposta imune desses indivíduos. Concordantemente, a massa relativa do baço dos animais transplantados com Sarcoma 180 submetidos ao tratamento associado de PGC (25 mg.kg⁻¹) e 5-FU (10 mg.kg⁻¹) mostrou ser 80% maior que aquela encontrada para os grupos administrados com 5-FU isoladamente e com NaCl 0,9% (controle negativo).

A contagem total de leucócitos nos animais transplantados com Sarcoma 180 tratados com solução salina (controle negativo) não diferiu dos valores encontrados para os animais saudáveis. Nos grupos tratados com PGC por via intraperitoneal nas doses de 25 e 50 mg.kg⁻¹ foi possível observar pequeno aumento da contagem total de leucócitos, enquanto os animais tratados com o quimioterápico 5-FU nas doses de 10 e 25 mg.kg⁻¹ mostraram forte redução da contagem total de leucócitos comparado com o controle negativo (P < 0,05), com maior intensidade na dose mais alta.

A contagem diferencial de leucócitos dos animais tratados com PGC por via intraperitoneal mostrou que houve grande aumento da porcentagem de neutrófilos em relação aos demais glóbulos brancos. Os neutrófilos, juntamente com outras células da imunidade

inata como células dendríticas, células NK e macrófagos são a primeira linha de defesa contra patógenos e células neoplásicas (DE VISSER; EICHTEN; COUSSENS, 2006; HUSSAIN; HARRIS, 2007; COLOTTA *et al.*, 2009). Esse resultado indica que houve estimulação do sistema humano hospedeiro após administração de PGC.

Os animais que receberam o tratamento associado de PGC (25 mg.kg⁻¹) com 5-fluorouracil na dose de 10 mg.kg⁻¹ não exibiram depleção intensa de leucócitos, o que sugere que o polissacarídeo PGC administrado por via intraperitoneal foi capaz de reverter o quadro de leucocitopenia induzido pelo quimioterápico. Resultados semelhantes foram obtidos para os polissacarídeos de *Chondrus ocellatus* (ZHOU *et al.*, 2005; ZHOU *et al.*, 2005), *Champia feldmannii* (LINS *et al.*, 2009) e *Kappaphycus striatum* (YUAN *et al.*, 2006) que foram capazes de potencializar o efeito antitumoral do 5-FU, prevenindo a imunodepressão promovida pelo quimioterápico.

Em adição, quando os animais transplantados com Sarcoma 180 foram tratados simultaneamente com o polissacarídeo PGC e o agente quimioterápico 5-fluorouracil, a taxa de inibição tumoral aumentou significativamente de 37% para o 5-FU na dose de 10 mg.kg⁻¹ para 70,7% após tratamento associado das duas substâncias. Esse resultado é surpreendente em virtude da baixa toxicidade associada ao polissacarídeo PGC, podendo a administração concomitante dessa substância com agentes terapêuticos clássicos como os quimioterápicos antimetabólicos ser utilizada com o intuito de reduzir os efeitos adversos indesejáveis e aumentar a eficácia terapêutica.

Como o polissacarídeo PGC não apresentou efeito citotóxico direto sobre as células tumorais testadas e juntamente com a observação do efeito antitumoral de PGC administrado por via intraperitoneal estar acompanhado de aumento da massa úmida do baço com hiperplasia dos folículos linfoides e aumento na produção de leucócitos totais, acredita-se que o efeito terapêutico desse composto esteja relacionado diretamente com a habilidade em estimular o sistema imune do hospedeiro.

Apesar de o tratamento com PGC por via oral não ter induzido aumento da massa relativa do baço, alterações histológicas como hiperplasia de folículos linfoides, desorganização da polpa branca e presença de megacariócitos de permeio sugerem que o tratamento por via oral de PGC também foi capaz de estimular o sistema humano dos camundongos transplantados com Sarcoma 180. A contagem total e diferencial de leucócitos dos animais tratados por via oral não foi realizada. Portanto, não é possível saber se houve alteração nesses parâmetros hematológicos.

Estudos indicam que as células mielóides são o principal alvo estimulatório dos polissacarídeos imunomoduladores, possivelmente devido à participação de macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e monócitos tanto na imunidade inata quanto na adquirida (LEUNG *et al.*, 2006; LIM *et al.*, 2004; CHUN *et al.*, 2001). Além de melhorar a resposta imune do hospedeiro, os polissacarídeos BRMs podem inibir a apoptose (HWANG *et al.*, 2005), ativar as vias clássica e alternativa do complemento (GLOVSKY *et al.*, 1983), agir como mitogênicos para macrófagos, neutrófilos, células T, B e células NK e estimular a fagocitose e o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e secreção de citocinas (GARCIA-LORA *et al.*, 2003; HAN *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 1997; SHIN *et al.*, 2002; KODAMA; MURATA; NANBA, 2004; WANG *et al.*, 1997; CHIHARA, 1992).

Com o intuito de avaliar o perfil toxicológico da administração do polissacarídeo PGC sobre os animais transplantados com Sarcoma 180, foi realizada a avaliação histopatológica do fígado e rim dos animais.

Os animais tratados com 5-FU exibiram moderada a intensa tumefação celular de hepatócitos, dilatação dos sinusóides e esteatose microvesicular e macrovesicular. A esteatose hepática é o acúmulo de gordura nos hepatócitos e está frequentemente associada com disfunção hepática grave, resultante de alterações fisiopatológicas crônicas, envolvendo aumento da síntese hepática, oxidação deficiente e redução da secreção hepática de lipídios (KUMAR *et al.*, 2009).

A análise do fígado dos animais transplantados com Sarcoma revelou a presença de hiperplasia das células de Kupffer em todos os grupos testados. O grupo controle negativo apresentou moderada tumefação celular de hepatócitos e congestão portal e da veia centrolobular.

O fígado dos animais transplantados com Sarcoma 180 tratados com PGC por via intraperitoneal apresentou alterações histopatológicas semelhantes às encontradas no controle negativo, como moderada tumefação celular de hepatócitos, congestão portal e da veia centrolobular. Contudo foram observados focos inflamatórios dispersos após tratamento com PGC (25 mg.kg⁻¹) e intensa tumefação celular de hepatócitos e focos inflamatórios quando administrado PGC na concentração de 50 mg.kg⁻¹. Os animais tratados com PGC por via oral mostraram moderada a intensa tumefação celular de hepatócitos. Na dose de 100 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ observou-se congestão portal e da veia centrolobular e focos inflamatórios dispersos.

As alterações histopatológicas observadas pelos grupos experimentais após tratamento com PGC parecem ser reversíveis devido à ausência de fibrose intersticial e à grande

capacidade de regeneração hepática, podendo haver reversão das alterações com a descontinuidade do tratamento ou redução da dose. Concordantemente, a análise bioquímica do sangue dos camundongos transplantados com Sarcoma 180 pertencentes aos grupos controle negativo (NaCl 0,9%), controle positivo (5-FU 25mg/kg/dia) e aos grupos experimentais tratados com o polissacarídeo PGC revelou que não houve alteração nos níveis séricos das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). Essas enzimas são consideradas indicadores de lesão hepática devido à sua liberação no sangue em grandes quantidades quando há dano à membrana do hepatócito, resultando em aumento de sua permeabilidade.

A nefrotoxicidade do polissacarídeo PGC foi avaliada através de análise histopatológica e dos níveis séricos de uréia. Os rins dos animais pertencentes ao grupo controle negativo mostraram arquitetura glomerular preservada. Contudo, todos os grupos experimentais transplantados com Sarcoma 180 apresentaram moderada tumefação celular do epitélio tubular e hemorragia glomerular e tubular.

O tratamento com PGC por ambas as vias intraperitoneal e oral resultou em necrose nefrotóxica focal em áreas dispersas e raros cilindrohialinos nas maiores doses testadas de cada grupo. Tais alterações se apresentaram de forma discreta e a necrose identificada mostrou ser focal e rara. A ausência de edema ou infiltração de linfócitos, juntamente com a manutenção da integridade do tecido intersticial podem indicar possibilidade de reversão das alterações observadas após interrupção do tratamento ou redução da dose. Em adição, nenhum grupo analisado apresentou alteração nos níveis séricos de uréia, sugerindo ausência de lesão renal, pois este composto nitrogenado é considerado um marcador sensível a alterações primárias da função renal.

6 CONCLUSÃO

A caracterização estrutural realizada por métodos químicos e espectroscópicos do polissacarídeo (PGC) extraído da alga marinha vermelha *Gracilaria caudata* demonstrou que esse composto é uma galactana tipo ágar, formada principalmente por repetições dos resíduos de (\rightarrow 3) β -D-galactopiranosose e (\rightarrow 4)-3,6-anidro- α -L-galactose, com substituições desses monossacarídeos por β -D-galactopiranosose-6-metil (G-6M), 3,6-anidro- α -L-galactose-2-metil (LA2M) e α -L-galactose-6-sulfato (L-6S), além de apresentar substituições por acetal de ácido pirúvico em sua unidade de β -D-galactopiranosose. O polissacarídeo PGC possui elevada massa molar, correspondendo a $2,5 \times 10^5$ g.mol⁻¹ ou 250 kDa.

O presente trabalho demonstrou que o polissacarídeo (PGC) extraído da alga marinha vermelha *Gracilaria caudata* não apresenta atividade citotóxica direta contra as células neoplásicas testadas, mas foi capaz de inibir significativamente o crescimento tumoral em camundongos transplantados com Sarcoma 180. A hiperplasia das polpas branca e vermelha esplênicas em resposta ao tratamento com o polissacarídeo PGC por ambas as vias intraperitoneal e oral, juntamente com o aumento da massa úmida relativa do baço dos animais e alteração da contagem diferencial de leucócitos com aumento do percentual de neutrófilos após administração de PGC por via intraperitoneal sugere que o efeito antitumoral apresentado por PGC esteja envolvido com suas propriedades imunomodulatórias. Em adição, a administração conjunta de PGC e 5-Fluorouracil resultou em potencialização da resposta antitumoral. O polissacarídeo PGC foi ainda capaz de reverter o quadro de imunodepressão induzido pelo tratamento com 5-fluorouracil.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARONSON, S.A. Growth Factors and Cancer, **Science**, v. 254, p. 1146-1153, 1991.

AISA, Y.; MIYAKAWA, Y.; NAKAZATO, T.; SHIBATA, H.; SAITO, K.; IKEDA, Y.; KIZAKI, M. Fucoidan induces apoptosis of human HS-Sultan cells accompanied by activation of caspase-3 and down-regulation of ERK pathways. **Am. J. Hematol.**, v. 78, p. 7-14, 2004.

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. **Cell**, v. 124, p. 783–801, 2006.

ALBERT, M.L.; SAUTER, B.; BHARDWAJ, N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. **Nature**, v. 392, p. 86–89, 1998.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer facts & figures 2008**. Atlanta: American Cancer Society, 2008.

ANDRIAMANANTOANINA, H.; CHAMBAT, G.; RINAUDO, M. Fractionation of extracted Madagascar Gracilaria corticata polysaccharides: Structure and properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, p. 77–88, 2007.

ANTONIA, S. J.; MIRZA, N.; FRICKE, I.; CHIAPPORI, A.; THOMPSON, P.; WILLIAMS, N.; BEPLER, G.; SIMON, G.; JANSSEN, W.; LEE, J.; MENANDER, K.; CHADA, S.; GABRILOVICH, D. I. Combination of p53 cancer vaccine with chemotherapy in patients with extensive stage small cell lung cancer. **Clin. Cancer Res.**, v. 12, p. 878–887, 2006.

APLIN, A. E.; HOWE, A.; ALAHARI, S. K.; JULIANO, R. L. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. **Pharmacol. Rev.**, v. 50, p. 197-263, 1998.

ARAKI, C. Some recent studies on the polysaccharides of agarophytes. **Proc. Int. Seaweed Symp.**, v. 5, p. 3–17, 1966.

ARLEN, P. M.; MADAN, R. A.; HODGE, J. W.; SCHLOM, J.; GULLEY, J. L. Combining vaccines with conventional therapies for cancer. **Update on cancer therapeutics**, v. 2, p. 33–39, 2007.

ARMISEN, R. World-wide use and importance of *Gracilaria*. **J. Appl. Phycol.**, v. 7, p. 231–243, 1995.

ARMISEN, R.; GALATAS, F. Agar. In G. O. PHILLIPS; P. A. WILLIAMS (Eds.), **Handbook of hydrocolloids**. Cambridge, England: CRC Press, pp. 21–40, 2000.

BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **The Lancet**, v. 357, p. 539–545, 2001.

BANCROFT, G. J.; SCHREIBER, R. D.; UNANUE, E. R. Natural immunity: a T-cell independent pathway of macrophage activation, defined in the scid mouse. **Immunol. Rev.**, v. 124, p. 5–24, 1991.

BELLINGER, E.; SIGEE, D.D. **Freshwater Algae: Identification and Use as Bioindicators**. 1^a ed., Ed. Wiley-Blackwell, 284p., 2010.

BERGERS, G.; HANAHAN, D.; COUSSENS, L.M. Angiogenesis and apoptosis are cellular parameters of neoplastic progression in transgenic mouse models of tumorigenesis. **Int. J. Dev. Biol.**, v. 42, p. 995–1002, 1998.

BERNAS, T.; DOBRUCKI, J. Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes. **Cytometry**, v. 47, p. 236–242, 2002.

BERRIDGE, M. V.; HERST, P. M.; TAN, A.S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction, **Biotechnol. Annu. Rev.**, v. 11, p. 127–152, 2005.

BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S. Characterization of the cellular reduction of MTT. Subcellular localisation, substrate dependence and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. **Archiv. Biochem. Biophys.**, v. 303, p. 474–482, 1993.

BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S.; MCCOY, K. D.; WANG, R. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. **Biochemica**, v. 4, p. 15–20, 1996.

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, p. 29R–40R, 2003.

BEUTLER, B. Innate immunity: an overview. **Mol. Immunol.**, v. 40, p. 845–859, 2004.

BHATTACHARYA, D.; MEDLIN, L., Algal phylogeny and the origin of land plants. **Plant. Physiol.**, v. 116, p. 9 – 15, 1998.

BIRD, C.J.; HELLEUR, R.J.; HAYES, E.R.; MCLACHLAN, J. Analytical pyrolysis as a taxonomic tool in Gracilaria (Rhodophyta: Gigartinales). **Proc. Int. Seaweed Symp.** v. 12, p. 207–212, 1987.

BIRD, K.T. Evidence of 4-O-methyl- α -L-galactose in the agar of Gracilaria verrucosa strain G-16. **J. Appl. Phycol.** v. 2, p. 383–384, 1990.

BISHOP, J.M.; WEINBERG, R.A. (eds.). **Molecular Oncology**. New York: Scientific American, 1996.

BLUNDEN, G. Marine algae as sources of biologically active compounds. **Interdisciplinary Science Reviews**, v. 18, 73–80, 1993.

BOUCK, B.; STELLMACH, V. HSU, S.C. How Tumors Become Angiogenic. **Advances in Cancer Research**, vol. 69, 1996.

BROWN, G. D.; HERRE, J.; WILLIAMS, D. L.; WILLMENT, J. A.; MARSHALL, A. S.; GORDON, S. Dectin-1 mediates the biological effects of β -glucans. **J. Exp. Med.**, v. 197, p. 1119–1124, 2003.

CAMPO, V. L.; KAWANO, BRAZ DA SILVA Jr., D.F.D.; CARVALHO, I. Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis – A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, 167–180, 2009.

CÁRCERES, P.J.; CARLUCCI, M.J.; DAMONTE, E.B.; MATSUHIRO, B.; ZÚÑIGA, E.A. Carrageenans from Chilean samples of *Stenogramme interrupta* (Phyllophoraceae): structural analysis and biological activity. **Phytochemistry**, v. 53, p. 81–86, 2000.

CARLUCCI, M.J.; CIANCIA, M.; MATULEWICZ, M.C.; CEREZO, A.S.; DAMONTE, E.B. Antiherpetic activity and mode of action of natural carrageenans of diverse structural types. **Antiviral Res.**, v. 43, p. 93–102, 1999.

CARLUCCI, M.J.; SCOLARO, L.A.; NOSEDA, M.D.; CEREZO, A.S.; DAMONTE, E.B. Protective effect of a natural carrageenan on genital herpes simplex virus infection in mice. **Antiviral Res.**, v. 64, p. 137–141, 2004.

CARMELIET, P.; K. JAIN, R.K. Angiogenesis in cancer and other diseases. **Nature**, v. 407, 2000.

CHAPMAN, R. L.; BUCHHEIM, M. A. Green algae and the evolution of land plants: inferences from nuclear-encoded rRNA gene sequences. **BioSystem**, v. 28, p. 127-137, 1992.

CHAVES, L. S. Polissacarídeos da alga marinha *Gracilaria Birdiae* (Plastino e Oliveira): Estrutura e Avaliação toxicológica. Dissertação de mestrado, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC, Fortaleza, 2008.

CHIHARA, G. Recent progress in immunopharmacology and therapeutic effects of polysaccharides. **Dev. Biol. Stand.**, v.77, p. 191 – 197, 1992.

CHOPIN, T., KERIN, B.F., MAZEROLLE. R., Phycocolloid chemistry as a taxonomic indicator of phylogeny in the Gigartinales, Rhodophyceae: A review and current developments using Fourier transform infrared diffuse reflectance spectroscopy. **Phycological Research.**, v. 47, p. 167 – 88, 1999.

CHOPIN, T., WHALEN, E., A new and rapid method for carrageenan identification by FT IR diffuse reflectance spectroscopy directly on dried, ground algal material. **Carbohydr. Res.**, v. 246, p. 51 – 59, 1993.

CHUN, H.; SHIN, D. H.; HONG, B. S.; CHO, H. Y.; YANG, H. C. Purification and biological activity of acidic polysaccharide from leaves of *Thymus vulgaris* L. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 24, p. 941 – 946, 2001.

CHURCH, F.C.; MEADE, J.B.; TREANOR, R.E.; WHINNA, H.C. Antithrombin activity of fucoidan. **J. biol. Chem.**, v. 264, p. 3618–3623, 1989.

COLLIEC, S.; FISCHER, A.M.; TAPON-BRETAUDIÈRE, J.; BOISSON, C.; DURAND, P.; JOZEFONVICZ, J. Anticoagulant properties of a fucoidan fraction. **Thromb. Res.**, v. 64, p. 143-154, 1991.

COLOTTA, F.; ALLAVENA, P.; SICA, A.; GARLANDA, C.; MANTOVANI, A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. **Carcinogenesis**, v. 30, n.7, p. 1073–1081, 2009.

COOMBE, D.R.; PARISH, C.R.; RAMSHAW, I.E.; SNOWDEN, J.M. Analysis of the inhibition of tumour metastasis by sulfated polysaccharides. **Int. J. Cancer**, v. 39, p. 82–88, 1987.

COSTA, L.S.; FIDELIS, G.P.; CORDEIRO, S.L.; OLIVEIRA, R.M.; SABRY, D.A.; CÂMARA, R.B.G.; NOBRE, L.T.D.B.; COSTA, M.S.S.P.; ALMEIDA-LIMA, J. FARIAS, E.H.C.; LEITE, E.L.; ROCHA, H.A.O. Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 64, p. 21–28, 2010.

COSTA, L.S.; TELLES, C.B.S.; OLIVEIRA, R.M.; NOBRE, L.T.D.B.; DANTAS-SANTOS, N.; CAMARA, R.B.G.; COSTA, M.S.S.P.; ALMEIDA-LIMA, J.; MELO-SILVEIRA, R.F.; ALBUQUERQUE, I.R.L.; LEITE, E.L.; ROCHA, H.A.O. Heterofucan from *Sargassum filipendula* Induces Apoptosis in HeLa Cells. **Mar. Drugs**, v. 9, p. 603-614, 2011.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, p. 860–867, 2002.

CRAIGIE, J. S.; WEN, Z. C.; VAN DER MEER, J. P. Interspecific, Intraspecific and Nutritionally – Determined Variation in the composition of Agars from *Gracilaria* ssp. **Botanica Marina**, v. 27, p. 55-61, 1984.

CRAIGIE, J.S. **Biology of the Red Algae**. Ed. R.G. Sheath & K.M. Cole., Cambridge University Press: New York, pp.240, 1990.

CROSS, M.; DEXTER, T.M. Growth factors in development, transformation, and tumorigenesis. **Cell**, v. 64, n. 2, p. 271-280, 1991.

CUMASHI, A.; USHAKOVA, N.A.; PREOBRAZHENSKAYA, M.E.; D'INCECCO, A.; PICCOLI, A.; TOTANI, L.; TINARI, N.; MOROZEVICH, G.E.; BERMAN, A.E.; BILAN, M.I.; USOV, A.I.; USTYUZHANINA, N.E.; GRACHEV, A.A.; SANDERSON, C.J.; KELLY, M.; RABINOVICH, G.A.; IACOBELLI, S.; NIFANTIE, N.E. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. **Glycobiology**, v. 17, p. 541–552, 2007.

CZOP, J. K.; KAY, J. Isolation and characterization of β -glucan receptors on human mononuclear phagocytes. **J. Exp. Med.**, v. 173, p.1511–1520, 1991.

DAMONTE, E.; NEYTS, J.; PUJOL, C.A.; SNOECK, R.; ANDREI, G.; IKEDA, S.; WITVROUW, M.; REYEMEN, D.; HAINES, H.; MATULEWICZ, M.C.; CERESO, A.; COTO, C.E.; De CLERCQ, E. Antiviral activity of a sulphated polysaccharide from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*. **Biochem. Pharmacol.**, v. 47, n. 12, p. 2187-2192, 1994.

DAVIS, T. A.; VOLESKY, B.; MUCCI, A. A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. **Water Research**, v. 37, p. 4311 – 4330, 2003.

DE CLERCQ, E. Chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection: anti-HIV agents targeted at early stages in the virus replicative cycle. **Biomed. Pharmacother.**, v. 50, p. 207–215, 1996.

DE RUITER, G. A. RUDOLPH, B. Carrageenan biotechnology. **Trends in Food Science & Technology**, v. 8, p. 389-395, 1997.

DE VISSER, K.E.; EICHTEN, A.; COUSSENS, L.M. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. **Nat. Rev. Cancer**, v. 6, p. 24–37, 2006.

DILLEHAY, T. D.; RAMÍREZ, C.; PINO, M. COLLINS, M. B.; ROSSEN, J.; PINO-NAVARRO, J. D. Monte Verde: Seaweed, Food, Medicine, and the Peopling of South America. **Science**, v. 320, n. 784, 2008.

DUCKWORTH, M.; YAPHE, W. The structure of agar. Part I: Fractionation of a complex mixture of polysaccharides. **Carbohydrate Research**, v.16, p. 189–197, 1971.

DUNN, G. P.; OLD, L. J.; SCHREIBER, R.D. The three Es of cancer immunoediting. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 22, p. 329–360, 2004.

ELLOUALI, M.; BOISSON-VIDAL, C.; DURAND, P.; JOZEFONVICZ, J. Antitumor Activity of Low Molecular Weight Fucans Extracted from Brown Seaweed *Ascophyllum nodosum*. **Anticancer Res.**, v. 13, p. 2011–2019, 1993.

EVAN, G.; LITTLEWOOD, T. A Matter of Life and Cell Death. **Science**, v. 281, p. 1317-1322, 1998.

FAREED, J.W.; HOPPENSTEADT, D.; BICK, R.L. An update of heparins at the beginning of the new millennium. **Sem. Thromb. Haemost.**, v. 26, p. 5–21, 2000.

FARIAS, W. R. L.; VALENTE, A. P.; PEREIRA, M. S.; MOURÃO, P. A. S. Structure and anticoagulant activity of sulfated galactanas. **The journal of biological chemistry**, v. 275, n. 38, p. 29299-29307, 2000.

FARIAS, W.R.L.; NAZARETH, R.A.; MOURÃO, P.A.S. Dual effects of sulfated Dgalactans from the red algae *Botryocladia occidentalis* preventing Thrombosis and inducing platelet aggregation. **Thromb. Hematol.** 86: 1540–1546, 2001.

FEARON, D.T.; LOCKSLEY, R.M. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. **Science**, v. 272, p. 50–53, 1996.

FELDMAN, S.C.; REYNALDI, S.; STORTZ, C.A.; CEREZO, A.S.; DAMONT, E.B. Antiviral properties of fucoidan fractions from *Leathesia difformis*. **Phytomed.**, v. 6, p. 335-340, 1999.

FERNANDEZ, L.E.; VALIENTE, O.G.; MAINARDI, V.; BELLO, J.L.; VELEZ, H.; ROSADO, A. Isolation and characterization of an antitumor active agar-type polysaccharide of *Gracilaria domingensis*. **Carbohydr. Res.**, v. 190, p. 77–83, 1989.

FREILE-PELEGRÍN, Y.; MURANO, E. Agars from three species of Gracilaria (Rhodophyta) from Yucatán Peninsula. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 295–302, 2005.

FRIEDMAN, M. Application of the ninhydrin reaction for the analysis of amino acids, peptides, and proteins to agricultural and biomedical sciences. **J. Agric. Food. Chem.**, v. 52, p. 385–406, 2004.

FUJITA, T.; MATSUSHITA, M.; ENDO, Y. The lectin-complement pathway – its role in innate immunity and evolution. **Immunol. Rev.**, v. 198, p. 185–202, 2004.

FUKAHORI, S.; YANO, H.; AKIBA, J.; OGASAWARA, S.; MOMOSAKI, S.; SANADA, S.; KURATOMI, K.; ISHIZAKI, Y.; MORIYA, F.; YAGI, M.; KOJIRO, M. Fucoidan, a major component of brown seaweed, prohibits the growth of human cancer cell lines in vitro. **Molecular Medicine Reports**, v. 1, p. 537-542, 2008.

FURNEAUX, R.H.; MILLER, I.J.; STEVENSON, T.T. Agaroids from New Zealand members of the Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyta) – a novel dimethylated agar. **Hydrobiologia** 204/205, p. 645–654, 1990.

GARCIA-LORA, A.; MARTINEZ, M.; PEDRINACI, S.; GARRIDO, F. Different regulation of PKC isoenzymes and MAPK by PSK and IL-2 in the proliferative and cytotoxic activities of the NKL human natural killer cell line. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 52, p. 59–64, 2003.

GASSER, S.; RAULET, D.H. The DNA Damage Response Arouses the Immune System. **Cancer Res.**, v. 66, n. 8, p. 3959-3962, 2006.

GENESTIER, L.; PAILLOT, R.; FOURNEL, S.; FERRARO, C.; MIOSSEC, P.; REVILLARD, J. P. Immunosuppressive properties of methotrexate: apoptosis and clonal deletion of activated peripheral T cells. **J. Clin. Invest.** 102:322–28, 1998.

GEROSA, F.; BALDANI-GUERRA, B.; NISII, C.; MARCHESINI, V.; CARRA, G.; TRINCHIERI, G. Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. **J. Exp. Med.**, v. 195, p. 327–33, 2002.

GLOVSKY, M. M.; CORTES-HAENDCHEN, L.; GHEKIERE, L.; ALENTY, A.; WILLIAMS, D. L.; DI LUZIO, R. Effects of particulate β -1,3 glucan on human, rat, and guinea pig complement activity. **J. Reticuloendothel. Soc.**, v. 33, p. 401–413, 1983.

GROH, V.; WU, J.; YEE, C.; SPIES, T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. **Nature**, v. 419, p.734–38, 2002.

GROSEV, V. M., BOZAC, R., PUPPELS, G. J. Vibrational spectroscopic characterization of wild growing mushrooms and toadstools **Spectrochimica Acta Part A**, v. 57, p. 2815 – 2829, 2001.

HADDEN, J.W. Immunodeficiency and cancer: prospects for correction. **Int. Immunopharm.**, v. 3, p. 1061-1071, 2003.

HAN, S. B.; YOON, Y. D.; AHN, H. J.; LEE, H. S.; LEE, C. W.; YOON, W. K.; PARK, S.K.; KIM, H.M. Toll-like receptor-mediated activation of B cells and macrophages by polysaccharide isolated from cell culture of *Acanthopanax senticosus*. **Int. Immunopharmacol.**, v.3, p. 1301–1312, 2003.

HAYASHI, A.; GILLEN, A.C.; LOTT, J.R. Effects of daily oral administration of quercetin chalcone and modified citrus pectin on implanted colon-25 tumor growth in Balb-c mice. **Altern. Med. Rev.**, v. 5, p. 546-552, 2000.

HAYNES, N. M.; SMYTH, M. J.; MOST, R. G. V. D; LAKE, R. A. Immunogenic anti-cancer chemotherapy as an emerging concept. **Current Opinion in Immunology**, v. 20, p. 545–557, 2008.

HRCKOWA, G.; VELEBNY, S. Treatment of *Toxocara canis* infections in mice with liposome-incorporated benzimidazole carbamates and immunomodulator glucan. **J. Helminth.**, v. 75, p. 141-146, 2001.

HUANG, A.Y.; GOLUMBEEK, P.; AHMADZADEH, M.; JAFFEE, E.; PARDOLL, D.; LEVITSKY, H. Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens. **Science**, v. 264, p. 961–965, 1994.

HUSSAIN, S.P.; HARRIS, C.C. Inflammation and cancer: An ancient link with novel potentials. **Int. J. Cancer**, v. 121, p. 2373–2380, 2007.

HWANG, J. S.; JI, H. J.; KOO, K. A.; LEE, N. H.; YEO, H. K.; CHEONG, S. W.; PARK, J. H.; OH, G. S.; YOON, C. S.; YOUN, H. Y. AIP1, a water-soluble fraction from *Artemisia iwayomogi*, suppresses thymocytes apoptosis in vitro and down-regulates the expression of Fas gene. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 28, p. 921-924, 2005.

HYUN, J.H.; KIM, S.C.; KANG, J.I.; KIM, M.K.; BOO, H.J.; KWON, J.M.; KOH, Y.S.; HYUN, J.W.; PARK, D.B.; YOO, E.S.; KANG, H. Apoptosis inducing activity of fucoidan in HCT-15 colon carcinoma cells. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 32, n. 10, p. 1760-1764, 2009.

ITOH, H.; NODA, H.; AMANO, H.; ITO, H. Immunological analysis of inhibition of lung metastases by fucoidan (GIV-A) prepared from brown seaweed *Sargassum thunbergii*. **Anticanc. Res.**, v. 15, p. 1937-1948, 1995.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. **Nat. Immunol.**, v. 5, p. 987–995, 2004.

IZUMI, I.C. Structural analysis of agar-type polysaccharides by NMR spectroscopy. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 320, p. 311-17, 1973.

JANEWAY, C.A.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 20, p. 197–216, 2002.

JUNG, K.; H.A, S.K.; HAN, D.U.; KIM, D.W.; MOON, W.K. Antiviral effect of *Saccharomyces cerevisiae* β -glucan to swine influenza virus by increased production of interferon-gamma and nitric oxide. **J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health**, v. 51, P. 72-76, 2004.

KAIN, J.M.; DESTOMBE, C. A review of the life history, reproduction and phenology of *Gracilaria*. **Journal of Applied Phycology**, v. 7, p. 269-281, 1995.

KALIN, M.; WHEELER, W. N.; MEINRATH, G. The removal of uranium from mining waste water using algal /microbial biomass. **Journal of Environmental Radioactivity**, v. 78, p. 151–177, 2005.

KELLAND, L. Targeting the Limitless Replicative Potential of Cancer: The Telomerase/Telomere Pathway. **Clin Cancer Res**, v. 13, n. 17, p. 4960-4963, 2007.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer**, v. 26, 239-257, 1972.

KHONG, H.T.; RESTIFO, N.P. Natural selection of tumor variants in the generation of “tumor escape” phenotypes. **Nat. Immunol.**, v. 3, p. 999–1005, 2002.

KIM, E.J.; PARK, S.Y.; LEE, J.Y.; PARK, J.H.Y. Fucoidan present in brown algae induces apoptosis of human colon cancer cells. **BMC Gastroenterol.**, v. 10, p. 1–11, 2010.

KIM, W. S.; ORDIJA, C. M.; FREEMAN, M. W. Activation of signaling pathways by putative scavenger receptor class A (SR-A) ligands requires CD14 but not SR-A. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 310, p. 542–549, 2003.

KLOAREG, B.; QUATRANO, R. S. Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. **Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.**, v. 26, p. 259-315, 1988.

KODAMA, N.; MURATA, Y.; NANBA, H. Administration of a polysaccharide from *Grifola frondosa* stimulates immune function of normal mice. **J. Med. Food**, v. 7, p. 141–145, 2004.

KOLENDER, A.A.; MATULEWICZ, M.C.; CERESO, A.S. Structural analysis of antiviral sulfated α -D-(1,3)-linked mannans. **Carbohyd. Res.**, v. 273, p. 179–185, 1995.

KUMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N.; ASTER, J. **Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease**, 8^a ed: WB Saunders, 1464p., 2009.

KUMAR, V.; FOTEDAR, R. Agar extraction process for *Gracilaria cliftonii* (Withell, Millar, & Kraft, 1994). **Carbohydrate Polymers**, v. 78, p. 813–819, 2009.

KUREISHY, T. W.; ABDEL-MOATI, M. A. R.; AL-MUFTAH, A. R. Marine algae as bioindicators of pollution levels in the arabian gulf. **Qatar Univ. Sci. J.** v.15, n. 1, p. 215-221, 1995.

LAHAYE, M. Developments on gelling algal galactans, their structure and physico-chemistry. **Journal of Applied Phycology**, v. 13, p. 173–184, 2001.

LAHAYE, M., YAPHE, W., The chemical structure of agar from *Gracilaria compressa* (C. Agardh) Greville, *G. cervicornis* (Turner) J. Agardh, *G. damaecornis* J. Ag and *G. domingensis* Sonder ex Kützing (Gigartinales, Rhodophyta). **Bot. Mar.**, v. 32, p. 369–377, 1989.

LAHAYE, M.; ROCHAS, C.; YAPHE, W. A new procedure for determining the heterogeneity of agar polymers in the cell walls of *Gracilaria* spp. (Gracilariaceae, Rhodophyta). **Can. J. Bot.**, v. 64, p. 579–585, 1986.

LAI, V.M.F, HUANG, A.L.; LII, C.Y. Rheological properties and phase transition of red algal polysaccharide-starch composites. **Food Hydrocol.**, Oxford., v.13, p.409-418, 1999.

LEATHERS, T. D. Biotechnological production and applications of pullulan. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 62, p. 468–473, 2003.

LENGAUER, C., KINZLER, K.W., AND VOGELSTEIN, B. Genetic instabilities in human cancers. **Nature**, v. 396, p. 643–649, 1998.

LEUNG, M. Y. K.; LIU, C.; KOON, J.C.M.; FUNG, K.P. Polysaccharide biological response modifiers. **Immunology Letters**, v. 105, p. 101–114, 2006.

LEW, D. B.; SONGU-MIZE, E.; PONTOW, S. E.; STAHL, P. D.; RATTAZZI, M. C. A mannose receptor mediates mannosyl-rich glycoprotein-induced mitogenesis in bovine airway smooth muscle cells. **J. Clin. Invest.**, v. 94, p. 1855–1863, 1994.

LI, W.; YAJIMA, T.; SAITO, K.; NISHIMURA, H.; FUSHIMI, T.; OHSHIMA, Y.; TSUKAMOTA, Y.; YOSHOKAI, Y. Immunostimulating properties of intragastrically administered Acetobacter-derived soluble branched (1,4)- β -D-glucans decrease murine susceptibility to *Listeria monocytogens*. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 7005–7011, 2004.

LIM, T. S.; NA, K.; CHOI, E. M.; CHUNG, J. Y.; HWANG, J. K. Immunomodulating activities of polysaccharides isolated from *Panax ginseng*. **J. Med. Food**, v.7, p.1–6, 2004.

LINEHAN, S. A.; MARTINEZ-POMARES, L.; STAHL, P. D.; GORDON, S. Mannose receptor and its putative ligands in normal murine lymphoid and nonlymphoid organs: in situ expression of mannose receptor by selected macrophages, endothelial cells, perivascular microglia, and mesangial cells, but not dendritic cells. **J. Exp. Med.**, v. 189, p. 1961–1972, 1999.

LINS, K.O.A.L.; BEZERRA, D.P.; ALVES, A.P.N.N.; ALENCAR, N.M.N.; LIMA, M.W.; TORRES, V.M.; FARIAS, W.R.L.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V. Antitumor properties of a sulfated polysaccharide from the red seaweed *Champia feldmannii* (Diaz-Pifferer). **J. Appl. Toxicol.**, V. 29, P. 20–26, 2009.

LIOTTA, L.A.; STETLER-STEVENSON, W.G. Tumor Invasion and Metastasis: An Imbalance of Positive and Negative Regulation. **Cancer Research** (Suppl.), v. 51, n. 15, p. 5054s-5059s, 1991.

LONGLEY, D. B.; HARKIN, D. P.; JOHNSTON, P. G. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. **Nature Rev Cancer**, v. 3, p. 330–338, 2003.

LOPES, L.; ANDRADE, C. T.; MANO, E. B. O valor das gomas para as indústrias. **Ciência Hoje**, v. 12, n. 71, p. 65-67, 1991.

MACIEL, J. S.; CHAVES, L. S.; SOUZA, B. W. S.; TEIXEIRA, D. I. A.; FREITAS, A. L. P.; FEITOSA, P. A.; DE PAULA, R. C. M. Structural characterization of cold extracted fraction of soluble sulfated polysaccharide from red seaweed *Gracilaria birdiae*. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, p. 559–565, 2008.

MAJCZAK, G.A.H.; RICHARTZ, R.R.T.B.; DUARTE, M.E.R.; NOSEDA, M.D. Antiherpetic activity of heterofucans isolated from *Sargassum stenophyllum* (Fucales, Phaeophyta). In Chapman, A.R.O.; Anderson, R.J.; Vreeland, V.J.; Davison, I.R. (eds), **Proceedings of the 17th International Seaweed Symposium**, Oxford University Press, Oxford, pp. 169–174, 2003.

MALHOTRA, R.; WARD, M.; BRIGHT, H.; PRIEST, R.; FOSTER, M.R.; HURLE, M.; BLAIR, E.; BIRD, M. Isolation and characterisation of potential respiratory syncytial virus receptor(s) on epithelial cells. **Microbes Infect.**, v. 5, p. 123–133, 2003.

MANDAL, P.; PUJOL, C.A.; CARLUCCI, M.J.; CHATTOPADHYAY, K.; DAMONTE, E.B.; RAY, B. Anti-herpetic activity of a sulfated xylomannan from *Scinaia hatei*. **Phytochemistry**, v. 69, p. 2193–2199, 2008.

MANTOVANI, A. Cancer: inflaming metastasis. **Nature**, v. 457, p. 36–37, 2009.

MARINCOLA, F. M.; JAFFEE, E. M.; HICKLIN, D. J.; FERRONE, S. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. **Adv. Immunol.**, v. 74, p. 181–273, 2000.

MARINHO-SORIANO, E. Agar polysaccharides from *Gracilaria* species (Rhodophyta, Gracilariaceae). **Journal of Biotechnology**, v. 89, p. 81–84, 2001.

MARINHO-SORIANO, E.; BOURRET, E. Effects of season on the yield and quality of agar from *Gracilaria* species (Gracilariaceae, Rhodophyta). **Bioresource Technology**, v. 90, p. 329–333, 2003.

MARINHO-SORIANO, E.; BOURRET, E. Polysaccharides from the red seaweed *Gracilaria dura* (Gracilariales, Rhodophyta). **Bioresource Technology**, v. 96, p. 379–382, 2005.

MARKS, D. L.; BUCHSBAUM, R.; SWAIN, T. Measurement of total protein in plant samples in the presence of tannins. **Anal. Biochem.**, v. 147, p. 136–143, 1985.

MARUYAMA, H.; NAKAJIMA, J.; YAMOTO, I. A study on the anticoagulant and fibrinolytic activities of a crude fucoidan from the edible brown seaweed *Laminaria religiosa*, with special reference to its inhibitory effect on the growth of sarcoma-180 ascites cells subcutaneously implanted into mice. **Kitasato Arch. Exp. Med.**, v. 60, p. 105–121, 1987.

MATOU, S.; HELLEY, D.; CHABUT, D.; BROS, A.; FISCHER, A-M. Effect of fucoidan on fibroblast growth factor-2-induced angiogenesis in vitro. **Thromb. Res.**, v. 106, p. 213–221, 2002.

MATSUBARA, K.; MATSUURA, Y.; BACIC, A.; LIAO, M.; HORI, K.; MIYAZAWA, K. Anticoagulant properties of a sulfated galactan preparation from a marine green alga, *Codium cylindricum*. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 28, p. 395–399, 2001.

MAZUMDER, S.; GHOSAL, P.K.; PUJOL, C.A.; CARLUCCI, M.J.; DAMONTE, E.B.; RAY, B. Isolation, chemical investigation and antiviral activity of polysaccharides from *Gracilaria corticata* (Gracilariaceae, Rhodophyta). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 31, p. 87 – 95, 2002.

MAZUMDER, S.; GHOSAL, P.K.; PUJOL, C.A.; CARLUCCI, M.J.; DAMONTE, E.B.; RAY, B. Isolation, chemical investigation and antiviral activity of polysaccharides from *Gracilaria corticata* (Gracilariaceae, Rhodophyta). **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 31, p. 87–95, 2002.

MCHUGH, D.J. A guide to the seaweed industry. **FAO Fisheries Technical Paper**, n. 441, p. 105p., 2003.

MEANS T. K.; GOLENBOCK, D. T.; FENTON, M. J. Structure and function of Toll-like receptor proteins. **Life Sci.**, v. 68, p. 241–258, 2000.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C.A. Innate Immunity: The Virtues of a Nonclonal System of Recognition. **Cell**, v. 91, p. 295–298, 1997.

MELO, M. R. S.; FEITOSA, J. P. A.; FREITAS, A. L. P.; DE PAULA, R. C. M. Isolation and characterization of soluble sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria cornea*. **Carbohydrate Polymers**, v. 49, p. 491–498, 2002.

MENDES, F. N. P. Isolamento, purificação e identificação dos polissacarídeos presentes nas algas marinhas *Gracilaria domingensis* Sonder ex Kutzing e *Ulva fasciata* Delile. **Tese de doutorado**, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC, Fortaleza, 2004.

MILLER, I.J., FURNEAX, R.H., The structural determination of the agaroid polysaccharides from four New Zealand algae in the order Ceramiales by means of ¹³C NMR spectroscopy. **Bot. Mar.**, v. 40, p. 333–339, 1997.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer (INCA), 2009, 98p.

MIZOGUCHI, H.; O'SHEA, J. J.; LONGO, D. L.; LOEFFLER, C. M.; MCVICAR, D. W.; OCHOA, A. C. Alterations in signal transduction molecules in T lymphocytes from tumor-bearing mice. **Science**, v. 258, p. 1795–1798, 1992.

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, France). **Journal of Applied Phycology**, 10, 59-66, 1998.

MONTAÑO, N.E.; VILLANUEVA, R.D.; ROMERO, J.B. Chemical characteristics and gelling properties of agar from two Philippine *Gracilaria* spp. (Gracilariales, Rhodophyta). **Journal of Applied Phycology**, v. 11, p. 27–34, 1999.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Meth.**, v. 16, p. 55–63, 1983.

MOURÃO, P.A. Use of sulfated fucans as anticoagulant and antithrombotic agents: Future perspectives. **Curr. Pharm. Design.**, v. 10, p. 967–981, 2004.

MURANO, E. Chemical structure and quality of agars from *Gracilaria*. **J. appl. Phycol.**, v. 7, p. 245–254, 1995.

MURANO, E.; TOFFANIN, R.; KNUTSEN, S.H.; PAOLETTI, S.; RIZZO, R. Chemical and macromolecular characterization of agar polymers from *Gracilaria dura* (C. Agardh) J. Agardh (Gracilariaceae, Rhodophyta). **Carbohydr. Polym.**, v. 18, p. 171-178, 1992.

NAKASHIMA, H.; KIDO, Y.; KOBAYASHI, N.; MOTOKI, Y.; NEUSHUL, M.; YAMAMOTO, N. Antiretroviral activity in a marine red alga; reverse transcriptase inhibition by an aqueous extract of *Schizymenia pacifica*. **J.Cancer Res. Clin. Onc.**, v. 113, p. 413–416, 1987.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 5^a ed., Ed. Palgrave Macmillan, 1158p., 2008.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADERB, K.M. The influence of natural products upon drug discovery. **Nat. Prod. Rep.**, v. 17, p. 215–234, 2000.

NISHINO, T.; NISHIOKA, C.; URA, H.; NAGUMO, T. Isolation and partial characterization of a novel amino sugar-containing fucan sulfate from commercial *Fucus vesiculosus* fucoidan. **Carbohydrate Research**, v. 255, p. 213-224, 1994.

NOWELL, P.C. The clonal evolution of tumor cell populations. **Science**, v. 194, p. 23–28, 1976.

OHNISHI, M.; KIMURA, S.; YAMAZAKI, M.; OSHIMA, H.; MIZUNO, D.I.; ABE, S.; YAMAGUCHI, H. Anti-tumor activity of low-toxicity lipopolysaccharide of *Bordetella pertussis*. **Br. J. Cancer**, v. 69, p. 1038-1042, 1994.

OLIVEIRA, E.C. **Introdução à Biologia Vegetal**. 2^a ed., Edusp: São Paulo, 2003.

OOI, C.V.; LIU, F. immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes. **Current. Med. Chem.**, v. 7, p. 715-729, 2000.

ORTHOLAND, J.Y., GANESAN, A. Natural products and combinatorial chemistry: back to the future. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 8, p. 271-280, 2004.

PAINTER, T. J. Algal Polysaccharides. In: **The Polysaccharides**, ASPINALL, G. O., Ed., 1st ed.; New York: Academic Press, v. 2, p. 195-285, 1983.

PAULSEN, B.S. Plant polysaccharides with immunostimulatory activities. **Curr. Org. Chem.**, v. 5, p. 939–950, 2001.

PEISER, L.; MUKHOPADHYAY, S.; GORDON, S. Scavenger receptors in innate immunity. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 14, p. 123–128, 2002.

PEREIRA, L.; AMADO, A. M.; CRITCHLEY, A. C.; VAN DE VELDE, F; RIBEIRO-CLARO, P. J. A. Identification of selected seaweed polysaccharides (phycocolloids) by vibrational spectroscopy (FTIR-ATR and FT-Raman). **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 7, p. 1903-1909, 2009.

PEREIRA, M.G.; BENEVIDES, N.M.; MELO, M.R.; VALENTE, A.P.; MELO, F.R.; MOURAO PA. Structure and anticoagulant activity of a sulfated galactan from the red alga. *Gelidium crinale*. Is there a specific structural requirement for the anticoagulant action? **Carbohydr. Res.**, v. 340, p. 2015–2023, 2005.

PEREIRA-PACHECO, F.; ROBLEDO, D.; RODRIGUEZ-CARVAJAL, L.; FREILE-PELEGRIN, Y. Optimization of native agar extraction from *Hydropuntia cornea* from Yucatan, Mexico. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 6, p. 1278–1284, 2007.

POMIN, V. H. An overview about the structure-function relationship of marine sulfated homopolysaccharides with regular chemical structures. **Biopolymers**, v. 91, p. 601–609, 2009.

POMIN, V. H. Structural and functional insights into sulfated galactans: a systematic review. **Glycoconj. J.**, v. 27, p. 1–12, 2010.

POMIN, V. H; MOURÃO, P. A. Structure, biology, evolution, and medical importance of sulfated fucans and galactans. **Glycobiology**, v. 18, p. 1016–1027, 2008.

PONCE, N.M.A.; PUJOL, C.A.; DAMONTE, E.B.; FLORES, M.L.; STORTZ, C.A. Fucoidans from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*: extraction methods, antiviral activity and structural studies. **Carbohydr. Res.**, v. 338, p. 153–165, 2003.

PRADO-FERNANDEZ, J., RODRIGUEZ-VAZQUEZ, J. A., TOJO, E., ANDRADE, J. M. Quantitation of k-, i- and l- carrageenans by mid-infrared spectroscopy and PLS regression. **Analytica Chimica Acta**, 480, 23-37, 2003.

PRIETO, A. R.; SOON, H. S.; BHATTACHARYA, D. Phylogenomics and its Growing Impact on Algal Phylogeny and Evolution. **Algae**, v. 21, n. 1, p. 1-10, 2006.

RAPTIS, S.; BAPAT, B. Genetic instability in human tumors, **EXS.**, v. 96, p. 303–320, 2006.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**, 6ª ed., Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 906p, 2001.

REES, D. A. Biogenesis of 3-6-anhydro-L-galactose. **Biochemical Journal**, v. 81, p. 347-352, 1961.

REIS, R.P.; BASTOS, M.; GÓES, H.G. Cultivo de *Kappaphycus alvarezii* no litoral do Rio de Janeiro. **Panorama da Aqüicultura**, v. 17, p. 42-47, 2007.

RELIGA, P.; KAZI, M.; THYBERG, J.; GACIONG, Z.; SWEDENBORG, J.; HEDIN, U. Fucoidan inhibits smooth muscle cell proliferation and reduces mitogen-activated protein kinase activity. **Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.**, v. 20, p. 419–426, 2000.

RHYU, M.S. Telomeres, Telomerase, and Immortality. **Journal of the National Cancer Institute**, vol. 87, n. 12, p. 884-894, 1995.

RIOU, D.; COLLIEC-JOUAULT, S.; PINCZON DU SEL, D.; BÔSCH, S.; SIAVOSHIAN, S.; LE BERT, V.; TOMASONI, C.; SINQUIN, C.; DURAND, P.; ROUSSAKIS, C. Antitumor and antiproliferative effects of a fucan extracted from *Ascophyllum nodosum* against a non-small-cell bronchopulmonary carcinoma line. **Anticancer Res.**, v. 16, p. 1213–1218, 1996.

ROCHAS, C.; LAHAYE, M.; YAPHE, W. Sulfate Content of Carrageenan and Agar Determined by Infrared Spectroscopy. **Botanica Marina**, v. 29, p. 335-340, 1986.

RODRÍGUEZ, M.C.; MATULEWICZ, M.C.; NOSEDA, M.D.; DUCATTI, D.R.B.; LEONARDI, P.I. Agar from *Gracilaria gracilis* (Gracilariales, Rhodophyta) of the Patagonic coast of Argentina – Content, structure and physical properties. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1435–1441, 2009.

ROSS, G. D.; VETVICKA, V. CR3 (CD11b, CD18): a phagocyte and NK cell membrane receptor with multiple ligand specificities and functions. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 92, p. 181–184, 1993.

SAKAGUCHI, S.; SAKAGUCHI, N.; SHIMIZU, J.; YAMAZAKI, S.; SAKIHAMA, T.; ITOH, M.; KUNIYASU, Y.; NOMURA, T.; TODA, M.; TAKAHASHI, T. Immunologic tolerance maintained by CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. **Immunol. Rev.**, v. 182, p. 18–32, 2001.

SAKURAI, T.; OHNO, N.; SUZUKI, I.; YADOMAE, T. Effect of soluble fungal (1→3)-β-D-glucan obtained from *Sclerotinia sclerotiorum* on alveolar macrophage activation. **Immunoph.**, v. 30, p. 157-166, 1995.

SASAKI, I.A.; FAULKNER, C.L.; NELSON-OVERTO, L.K.; WILEY, J.A.; QUINN, M.T. Effects of Z-100, a Mycobacterium-tuberculosis-derived arabinomannan, on the LP-BM5 murine leukemia virus infection mice. **Pathobiol.**, v. 69, p. 96-103, 2001.

SCHABEL JR., F.M. Surgical adjuvant chemotherapy of metastatic murine tumors. **Cancer**, v. 40, p. 558-568, 1977.

SCHEPETKIN, I.A.; QUINN, M.T. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. **International Immunopharmacology**, v. 6, p. 317– 333, 2006.

SCHOTTENFELD, D.; BEEBE-DIMMER, J.L. Advances in cancer epidemiology: understanding causal mechanisms and the evidence for implementing interventions. **Annu. Rev. Public Health**, n.26, p. 37-60, 2005.

SHAY, J.W.; WRIGHT, W.E. Hayflick, his limit, and cellular ageing. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 1, p. 72-76, 2000.

SHEPHERD, V. L.; TARNOWSKI, B. I.; MCLAUGHLIN, B. J. Isolation and characterization of a mannose receptor from human pigment epithelium. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 32, p. 1779–1784, 1991.

SHIN, J. Y.; SONG, J. Y.; YUN, Y. S.; YANG, H. O.; RHEE, D. K.; PYO, S. Immunostimulating effects of acidic polysaccharides extract of *Panax ginseng* on macrophage function. **Immunopharmacol. Immunotoxicol.**, v. 24, p. 469–482, 2002.

SITTE, P. Symbiogenetic evolution of complex cells and complex plastids. **Eur. J. Protistol.**, v. 29, p. 131–143, 1993.

SMIT, A. J. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review. **Journal of Applied Phycology**, v. 16, n. 4, 245–262, 2004.

SOLOMONS, G.; FRYHLE, C. **Química organica**. 7a ed. Vol. 1. Rio de Janeiro: LTC, 2001.

SOUSA, A. P. A., TORRES, M. R., PESSOA, C., DE MORAES, M. O., FILHO, F. D. R., ALVES, A. P. N. N.; COSTA-LOTUFO, L.V. In vivo growth-inhibition of Sarcoma 180 tumor by alginates from brown seaweed *Sargassum vulgare*. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, n. 1, p. 7–13, 2007.

SPIELER, R. Seaweed compound's anti-HIV efficacy will be tested in southern Africa. **Lancet.**, v. 359, p. 1675, 2002.

STANLEY, N. F. Agars. In Stephen, A. M. (ed.). **Food Polysaccharides and their applications**. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 187-204, 1995.

STEPHANIE, B.; ERIC, D.; SOPHIE, F.M.; CHRISTIAN, B.; YU, G. Carrageenan from *Solieria chordalis* (Gigartinales): Structural analysis and immunological activities of the low molecular weight fractions. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, 448–460, 2010.

STETLER-STEVENSON, W.; AZNAVOORIAN, S.; LIOTTA; L.A. Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. **Annu. Rev. Cell Biol.**, v. 9, p. 541-573, 1993.

SUGAWARA, I.; ITOH, W.; KIMURA, S.; MORI, S.; SHIMADA, K. Further characterization of sulfated homopolysaccharides as anti-HIV agents. **Experientia**, v. 45, p. 996–998, 1989.

SYNYTSYA, A.; KIM, W.J.; KIM, S.M.; POHL, R.; SYNYTSYA, A.; KVASNIČKA F.; ČOPÍKOVÁ, J.; PARK, Y.L. Structure and antitumour activity of fucoidan isolated from sporophyll of Korean brown seaweed *Undaria pinnatifida*. **Carbohydr. Polym.**, v. 81, 41–48, 2010.

TAKEDA, K.; HAYAKAWA, Y.; SMYTH, M. J; KAYAGAKI, N.; YAMAGUCHI, N. KAKUTA, S.; IWAKURA, Y.; YAGITA, H.; OKUMURA, K. Involvement of tumor

necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. **Nat. Med.**, v. 7, p. 94–100, 2001.

TAYLOR, P. R.; GORDON, S.; MARTINEZ-POMARES, L. The mannose receptor: linking homeostasis and immunity through sugar recognition. **Trends in Immunology**, v. 26, n. 2, p. 104-110, 2005.

TZIANABOS, A. O. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biological function. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.13, p. 523–533, 2000.

USOV, A. I. Structural analysis of red seaweed galactans of agar and carrageenan groups. **Food Hydrocol.**, v. 12, p. 301–308, 1998.

USOV, A. I.; YAROTSKY, S. V.; SHASHKOV, A. S. ¹³C-NMR spectroscopy of red algal galactans. **Biopolymers**, v. 19, p. 977-990, 1980.

USOV, A.I.; IVANOVA, E.G.; SHASHKOV, A.S. Polysaccharides of Algae. Isolation and ¹³C-NMR spectral study of some new gel-forming polysaccharides from Japan Sea red seaweeds. **Bot. Mar.** v. 26, p. 285–294, 1983.

VALIENTE, O.; FERNANDEZ, L. E.; PEREZ, R. M.; MARQUINA, G.; VELEZ, H. Agar polysaccharides from red Seaweeds *Gracilaria domingensis* Sonder ex Kutzing and *Gracilaria mammillaris* (Montagne) Howe. **Botanica Marina**, v. 35, p. 77-81, 1992.

VAN DE VELDE, F.; KNUTSEN, S.H.; USOV, A.I.; ROLLEMA, H.S.; CEREZO, A.S. 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.

VAN DE VELDE, F.; PEREIRA, L.; ROLLEMA, H. S. The revised NMR chemical shift data of carrageenans. **Carbohydrate Research**, v. 339, p. 2309–2313, 2004.

VILLANUEVA, R.; MONTAÑO, N. Highly methylated agar from *Gracilaria edulis* (Gracilariales, Rhodophyta). **J. Appl. Phycol.**, v. 11, p. 225–227, 1999.

WANG, S.Y.; HSU, M.L.; HSU, H.C.; TZENG, C.H.; LEE, S.S.; SHIAO, M.S.; HO, C.K. The antitumor effect of *Ganoderma lucidum* is mediated by cytokines released from activated macrophages and T lymphocytes. **Int. J. Cancer**, v. 70, p. 699–705, 1997.

WEINER, H. L.; COHEN, J. A. Treatment of multiple sclerosis with cyclophosphamide: critical review of clinical and immunologic effects. **Mult. Scler.**, v. 8, p. 142–154, 2002.

WERB, Z. ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. **Cell**, v. 91, p. 439-442, 1997.

WILLIAMS, P. A.; PHILLIPS, G. O. Agar. In G. O. PHILLIPS; P. A. WILLIAMS (Eds.), **Handbook of hydrocolloids**. Cambridge, England: CRC Press, pp. 21–40, 2000.

WILLMENT, J. A.; MARSHALL, A.S.; REID, D.M.; WILLIAMS, D.L.; WONG, S.Y.; GORDON, S.; BROWN, G. D. The human β -glucan receptor is widely expressed and functionally equivalent to murine Dectin-1 on primary cells. **Eur. J. Immunol.**, v. 35, p. 1539–1547, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Cancer Report, 2008**. International Agency for Research on Cancer, Ed. BOYLE, P.; LEVIN, B., 510p., 2008.

WYLLIE, A. H.; KERR, J. F. R.; CURRIE, A. R. Cell Death: The Significance of Apoptosis. **International Review of Cytology**, v. 68, p. 251-306, 1980.

XU, J; GAO, K. Growth, pigments, UV-absorbing compounds and agar yield of the economic red seaweed *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta) grown at different depths in the coastal waters of the South China Sea. **Journal of Applied Phycology**, v. 20, p. 681–686, 2008.

YALIN, W.; ISHURD, O.; CUIRONG, S.; YUANJIANG, P. Structure analysis and antitumor activity of (1→3)- β -D-glucans (cordyglucans) from the mycelia of *Cordyceps sinensis*. **Planta Med.**, v. 71, p. 381-384, 2005.

YAMAMOTO, I.; TAKAHASHI, M.; SUZUKI, T.; SEINO H.; MORI H. Antitumor Effect of Seaweeds. IV. Enhancement of Antitumor Activity by Sulfation of a Crude Fucoidan Fraction from *Sargassum kjellmanianum*, **Jpn. J. Exp. Med.**, v. 54, p. 143–151, 1984.

YANG, C.; CHUNG, D.; SHIN, I.S.; LEE, H.; KIM, J.; LEE, Y.; YOU, S. Effects of Molecular Weight and Hydrolysis Conditions on Anticancer Activity of Fucoidans from Sporophyll of *Undaria pinnatifida*. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 43, p. 433–437, 2008.

YE, H.; WANG, K.; ZHOU, C.; LIU, J. ZENG, X. Purification, antitumor and antioxidant activities in vitro of polysaccharides from the brown seaweed *Sargassum pallidum*. **Food Chemistry**, v. 111, p. 428–432, 2008.

YE, J.; LI, Y.; TERUYA, K.; KATAKURA, Y.; ICHIKAWA, A.; ETO, H.; HOSOI, M.; HOSOI, M.; NISHIMOTO, S.; SHIRAHATA, S. Enzyme-Digested Fucoidan Extracts Derived from Seaweed Mozuku of *Cladosiphon novae_caledoniae* Kylin Inhibit Invasion and Angiogenesis of Tumor Cells. **Cytotechnology**, v. 47, p. 117–126, 2005.

YOSHIZAWA, Y.; TSUNEHIRO, J.; NOMURA, K.; ITOH, M.; FUKUI, F.; AMETANI, A.; KAMINOGAWA, S. In vivo macrophage-stimulation activity of the enzyme-degraded water-soluble polysaccharide fraction from a marine alga (*Gracilaria verrucosa*). **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 60, p. 1667–1671, 1996.

YUAN, H.M.; SONG, J.M.; LI, X.G.; LI, N.; DAI, J.C. Immunomodulation and antitumor activity of κ -carrageenan oligosaccharides. **Cancer Letters**, v. 243, p. 228–234, 2006.

ZHANG, Y.; KIYOHARA, H.; MATSUMOTO, T.; YAMADA, H. Fractionation and chemical properties of immunomodulating polysaccharides from roots of *Dipsacus asperoides*. **Planta Med.**, v. 63, p. 393–399, 1997.

ZHOU, G.; XIN, H.; SHENG, W.; SUN, Y.; LI, Z.; XU, Z. In vivo growth-inhibition of S180 tumor by mixture of 5-Fu and low molecular λ -carrageenan from *Chondrus ocellatus*. **Pharmacological Research**, v. 50, p. 47–53, 2004.

ZHOU, G.F.; SUN, Y.; XIN, H.; ZHANG, Y.; LI, Z.; XU, Z. In vivo antitumor and immunomodulation activities of different molecular weight λ -carrageenans from *Chondrus ocellatus*. **Pharmacol. Res.**, v. 50, p. 47–53, 2004.

ZHUANG, C.; ITOH, H.; MIZUNO, T.; ITO, H. Antitumor Active Fucoidan from the Brown Seaweed, *Umitoranoo (Sargassum thunbergii)*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 59, p. 563–567, 1995.

ZITVOGEL, L.; APETOH, L.; GHIRINGHELLI, F.; ANDRÉ, F.; TESNIERE, A.; KROEMER, G. The anticancer immune response: indispensable for therapeutic success? **J. Clin. Invest.**, v. 118, p. 1991–2001, 2008.

ZITVOGEL, L.; APETOH, L.; GHIRINGHELLI, F.; KROEMER, G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 8, p. 59–73, 2008.

ZITVOGEL, L.; TESNIERE, A.; KROEMER, G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, p. 715–727, 2006.

ZOU, W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. **Nature Rev. Cancer**, v. 5, p. 263–274, 2005.