



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

TERENTIA BATISTA SÁ DE NORÕES

EFEITOS RENAIIS PROMOVIDOS POR POLISSACARÍDEOS SULFATADOS
DA ALGA MARINHA *Gracilaria cornea*

FORTALEZA

2014

TERENTIA BATISTA SÁ DE NORÕES

**Efeitos renais promovidos por polissacarídeos sulfatados da alga
marinha *Gracilaria cornea***

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará para obtenção do título de Doutora em Farmacologia.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profª Dra. Helena Serra Azul Monteiro

FORTALEZA

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

N749e Norões, Terentia Batista Sá de.
Efeitos renais promovidos por polissacarídeos sulfatados da alga marinha gracilaria
cornea / Terentia Batista Sá de Norões. – 2014.
91 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina,
Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia, Doutorado em Farmacologia, Fortaleza, 2014.

Área de Concentração: Farmacologia.

Orientação: Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro.

1. Alga Marinha. 2. Polissacarídeos. 3. Perfusão. 4. Rim. 5. Apoptose. I. Título.

CDD 586.39815

TERENTIA BATISTA SÁ DE NORÕES

Efeitos renais promovidos por polissacarídeos sulfatados da alga marinha *Gracilaria cornea*

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará para obtenção do título de Doutora em Farmacologia.

Aprovada em: 07/02/2014

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dra. Helena Serra Azul Monteiro (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof^ª. Dra. Norma Maria Barros Benevides
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Cláudio Gleidiston Lima da Silva
Universidade Federal do Cariri – UFCA

Prof^ª. Dra. Ana Durce Oliveira da Paixão
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof^ª. Dra. Ana Maria Sampaio Assreuy
Universidade Estadual do Ceará – UECE

Dedico a Ricardo, meu marido,
que me apoiou nesse trabalho com muito amor e
paciência, e aos meus pais, Plínio e Antônia, a quem
devo eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

A minha família pelo constante apoio e incentivo fundamentais para a minha formação e conquista de mais uma etapa alcançada.

A minha orientadora, Dra. Helena Serra Azul Monteiro pelo carinho, disponibilidade, apoio e maturidade científica fundamental para o planejamento, desenvolvimento e execução desse trabalho. Por ter acreditado em minhas capacidades e a quem sou grata por ensinamentos que levarei por toda a vida, durante esses sete anos que estivemos juntas.

A Professora Dra Alice Maria Costa Martins pela sua contribuição e orientação nos resultados dos experimentos com cultura de células.

A Professora Dra. Norma Maria Barros Benevides pela contribuição, atenção na correção minuciosa do meu trabalho e polissacarídeos sulfatados totais cedidos.

Ao Professor Dr. Cláudio Gleidiston Lima da Silva pela atenção e orientação sobre a análise histológica.

Aos amigos Daniel freire e Renata Alves pelo carinho, amizade e maturidade científica fundamental para a realização deste trabalho.

Ao doutorando Ramon Róseo pela ajuda fundamental nos experimentos de citometria.

Ao mestrando Jáder Canuto pela ajuda fundamental nos experimentos com cultura de células.

A doutoranda Chistiane Coura pelo trabalho de extração dos polissacarídeos sulfatados totais da alga e pela atenção.

Aos amigos do Laboratório de Farmacologia de Venenos e Toxinas (LAFAVET): Rafael Ximenes, Rafael Jorge, Claudênio Diógenes, Roberta Jorge, Natacha Queiroz, Aline, Antônio Neto pela ajuda e companheirismo nos experimentos durante essa longa jornada.

A Sílvia Helena, Técnica do LAFAVET, por ter me acompanhado nos experimentos de perfusão renal.

Aos funcionários do IBIMED: Terezinha, Juciê e José Amadeus por toda ajuda e respeito com que sempre me trataram.

As ex-secretárias do Programa de Pós-graduação em Farmacologia Aura Hanes e Márcia pela paciência com que sempre me ajudaram.

A Célia Araújo de Carvalho Gonzaga, secretária atual do Programa de Pós-graduação em Farmacologia, pela atenção e ajuda no meu exame de qualificação.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa auxílio para execução deste projeto.

A cada um que me acompanhou de perto (ou mesmo de longe), deixando uma contribuição nesse trabalho, com todo meu carinho, obrigada!

A banca examinadora pelo aceite ao convite.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Farmacologia que construíram parte do conhecimento que hoje detenho.

“O conhecimento torna a alma jovem e diminui a amargura da velhice. Colhe, pois, a sabedoria. Armazena suavidade para o amanhã”.

(Leonardo da Vinci)

RESUMO

As algas marinhas são um grupo de seres vivos aquáticos com capacidade de produzir polissacarídeos sulfatados. Esses polissacarídeos são encontrados em grandes concentrações nas algas da espécie *Gracilaria cornea* e possuem diversas finalidades comerciais, sendo utilizados nos principais setores industriais. Possuem também relevância científica por apresentarem diversas atividades biológicas. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a citotoxicidade renal dos polissacarídeos sulfatados totais (PSTs) da alga marinha *Gracilaria cornea*. Primeiramente, estudaram-se os efeitos dos PSTs, em três concentrações (1µg/mL, 3µg/mL e 4,5µg/mL), no sistema de perfusão de rim de rato isolado com a finalidade de avaliar as possíveis alterações dos parâmetros renais. Neste modelo experimental foram utilizados ratos Wistar machos (280-300 g). Após a perfusão renal, os rins foram submetidos à análise histológica. Os parâmetros avaliados foram analisados pela ANOVA e Student t-test, com $p < 0,05$. Investigaram-se os efeitos causados pelos PSTs em cultura de células tubulares renais do tipo MDCK (Madin-Darby canine kidney). Essas células foram cultivadas em garrafas plásticas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂, com meio RPMI 1640 suplementado com soro bovino fetal a 10%. Para avaliar o tipo de morte celular causada pelos PSTs em cultura de células MDCK, foram realizados ensaios com anexina V-FITC e iodeto de propídio, marcadores de apoptose e necrose, respectivamente, no citômetro de fluxo com a concentração de 50 µg/mL dos PSTs. Os resultados encontrados demonstraram que os PSTs promoveram aumento significativo na pressão de perfusão (PP) e na resistência vascular renal (RVR) nas concentrações de 3,0 e 4,5 µg/mL. O fluxo urinário (FU) diminuiu com a concentração de 1 µg/mL dos PSTs, porém sofreu aumento nas demais concentrações. O ritmo de filtração glomerular (RFG) diminuiu significativamente nas três concentrações. Foi observada diminuição do percentual de transporte dos eletrólitos cloreto, sódio e potássio. O Clearance Osmótico (C_{OSM}) foi diminuído e aumentado com as concentrações de 1,0 e 4,5 µg/mL, respectivamente. As alterações histológicas nos rins indicaram alterações tubular e glomerular. O tratamento de cultura de células com os PSTs causou redução da viabilidade celular em todas as concentrações estudadas (200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,12 µg/mL) não sendo concentração-dependente. Observou-se morte celular significativa, com evidências de um processo apoptótico, além de morte celular por apoptose tardia. Esses achados tentam colaborar para um melhor conhecimento acerca dos efeitos citotóxicos renais dessa alga e pode ainda propiciar a descoberta de novas ferramentas farmacológicas antitumorais.

Palavras-chave: *Gracilaria cornea*; Polissacarídeos sulfatados; Perfusão renal; Rim; Apoptose.

ABSTRACT

The red marine algae are a group of sea live beings able to produce sulfated polysaccharides. These polysaccharides are found in great amount in algae of *Gracilaria cornea* species and they also have several commercial uses, mainly in industrial fields. They are also used for scientific purposes because of its biologic activities. This work's goal is to evaluate the effects of sulfated polysaccharides total (SPTs) from the seaweed *Gracilaria cornea* contributing to a better understanding about its effects. First, we have studied SPTs effects in three concentrations (1 µg/mL, 3 µg/mL e 4,5 µg/mL), in the renal perfusion system aiming to evaluate the possible changes in kidney parameters. In this experimental model we used male Wistar rats (280-300 g). After the perfusion, the kidneys were subjects of histological analysis. The parameters were analysed using ANOVA and Student t-test ($p < 0,005$). The results we have found proved that SPTs promoted a significant increase in perfusion pressure (PP) and in renal vascular resistance (RVR) in concentrations 3,0 and 4,5 µg/mL. The urinary flow (UF) decreased with the 1 µg/mL SPTs concentration, but increased with the 3,0 and 4,5 µg/mL concentrations. The glomerular filtration rate (GFR) significantly decreased with all the three concentrations. We noticed a decrease in sodium, potassium and chloride transport. The Osmotic Clearance (C_{OSM}) decreased with 1,0 µg/mL concentration and increased with 4,5 µg/mL concentration. The histological changes were mild and included tubular and glomerular damages. We also investigated the side effects caused by SPTs in cultured renal tubular cells of the type MDCK (Madin-Darby canine kidney). MDCK cells were grown in plastic flasks at 37 °C in unidified atmosphere of 5% CO₂ – air with RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum. The SPTs caused decrease in cell viability in all studied concentrations (200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 and 3,12 µg/mL) and this effect did not depend on concentration. To evaluate the type of cell death caused by SPTs in MDCK cells, we performed annexin V-FITC and propidium iodide assays, respectively apoptosis and necrosis indicators. This analysis was made in a flow cytometry system with a 50 µg/mL SPTs concentration. We found a significant cell death amount, with apoptotic signs, and also late apoptotic cell death. These findings can improve the understanding about this algae biologic activities and help to find new pharmacologic antitumoral weapons.

Key-words: *Gracilaria cornea*; Sulfated polysaccharides; renal perfusion; Kidney; Apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação de uma galactana sulfatada de alga vermelha. Configuração D de uma unidade B.....	25
Figura 2: Alga da espécie Gracilaria córnea.....	36
Figura 3: Desenho esquemático do sistema de perfusão de rim isolado.....	38
Figura 4: Valores de pressão de perfusão (PP) registrados durante a calibração do sistema (n=6).....	39
Figura 5: Valores registrados pelo Fluxômetro (L/h) durante a calibração do sistema (n=6).....	39
Figura 6: Valores de volume urinário (mL/min) registrados durante a calibração do sistema (n = 6).....	40
Figura 7: Procedimento cirúrgico para retirada de rim isolado de rato. A: isolamento da veia femural para injeção de manitol; B: isolamento e fixação da cânula ao ureter; C: isolamento das artérias mesentérica e renal; D: cânula fixada a artéria renal.....	41
Figura 8: Pressão de Perfusão (PP) em rim isolado de ratos.....	52
Figura 9: Resistência Vascular Renal (RVR) em rim isolado de ratos.....	53
Figura 10: Fluxo Urinário (FU) em rim isolado de rato.....	55
Figura 11: Ritmo de Filtração Glomerular (RFG) em rim isolado de rato.....	56
Figura 12: Percentual do Transporte de Sódio (%TNa ⁺) em rim isolado de rato.....	58
Figura 13: Percentual do Transporte de Cloreto (%TC ⁻) em rim isolado de rato.....	59

Figura 14: Percentual do Transporte de Potássio (%TK ⁺) em rim isolado de rato.....	60
Figura 15: Clearance Osmótico (C _{OSM}) em rim isolado de rato.....	61
Figura 16: Fotomicrografia de rim esquerdo demonstrando túbulos (T) e glomérulo (G) normais (coloração de hematoxilina-eosina, aumento de 400X).....	63
Figura 17: Fotomicrografia de rim direito perfundido com solução de Krebs-Henseleit demonstrando túbulos (T) e glomérulo (G) normais (coloração de hematoxilina-eosina, aumento de 400X).....	63
Figura 18: Fotomicrografia de rim esquerdo demonstrando túbulos medulares (TM) normais (coloração de hematoxilina-eosina, aumento de 400X).....	64
Figura 19: Fotomicrografia de rim direito demonstrando túbulos medulares (TM) normais (coloração de hematoxilina-eosina, aumento de 400X).....	64
Figura 20: Fotomicrografias de rim direito perfundido com solução de Krebs-Henseleit e PSTs demonstrando glomérulos (G) lesionados com presença de material proteináceo (coloração de hematoxilina-eosina, aumento de 400X).....	65
Figura 21: Fotomicrografia de rim direito perfundido com solução de Krebs-Henseleit e PSTs demonstrando túbulos corticais (T) lesionados com presença de material proteináceo (coloração de hematoxilina-eosina, aumento de 400X).....	65
Figura 22: Fotomicrografia de rim direito perfundido com solução de Krebs-Henseleit e PSTs demonstrando túbulos medulares (TM) normais (coloração de hematoxilina-eosina, aumento de 400X).....	66
Figura 23: Efeito citotóxico dos polissacarídeos sulfatados totais (PSTs) da alga Gracilaria cornea nas concentrações de 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,12 µg/mL sobre células MDCK pelo método do MTT.....	67

Figura 24: Controle negativo de células MDCK não tratadas. Representação da marcação simultânea de anexina V-FITC e iodeto de proídio (PI)..... 68

Figura 25: Avaliação do potencial apoptótico dos polissacarídeos sulfatados (PSTs) da alga Gracilaria cornea sobre células MDCK..... 69

Figura 26: Porcentagem de células MDCK viáveis, de células MDCK com marcação de anexina V-FITC, com marcação de iodeto de propídio e com marcação dupla de anexina e iodeto de propídio..... 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação sistemática, segundo website algaebase e REVIERS.....	35
Tabela 2: Fórmulas utilizadas para determinação dos parâmetros renais.....	43
Tabela 3: Efeitos dos polissacarídeos sulfatados totais sobre a pressão de perfusão renal (PP).....	52
Tabela 4: Efeitos dos polissacarídeos sulfatados totais sobre a resistência vascular renal (RVR).....	53
Tabela 5: Efeitos dos polissacarídeos sulfatados totais sobre o fluxo urinário (FU).....	55
Tabela 6: Efeitos dos polissacarídeos sulfatados totais sobre o ritmo de filtração glomerular (RFG).....	56
Tabela 7: Efeitos dos polissacarídeos sulfatados totais sobre o percentual de transporte de sódio (%TNa ⁺).....	58
Tabela 8: Efeitos dos polissacarídeos sulfatados totais sobre o percentual de transporte de cloreto (%TCl ⁻).....	59
Tabela 9: Efeitos dos polissacarídeos sulfatados totais sobre o percentual de transporte de potássio (%TK ⁺).....	60
Tabela 10: Efeitos dos polissacarídeos sulfatados totais sobre o clearance osmótico (C _{OSM}).....	62
Tabela 11: Efeitos dos polissacarídeos sulfatados totais sobre os parâmetros renais.....	62
Tabela 12: Percentual de viabilidade celular dos experimentos realizados com os polissacarídeos sulfatados (PSTs) (n=3).....	67

Tabela 13: Porcentagem de células MDCK viáveis, de células MDCK com marcação de anexina V-FITC, com marcação de iodeto de propídio e com marcação dupla de anexina e iodeto de propídio dos experimentos realizados com os polissacarídeos sulfatados totais (PSTs) (n=3)..... 70

LISTA DE ABREVIATURAS

% TCl⁻	Percentual de cloreto transportado
%TK⁺	Percentual de potássio transportado
%TNa⁺	Percentual de sódio transportado
µg	Micrograma
µL	Microlitros
µmol	Micromolar
AMPKα	Proteína quinase ativada por AMP
ANOVA	Análise de Variância
CCP	Cloreto de cetilpiridínio
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa com Animais
Cosm	Clearance osmótico
DMSO	Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo
DOP in	Densidade ótica da inulina no perfusato
DOU in	Densidade ótica da inulina na urina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EK	Potássio excretado
ENa⁺	Sódio excretado
EPM	Erro padrão da média
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FSC	Forward light scatter
FTIR	Técnicas de espectroscopia no infravermelho
FK	Potássio filtrado
FNa⁺	Sódio filtrado
FPR	Fluxo de perfusão renal
FU	Fluxo urinário

HE	Hematoxilina-eosina
i.p	Intraperitoneal
IP	Iodeto de propídeo
IRA	Insuficiência renal aguda
MEC	Matriz extracelular
MEM	Meio essencial mínimo
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney
mg	Miligrama
mL	Mililitros
mmHg	Milímetros de mercúrio
MTT	3-(4,5-dimetilazil-2-il)-2,5 difenil tetrazólico
nm	Nanômetros
p	Significância estatística
PBS	Salina fosfatada
Posm	Osmolaridade do perfusato
PP	Pressão de perfusão
PSTs	Polissacarídeos sulfatados totais
RFG	Ritmo de filtração glomerular
RMN	Ressonância magnética nuclear
rpm	Rotação por minuto
RVR	Resistência vascular renal
SBF	Soro fetal bovino
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SSC	Side light scatter
U/mL	Unidades por mililitro
Uosm	Osmolaridade urinária

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
1.1 Algas marinhas.....	22
1.1.1 Algas do gênero Gracilaria.....	23
1.2 Características químicas e estruturais de polissacarídeos sulfatados de algas.....	23
1.3. Atividades biológicas dos polissacarídeos sulfatados.....	26
1.4 Alterações celulares envolvidas na insuficiência renal aguda.....	27
2 JUSTIFICATIVA.....	30
3 OBJETIVOS.....	32
3.1 Geral.....	33
3.2 Específicos.....	33
4 MATERIAS E MÉTODOS.....	34
4.1 Alga marinha.....	35
4.1.1 Extração de polissacarídeos sulfatados totais.....	36
4.2 Animais de experimentação.....	37
4.3 Perfusão de rim isolado.....	38
4.3.1 Sistema utilizado.....	38

4.3.2 Calibração do sistema.....	38
4.3.3 Solução perfusora.....	40
4.3.4 Técnica cirúrgica.....	40
4.3.5 Protocolo experimental.....	42
4.3.6 Análises bioquímicas.....	42
4.3.7 Cálculos de parâmetros funcionais renais.....	42
4.3.8 Estudo histológico.....	45
4.4 Avaliação da atividade sobre células renais.....	45
4.4.1 Cultivo e tratamento das células MDCK.....	45
4.4.2 Testes de viabilidade celular.....	46
4.4.2.1 Ensaio com MTT.....	46
4.4.2.2 Protocolo experimental.....	46
4.4.3 Avaliação do tipo de morte celular.....	47
4.4.3.1 Detecção da externalização de fosfatidilserina e da perda de permeabilidade de membrana.....	48
4.4.3.2 Protocolo experimental.....	49
4.4 Análises estatísticas.....	49

4.5 Aspectos éticos.....	49
5 RESULTADOS.....	50
5.1 Perfusão renal.....	51
5.1.1 Histologia dos rins perfundidos com os polissacarídeos sulfatados totais.....	63
5.2 Cultura de células MDCK (ensaios de viabilidade e proliferação celular).....	66
5.1.1 Ensaio com MTT.....	66
5.1.2 Citometria de fluxo (FACS).....	68
6 DISCUSSÃO.....	71
7 CONCLUSÃO.....	80
8 REFERÊNCIAS.....	82

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Algas marinhas

As algas marinhas são um grupo de seres vivos autotróficos que habitam os mais diversos ambientes, como oceanos, água doce, solos e tronco de árvores. Possuem uma variação morfológica bastante diversificada apresentando-se como seres multicelulares e unicelulares, podendo ainda ser procarióticas ou eucarióticas. As macroalgas são classificadas como talófitas que são plantas inferiores, por apresentarem uma estrutura simples, não vascularizada, com ausência de raiz, caule e folhas. Apresentam similaridade em muitos aspectos comuns com as plantas superiores em relação à composição de carboidratos, proteínas e pigmentos fotossintéticos. Muitos autores classificam as algas não como vegetais e sim como protistas (SZE, 1997; VAN DEN HOEK; MANN; JAHNS, 1989; LEE, 1989).

São organismos clorofilados que apresentam a clorofila tipo a como principal pigmento fotossintetizante. Apesar da presença desse pigmento principal nem todas as macroalgas apresentam coloração verde, pois outros pigmentos podem estar presentes mascarando o verde da clorofila. As algas marinhas dividem-se em subgrupos de acordo a presença desses pigmentos, estando inseridas em três grandes filos principais: Chlorophyta representado pelas algas verdes, Phaeophytas representados pelas algas marrons ou pardas e Rhodophyta representado pelas algas vermelhas. Porém existem ainda algas de coloração azulada e até negras (SOUTH; WHITTICK, 1987).

INCOMPLETO NA BIBLIOG

Além de pigmentos que definem a coloração das algas, estas possuem em sua composição outras substâncias como as hemaglutininas de importância científica e comercial, que as tornam fontes para obtenção de diferentes compostos naturais. Hemaglutininas foram relatadas em extratos de algas marinhas pela primeira em 1966 (BOYD; ALMODOVAR; BOYD, 1993). Bastante relevante também é a utilização de algas pela indústria alimentícia. Estas são amplamente utilizadas na manufatura de alimentos devido a presença de alguns compostos. As macroalgas também representam fontes excelentes de vitamina C, vitamina A, vitamina D e vitamina B12, além de fornecerem aminoácidos livres, carotenóides e diversos elementos requeridos para a nutrição humana (SOUTH; WHITTICK, 1987).

Os carboidratos são encontrados em grandes concentrações nas algas marinhas (PERCIVAL; McDOWELL, 1967). São muito consumidos pelo homem apesar de não

serem digeridos, porém os mesmos apresentam propriedade gelificante que os tornam úteis na fabricação de uma série de produtos. São utilizados como espessantes, emulsificantes e estabilizantes e estão presentes em uma grande variedade de fórmulas na indústria alimentícia (MARINHO-SORIANO, 2001a; MACIEL *et al.*, 2008). Logo, as algas são de grande interesse científico e econômico para o Homem, tendo utilidade em diversos setores, como na indústria farmacêutica e na biotecnologia (GREENWELL *et al.*, 2008; ARAÚJO *et al.*, 2008; LEVRING; HOPPE; SCHMID, 1969; FARIAS; NAZARETH; MOURÃO 2001).

1.1.1 Algas do gênero *Gracilaria*

As algas marinhas do gênero *Gracilaria* estão inseridas no filo Rhodophyta representado pelas algas vermelhas. Ocorrem em todas as latitudes, sendo mais abundantes na região equatorial. Predominam nas regiões entremarés, podendo também ser encontradas em profundidades de aproximadamente 200 m (LEE, 1989). São comuns ao longo da costa brasileira, sendo mais abundantes e diversificadas na costa nordeste do país (SAITO; OLIVEIRA, 1990).

Essas algas de coloração vermelha, além da clorofila a, possuem outros pigmentos na sua constituição. A clorofila d, típica deste grupo, além das ficobiliproteínas. Essas últimas são de três tipos: a ficoeretrina, a ficocianina e a aloficocianina. A ficoeretrina, pigmento fotossintetizante acessório encontrado no interior dos cloroplastos, é o responsável pela coloração vermelha dessas algas. Já a ficocianina e a aloficocianina são pigmentos encontrados em menor quantidade (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007). A maior parte das espécies está distribuída nos oceanos, sendo comuns em locais protegidos de batimentos de ondulações. Essas algas são pouco resistentes a exposição ao ar e possuem elevada variação nas condições ambientais relacionada a salinidade, temperatura e circulação de água. Podem se encontrar presas a rochas, substratos calcários, paredes oceânicas ou ainda sobre conchas de moluscos ou outras algas (VAN DEN HOEK *et al.*, 1989).

1.2 Características químicas e estruturais de polissacarídeos sulfatados de algas

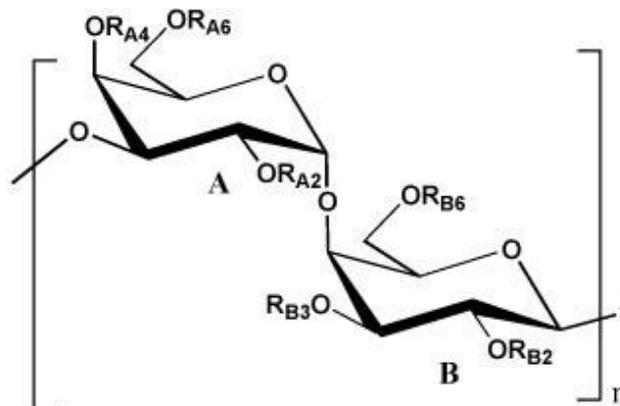
Nas últimas décadas, grande importância econômica foi atribuída as macroalgas marinhas devido aos seus compostos presentes na matriz extracelular (MEC). Estes compostos compreendem alginatos e galactanas. Alginatos são polímeros constituídos

de monossacarídeos ácidos, incluindo ácido galurônico e manurônico de consistência viscosa. As galactanas também são componentes produzidos e constituídos de polissacarídeos. Esses polissacarídeos são sulfatados contendo predominantemente o monossacarídeo galactose (PERCIVAL; McDOWELL, 1967). As algas vermelhas também são fontes ricas de polissacarídeos sulfatados que possuem diversas finalidades comerciais. Do ponto de vista econômico, as algas pertencentes a divisão Rhodophyta, são as mais exploradas uma vez que sintetizam uma grande variedade desses açúcares sulfatados como componentes de matriz extracelular (DE RUITER & RUDOLPH, 1997). São utilizados nos diversos setores industriais, como na produção de meios de cultura na área da pesquisa, produção de cosméticos e medicamentos e na fabricação de produtos. (TRIOUS & SEBRANEK 1996; RASMUSSEM & MORRISSEY, 2007).

Polissacarídeos sulfatados são macromoléculas encontradas em grandes concentrações na MEC das algas marinhas. Esses compostos apresentam diversas formas bioquímicas, como fucoidanas, arabino-galactanas e galactanas. Esta última é a forma prevalente nas algas vermelhas (BERTEAU & MULLOY, 2003; PERCIVAL & McDOWELL, 1967), porém outros polissacarídeos sulfatados podem ser encontrados nas algas vermelhas como as xilomananas (CARDOSO, 2007). Nas algas pardas (Phaeophyta) são prevalentes as fuicodanas e nas algas verdes as arabino-galactanas e raminoses. Dentre suas funções biológicas na MEC estão proteção contra desidratação solar, devido a presença de cargas negativas com propriedades de solvatação e proteção mecânica, como flexibilidade e rigidez, conferidas a esses seres, favorecendo a sobrevivência no ambiente marinho (KLOAREG & QUATRANO, 1998). As galactanas sulfatadas encontradas nas algas vermelhas são formadas de galactoses, ou compostos derivados, dispostas em uma cadeia linear contendo unidades repetitivas de dissacarídeos formadas por β -galactose (unidade A) ligada através dos carbonos C-1 ao C-3 de uma α -galactose (unidade B). As unidades dissacarídicas, por sua vez, são unidas através dos carbonos C-1 e C-4. A unidade A dessas galactanas sempre se apresenta na configuração enantiomérica D-, enquanto a unidade B pode se apresentar na configuração enantiomérica D-, sendo uma carragenana, como na L-, sendo uma agarana (USOV, 1984; PAINTER, 1983; MARINHO-SORIANO & BOURRET 2005). A Figura 1 mostra a estrutura química de uma carragenana. Estudos estruturais mais detalhados demonstram um terceiro grupo de galactanas, os híbridos D/L, em que as unidades B apresentam configuração D- e L- na mesma molécula (STORZ & CERREZO, 2000). Vários outros aspectos quanto à estrutura e o metabolismo de

polissacarídeos de algas podem ser encontrados em revisões específicas (PERCIVAL; MCDOWELL, 1967).

Figura 1: Representação de uma galactana sulfatada de alga vermelha com suas duas unidades monossacarídicas A e B com configurações enantioméricas D (carregenana).



Fonte: DELATTRE; FENORADOSOA; MICHAUD, 2011.

Estudos mostram ainda que a estrutura e a composição química dos polissacarídeos sulfatados de algas marinhas variam entre espécies (DIETRICH *et al.*, 1995), localidade e época do ano de coleta das algas, além da metodologia de extração utilizada (PERCIVAL; MCDOWELL, 1967), podendo cada molécula assumir conformação estrutural própria o que influi em suas atividades biológicas. A *Gracilaria cornea*, assim como algas marinhas vermelha da ordem Gracilariales, representam as principais fontes de agaranas. Essa espécie de alga apresenta um ágar rico em 3,6-anidrogactose, galactoses metiladas, glucose, xilose e grupos sulfatados e são compostos que apresentam uma variação de massa molecular bem diversificada (MELO *et al.*, 2002). Logo, a compreensão acerca das características químicas e estruturais dessas substâncias é importante, uma vez que há relações entre as atividades biológicas e os padrões estruturais desses compostos complexos e heterogêneos (FARIAS *et al.*, 2000; MOURÃO & PEREIRA, 1999). Para o estudo dos efeitos biológicos dos polissacarídeos de algas, modelos experimentais com animais têm sido ferramentas importantes para averiguar os efeitos de diferentes polissacarídeos no desenvolvimento de novas drogas para o homem (MOURÃO; PEREIRA, 1999; FONSECA *et al.*, 2008).

Estudos mostram ainda que a estrutura e a composição química dos polissacarídeos sulfatados de algas marinhas variam entre espécies (DIETRICH *et al.*, 1995), localidade e época do ano de coleta das algas, além da metodologia de extração utilizada (PERCIVAL; MCDOWELL, 1967), podendo cada molécula assumir conformação estrutural própria o que influi em suas atividades biológicas. A *Gracilaria cornea*, assim como algas marinhas vermelha da ordem Gracilariales, representam as principais fontes de agaranas. Essa espécie de alga apresenta um ágar rico em 3,6-anidrogactose, galactoses metiladas, glucose, xilose e grupos sulfatados e são compostos que apresentam uma variação de massa molecular bem diversificada (MELO *et al.*, 2002). Logo, a compreensão acerca das características químicas e estruturais dessas substâncias é importante, uma vez que há relações entre as atividades biológicas e os padrões estruturais desses compostos complexos e heterogêneos (FARIAS *et al.*, 2000; MOURÃO & PEREIRA, 1999). Para o estudo dos efeitos biológicos dos polissacarídeos de algas, modelos experimentais com animais têm sido ferramentas importantes para averiguar os efeitos de diferentes polissacarídeos no desenvolvimento de novas drogas para o homem (MOURÃO; PEREIRA, 1999; FONSECA *et al.*, 2008).

1.3 Atividades biológicas dos polissacarídeos sulfatados

Polissacarídeos de algas marinhas apresentam diversas atividades biológicas, tais como antitumoral (LINS *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2004; ZHOU *et al.*, 2004), anticoagulante (FARIAS *et al.*, 2000; MATSUBARA *et al.*, 2001; RODRIGUES *et al.*, 2010; RODRIGUES *et al.*, 2009^a), antiviral (HAYASHI; HAYASHI; KOJIMA, 1996; TALARICO *et al.*, 2005), imunomodulatória (ZVYAGINTSEVA *et al.*, 2000), antitrombótica (QUEIROZ *et al.*, 2010), anti-inflamatória e antinociceptiva (ASSREUY *et al.*, 2008; COURA *et al.*, 2012). Dentre as atividades biológicas mais estudadas dos polissacarídeos sulfatados, destacam-se as atividades anticoagulante e antitrombótica. Seus efeitos sobre a coagulação sanguínea não ocorrem meramente como uma função de densidade de cargas, mas também de composição monossacarídica, posição do radical sulfato, dos sítios de sulfatação e, principalmente, da ocorrência de unidades dessulfatadas (FARIAS *et al.*, 2000; FONSECA *et al.*, 2008; MOURÃO, 2004). Neste contexto, diferentes mecanismos anticoagulantes têm sido propostos para os

polissacarídeos sulfatados de algas marinhas, buscando-se assim relacioná-los aos da heparina (QUEIROZ, 2010).

Com relação aos polissacarídeos das algas vermelhas, as galactanas, há muitos resultados na literatura que mostram uma série de atividades farmacológicas desses compostos. Huheihel *et al.* (2002) estudaram as atividades antivirais de polissacarídeos extraídos da microalga vermelha *Porphyridium* sp contra o vírus da herpes, HSV-1 e HSV-2. Zhou *et al.* (2004) estudaram a atividade antitumoral de galactanas de *Chondrus ocellatus* e relacionaram este efeito com a massa molecular dos compostos. Os polissacarídeos de menor tamanho possuíam efeito antitumoral mais acentuado. Galactanas originárias da alga vermelha *Bostrychia montagnei* e *Porphyra columbina* demonstraram atividade antiproliferativa em linhagem tumoral de células de colo uterino (STEVAN *et al.*, 2001). Estudos realizados com polissacarídeos sulfatados (carregenanais) de três tipos de algas mostraram atividade antimalárica, inibindo o crescimento do *Plasmodium falciparum* em experimentos *in vitro* (ADAMS *et al.*, 2005). Zvyagintseva *et al.* (2000) demonstraram atividades imunomodulatórias de polissacarídeos sulfatados sobre o sistema complemento, inibindo a ação de proteínas desse sistema. Foram demonstradas as atividades antinociceptiva e antiinflamatória em camundongos dos polissacarídeos sulfatados totais de *Gracilaria cornea* (COURA *et al.*, 2012). Em síntese, os açúcares derivados de algas têm atraído grande interesse por possuírem uma gama de atividades biológicas. Polissacarídeos sulfatados têm uma variedade de utilidades não só nos diversos setores industriais, mas são objetos de diversos estudos e vêm cada vez mais demonstrando uma gama de atividades biológicas.

1.4 Alterações celulares envolvidas na insuficiência renal aguda

Alguns fatores estão envolvidos no desenvolvimento de insuficiência renal aguda em resposta a danos causados por determinados compostos que podem promover lesões específicas a nível celular. O rim, após sofrer uma lesão inicial, desenvolve respostas moleculares que podem levar a célula a apresentar diferentes processos. Quatro tipos de processos são considerados na IRA: a necrose, a apoptose, a divisão celular ou comportamento indiferente ao estresse (VIERIA, 2001). Em células renais a morte celular por necrose resulta de efeitos combinados de várias vias bioquímicas, como a depleção severa de reservas de energia celular (ATP), aumento do cálcio citosólico

livre, geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) e a ativação de várias enzimas, como fosfolipases, proteases e endonucleases (BOUJRAD *et al.*, 2007). A apoptose também pode ser desencadeada por diversos fatores, entre eles, a ligação de moléculas aos receptores de membrana, agentes quimioterápicos, radiação ionizante, danos no DNA, choque térmico, deficiência de fatores de crescimento, baixa quantidade de nutrientes e níveis aumentados de espécies reativas do oxigênio (HENGARTNER, 2000).

A morte celular, definida como perda irreversível da estrutura e funções vitais da célula, ocorre por dois processos morfológicamente distintos: necrose e apoptose. A necrose se caracteriza pela perda da integridade da membrana plasmática e sua permeabilidade. Diferentes insultos podem levar à perda abrupta da integridade da membrana plasmática (citólise) e à alteração de seus gradientes eletroquímicos. Ainda, a liberação dos constituintes intracelulares para o meio extracelular estimula a resposta inflamatória e ampliam a lesão tecidual. O fenômeno de morte celular por necrose é facilmente reconhecido nos espécimes de biopsia porque os restos celulares permanecem por longo período antes de serem removidos pelas células inflamatórias (PATEL, 2000).

Já a apoptose é um processo ativo cuja marca registrada é a autodigestão controlada dos constituintes celulares, devida à ativação de proteases endógenas. A ativação dessas proteases compromete a integridade do citoesqueleto, provocando verdadeiro colapso da estrutura celular. Em resposta à contração do volume citoplasmático, a membrana celular forma bolhas e altera o posicionamento de seus lipídios constituintes. A distribuição de fosfatidilserina, um desses lipídeos, se faz primariamente no folheto interno da membrana plasmática. Durante o processo de apoptose a mesma se expõe no folheto externo da membrana. Este novo posicionamento serve como sinalizador para que células fagocíticas teciduais englobem os fragmentos celulares e completem o processo de degradação. Durante a apoptose também ocorrem alterações características no núcleo celular graças à ativação de endonucleases que degradam o DNA. Como resultado, o núcleo torna-se picnótico e a cromatina se condensa nas porções adjacentes à membrana nuclear. Finalmente, o núcleo entra em colapso e se fragmenta. Simultaneamente, as bolhas que se formam no citoplasma separam a célula em fragmentos circundados por membrana, contendo partes do núcleo e organelas intactas (corpos apoptóticos). Os restos celulares são fagocitados pelos macrófagos teciduais ou células adjacentes (THOMPSON, 1999).

Um dos aspectos que distingue a apoptose da necrose é, nessa, a preservação da integridade da membrana plasmática que evita a liberação dos constituintes celulares para o meio extracelular e, conseqüentemente, a quimiotaxia e a ativação de células fagocíticas. Em condições patológicas, o grande número de células que sofre apoptose pode suplantiar a capacidade fagocitária de um determinado tecido. Nessas circunstâncias, os corpos apoptóticos não-fagocitados sofrem processo secundário de necrose, com resposta inflamatória (PATEL & GORES, 1998). Tendo em vista os eventos envolvidos no processo de injúria renal e diante da importância clínica desta patologia, neste trabalho estudaremos a nefrotoxicidade da alga sobre o sistema de perfusão renal e células tubulares renais, podendo contribuir para esclarecer os mecanismos fisiopatológicos.

JUSTIFICATIVA

2 JUSTIFICATIVA

Atualmente estudos com algas marinhas vêm demonstrando atividades biológicas pertencentes a estes compostos nas mais diversas áreas da pesquisa. A ampliação do conhecimento sobre as ações das algas e suas frações em diversas linhagens celulares objetiva elucidar mecanismos fisiopatológicos, assim como buscar ferramentas biologicamente ativas (LINS *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2004; ZHOU *et al.*, 2004). Até o presente momento são desconhecidos os efeitos do extrato bruto e qualquer fração obtida de algas marinhas no sistema renal. Uma vez que a espécie de alga *Gracilaria cornea* é bastante prevalente no litoral cearense e são enormemente consumidas na indústria alimentícia, é relevante estudar os efeitos dos polissacarídeos sulfatados da referida espécie de alga no sistema renal, uma vez que estes compostos representam uma parcela elevada desses seres marinhos.

A utilização de modelos experimentais para investigar os efeitos renais causados por substâncias tem mostrado alterações renais importantes (DA SILVA; LÓPEZ; GODOY, 1979; REZENDE *et al.*, 1989; CHAVES *et al.*, 1989). A elucidação dos mecanismos de ação envolvidos nas alterações de função renal é de muita relevância, não só para descoberta de mediadores químicos relacionados à mecanismos fisiológicos, mas também para buscar a descoberta de substâncias com valor terapêutico, uma vez que produtos naturais marinhos representam verdadeiras fontes de substâncias com efeitos farmacológicos, como já demonstrados por vários pesquisadores. O estudo que avalia a atividade dos polissacarídeos sulfatados totais da alga *Gracilaria cornea* no sistema de perfusão renal e em culturas de células renais representa um trabalho inédito que fornecerá dados para o uso destas moléculas como ferramentas farmacológicas, além de buscar conhecimentos relacionados à nefrotoxicidade renal.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar os efeitos dos polissacarídeos sulfatados totais (PSTs) da alga marinha *Gracilaria cornea* sobre a função renal e em células tubulares renais, com o propósito de buscar conhecimentos acerca da nefrotoxicidade renal.

3.2 Específicos

- Avaliar o rendimento dos PSTs de *G. cornea* obtido por digestão enzimática;
- Avaliar os efeitos dos PSTs sobre alguns parâmetros renais, como pressão de perfusão, resistência vascular renal, fluxo urinário, ritmo de filtração glomerular, transporte de eletrólitos e *clearance* osmótico;
- Avaliar as alterações histológicas renais produzidas por PSTs;
- Avaliar os efeitos dos PSTs sobre a viabilidade das células tubulares renais;
- Avaliar o potencial apoptótico e/ou necrótico dos PSTs sobre células tubulares renais;

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAS E MÉTODOS

4.1. Alga marinha

Os PSTs da espécie de alga marinha vermelha *Gracilaria cornea* foram gentilmente cedidos pela professora Dra Norma Maria Barros Benevides, coordenadora do Laboratório de Carboidratos e Lectinas (CarboLec) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará (UFC). A *Gracilaria cornea* foi classificada de acordo com o website www.algaebase.org e REVIERS, onde amostras (n° de exsicata 34739) foram depositadas no Herbário Prisco Bezerra no Departamento de Ciências Biológicas da UFC.

Tabela 1: Classificação sistemática, segundo website [algaebase](http://www.algaebase.org) e REVIERS.

Classificação Filogenética	
Reino	Plantae
Subreino	Biliphyta
Filo	Rhodophyta
Subfilo	Eurhodophytina
Classe	Florideophyceae
Subclasse	Rhodymeniophycidae
Ordem	Gracilariales
Família	Gracilariaceae
Gênero	<i>Gracilaria</i>
Espécie	<i>Gracilaria cornea</i>

Espécimes de *Gracilaria cornea* (figura 2) foram coletadas na Praia cearense de Flecheiras, Município de Trairi-CE. Posteriormente foram conduzidas em caixas isotérmicas e estocadas (-20 °C) no Laboratório de Carboidratos e Lectinas de Algas Marinhas (CarboLec) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará. No laboratório, as algas foram limpas para a retirada de epífitas e/ou organismos incrustantes, lavadas com água destilada, secas à temperatura ambiente (25 °C) e armazenadas para posterior uso.

Figura 2: Alga da espécie *Gracilaria cornea*.



Fonte: <http://taibif.org.tw/nbrpp/algae.php?select=Gracilaria+arcuata>

4.1.1 Extração de polissacarídeos sulfatados totais

Ágar é considerado uma mistura complexa de polissacarídeos obtidos de algas vermelhas conhecidas como agarophytes (MARINHO-SORIANO, 2001). O produto químico do ágar da *Gracilaria cornea* foi previamente caracterizado na FTIR e análise espectroscópica RMN. Os componentes estruturais dos polissacarídeos são principalmente 3,6-anidro- α -L-galactoses (3,6 AG). Foram também detectados componentes secundários tais como a 6-O-metil-galactose, glicose, xilose e grupos sulfatos (MELO *et al.*, 2002).

Para a extração dos Polissacarídeos Sulfatados Totais (PSTs) foi utilizado protocolo com algumas modificações, como descrito abaixo (Farias *et al.*; 2000). Aproximadamente 5 g da alga foi desidratada e macerada com nitrogênio líquido com a finalidade de aumentar a área superficial de contato com o tampão de extração. Esse material foi submetido à digestão com uma mistura de 250 mL de tampão acetato de sódio (tampão AcNa) 0,1 M (pH 6,0) contendo cisteína e EDTA (5 mM) e 1020 mg de

papaína bruta em banho-maria à 60 °C por 6 h. Em seguida, o material foi filtrado em tela de náilon. Ao resíduo foi adicionado 140 mL de água destilada e filtrado novamente. Os filtrados foram reunidos, centrifugados ($6.000 \times g$; 4 °C; 20 min.) e ao sobrenadante adicionados 17 mL de uma solução cloreto de cetilpiridínio (CCP) a 10% por 2 h em temperatura ambiente para precipitação dos polissacarídeos. Logo após a precipitação, a mistura foi centrifugada ($6.000 \times g$; 4 °C; 20 min.), sendo o sobrenadante descartado. O precipitado obtido foi lavado com 600 mL de CCP a 0,05% e centrifugado nas mesmas condições e posteriormente dissolvido em 150 mL de solução NaCl 2 M: etanol comercial (100:15; v/v). Logo após a dissolução, os PS foram novamente precipitados seguido da adição de 300 mL de etanol comercial à 4 °C por 24 h. Após esse período de precipitação, o material foi centrifugado e lavado com 300 mL de etanol comercial a 80% (2 ×) e uma vez com etanol comercial (300 mL). Ao final do processo, o material foi dialisado repetidamente contra água destilada e liofilizado para obtenção dos PSTs. A caracterização química dos PSTs foi realizada conforme Coura *et al.* (2012). Foi realizada a determinação de carboidratos totais, do teor de sulfato e de proteínas.

4.4 Animais de experimentação

Foram utilizados ratos *Wistar*, machos, com massa corpórea variando entre 250 e 300g, obtidos do Biotério Central do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno, climatizados entre $22 \pm 0,5^\circ\text{C}$, luminosidade (12 horas de ciclo claro/escuro), umidade e circulação de ar controlados e recebendo ração padrão (Biotec®) e água “ad libitum”. Os mesmos foram mantidos em jejum de 8 a 12 horas antes dos experimentos de perfusão renal, com água “ad libitum”.

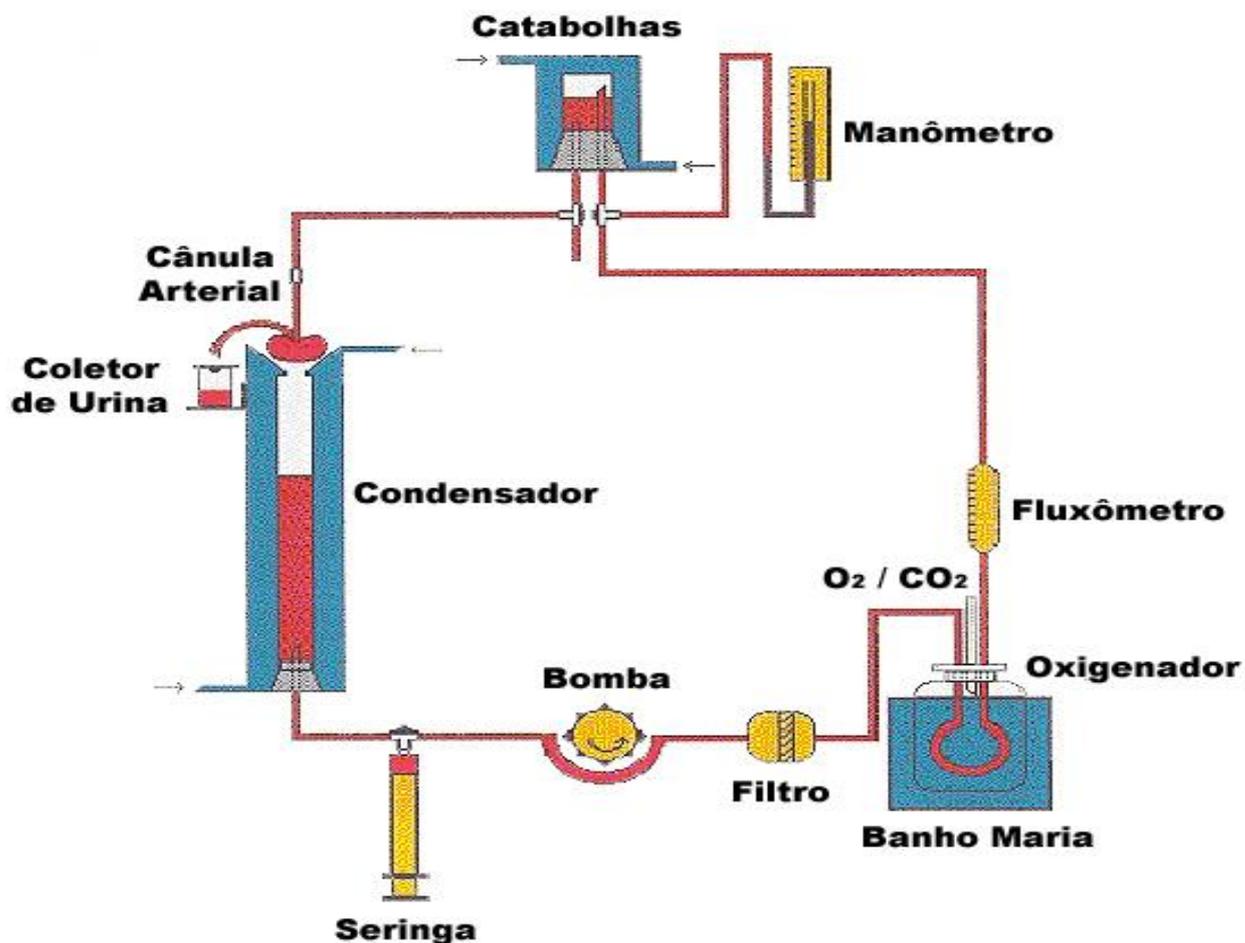
4.5 Sistema de perfusão de rim isolado

4.3.1 Sistema de perfusão utilizado

O sistema consiste na perfusão de rim isolado com recirculação (FONTELES *et al.*, 1983) com dois subsistemas, um in situ e outro em circuito fechado, para perfusão in vitro, mantidos ambos à mesma temperatura de 37 °C. Este sistema apresenta como vantagem a manutenção constante de parâmetros funcionais renais com utilização de

albumina na solução perfusora, em menor volume, mantendo constantes as substâncias dialisáveis com oxigenação adaptada ao próprio sistema, como mostra a figura 3 que representa o esquema demonstrativo do sistema.

Figura 3: Desenho esquemático do sistema de perfusão de rim isolado.



Fonte: LAFAVET-UFC

4.3.2 Calibração do sistema

Antes de cada experimento, o sistema foi calibrado utilizando salina, avaliando em cada uma das velocidades das bombas a pressão de perfusão (PP) em mmHg, o fluxo urinário (L/h) e o volume de urina coletado em um minuto (mL/min). Os resultados estão demonstrados nas figuras 4, 5 e 6.

Figura 4: Valores de pressão de perfusão (PP) registrados durante a calibração do sistema (n=6)

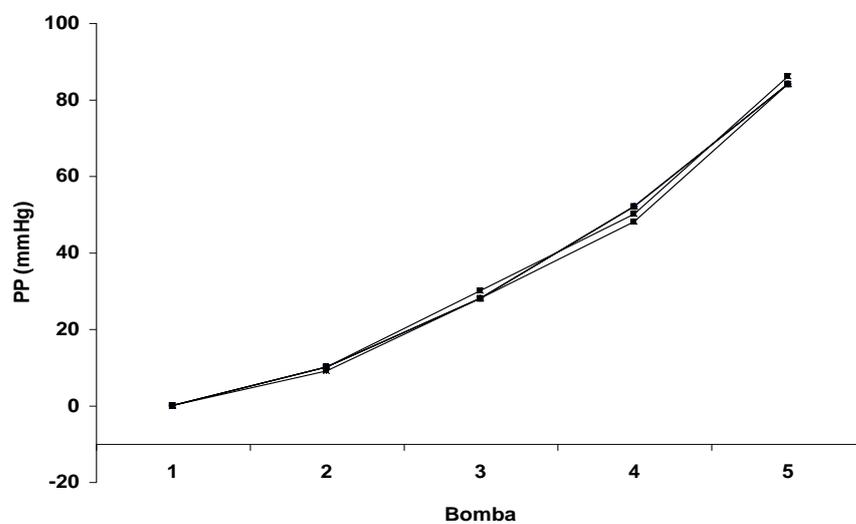


Figura 5: Valores registrados pelo Fluxômetro (L/h) durante a calibração do sistema (n=6)

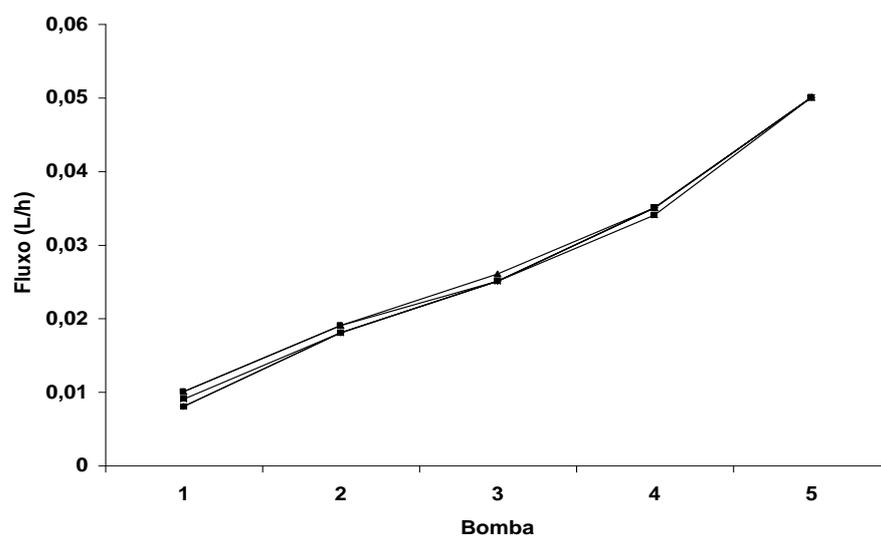
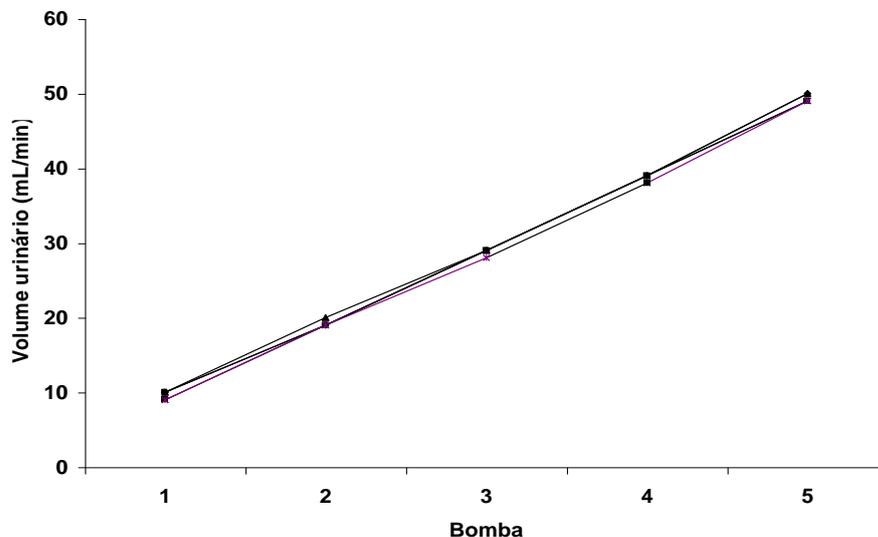


Figura 6: Valores de volume urinário (mL/min) registrados durante a calibração do sistema (n = 6)



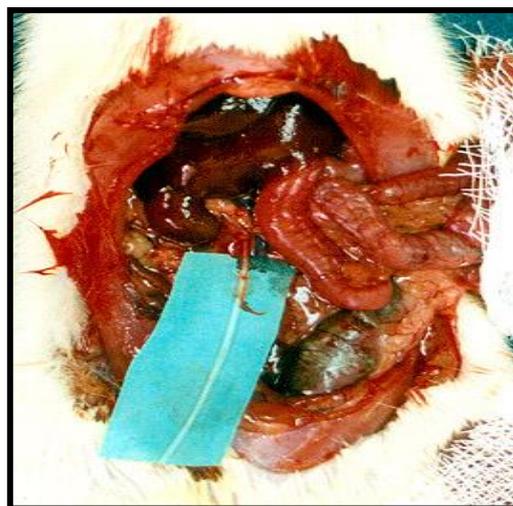
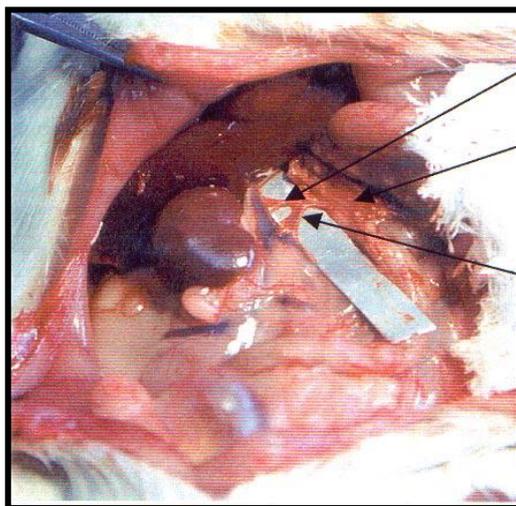
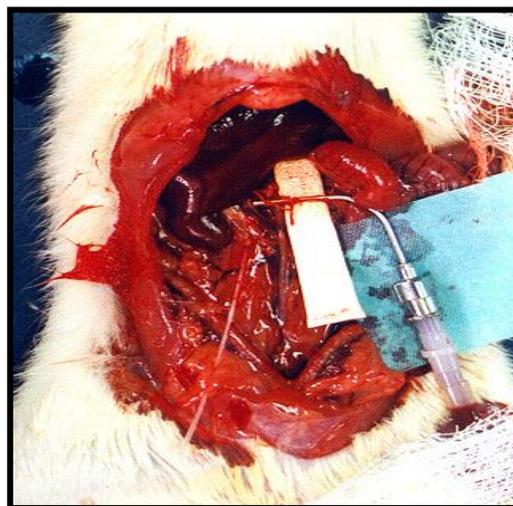
4.3.3 Solução perfusora

A solução perfusora utilizada foi Krebs-Henseleit na quantidade de 100 mL. A solução contém albumina a 6% dialisada por 48 horas antes do experimento para retirar várias substâncias contaminantes como citrato, piruvato, lactato (HANSON & BALLARD, 1968).

4.3.4 Técnica cirúrgica

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico na dose de 50 mg/Kg de peso corporal. Inicialmente a veia femoral foi isolada e o manitol (100 mg) administrado, a fim de facilitar a canulação posterior do ureter. Após assepsia da parede abdominal, procedeu-se uma incisão mediana e duas incisões perpendiculares à linha alba, para uma melhor observação das estruturas anatômicas. Reverteram-se as vísceras abdominais para o lado esquerdo, a fim de facilitar a visualização do rim direito e estruturas circunvizinhas (figura 7).

Figura 7: Procedimento cirúrgico para retirada de rim isolado de rato. **A:** isolamento da veia femoral para injeção de manitol; **B:** isolamento e fixação da cânula ao ureter; **C:** isolamento das artérias mesentérica e renal; **D:** cânula fixada a artéria renal.

**A****B****C****D**

Fonte: LFAVET-UFC

Com uma lupa (7X) a artéria mesentérica superior foi identificada e dissecada, bem como o ureter e a glândula supra-renal. O rim direito foi descapsulado e a glândula supra-renal isolada. Injetou-se mais 100 mg de manitol pela veia femoral. A cânula arterial renal foi introduzida na artéria mesentérica superior até a artéria renal, onde foi feita a fixação da cânula. No início do procedimento cirúrgico uma parte da solução perfusora (40 mL) foi desviada para o sistema de perfusão in situ, já oxigenada, para perfundir o rim ainda in vivo evitando qualquer isquemia do órgão. Finalmente o rim foi transportado para o sistema de perfusão in vitro, sem interrupção do fluxo.

4.3.5 Protocolo experimental

Os experimentos foram iniciados após a estabilização e adaptação do órgão às novas condições. Os polissacarídeos sulfatados totais (PSTs) da alga *Gracilaria cornea* nas concentrações de 1µg/mL, 3µg/mL e 4,5µg/mL (1mg, 3mg e 4,5mg em 100mL) foram administrados no sistema de perfusão de rim isolado 30 minutos após o início dos experimentos. Os 30 minutos iniciais de cada experimento foram considerados como controle interno para análises estatísticas com os outros tempos de perfusão. A cada cinco minutos foram registrados a pressão de perfusão e o fluxo de perfusão em manômetro e fluxômetro, respectivamente, em um período total de 120 minutos de experimento. As amostras de urina e perfusato foram coletadas a cada dez minutos e depois congeladas a -20 °C para posterior dosagem de sódio, potássio, cloreto, inulina e osmolaridade, importantes na determinação dos parâmetros de função renal.

O grupo controle externo, aquele que os rins foram perfundidos somente com a solução de Krebs-Heinseleit, mostra a manutenção normal de todos os parâmetros renais estudados durante os 120 minutos de perfusão, demonstrando a viabilidade dos rins perfundidos, onde estes órgãos são capazes de se manter em ótimas condições fisiológicas durante os experimentos.

4.3.6 Análises bioquímicas

Nas amostras de urina e perfusato foram realizadas dosagens de sódio, potássio e cloreto pelo método do íon eletrodo seletivo (RapidChem &44 - Bayer^R diagnóstica). A inulina do perfusato e urina foram determinadas por hidrólise direta, conforme Walser *et al.* (1955) e Fonteles *et al.* (1983), com modificações que reduziram as quantidades de amostras e reagentes utilizados. As osmolaridades das amostras de urina e perfusato foram medidas utilizando um osmômetro (Osmômetro de Pressão a Vapor - modelo WESCOR^R 5520). Essas análises foram realizadas no Laboratório de Farmacologia de Venenos e Toxinas (LFAVET) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

4.3.7 Cálculos de parâmetros funcionais renais

As seguintes fórmulas apresentadas na tabela 2 foram utilizadas para determinação de parâmetros funcionais renais (MARTINEZ-MALDONADO *et al.*, 1978; FONTELES, 1983).

Tabela 2: Fórmulas utilizadas para determinação dos parâmetros renais.

1. $FU (mL.g^{-1}.min^{-1}) = Fluxo\ urinário$
$FU = (Peso\ do\ volume\ urinário / Peso\ do\ rim\ esquerdo) \times 10$ (admitiu-se que a urina possui a mesma densidade da água)
2. $PP (mmHg) = Pressão\ de\ perfusão$
Leitura em manômetro.
3. $RFG (mL.g^{-1}.min^{-1}) = Ritmo\ de\ filtração\ glomerular$
$RFG = (DOU\ in / DOP\ in \times FU)$ sendo $DOU\ in =$ densidade ótica da inulina na urina e $DOP\ in =$ densidade ótica da inulina no perfusato
4. $FPR (mL.g^{-1}.min^{-1}) = Fluxo\ de\ perfusão\ renal$
Registrado a cada 10 min/peso do rim/ intervalo de tempo)
5. $RVR (mmHg/mL.g^{-1}.min^{-1}) = Resistência\ vascular\ renal$
$RVR = PP (mmHg) / FPR$
6. $FNa^{+} (mEq.g^{-1}.min^{-1}) = Sódio\ filtrado$
$FNa^{+} = RFG \times PNa^{+}$ ($PNa^{+} =$ Concentração de sódio no perfusato)
7. $ENa^{+} (mEq.g^{-1}.min^{-1}) = Sódio\ excretado$
$ENa^{+} = FU \times UNa^{+}$ ($UNa^{+} =$ Concentração de sódio na urina)
8. $TNa^{+} (mEq.g^{-1}.min^{-1}) = Sódio\ transportado$
$TNa^{+} = FNa^{+} - ENa^{+}$

<p>9. %TNa⁺ = Percentual de sódio transportado</p> $\%TNa^+ = TNa^+ \times 100 / FNa^+$
<p>10. Cosm (mL.g⁻¹.min⁻¹) = Clearance osmótico</p> <p>[Uosm / Posm] x FU (onde Uosm = Osmolaridade urinária e Posm = Osmolaridade do perfusato)</p>
<p>11. FK⁺ (mEq.g⁻¹. min⁻¹) = Potássio filtrado</p> $FK^+ = RFG \times PK^+ \quad (PK^+ = \text{concentração de potássio no perfusato})$
<p>12. EK⁺ (mEq.g⁻¹. min⁻¹) = Potássio excretado</p> $EK^+ = FU \times UK^+ \quad (UK^+ = \text{Concentração de potássio na urina})$
<p>13. TK⁺ (mEq.g⁻¹. min⁻¹) = Potássio transportado</p> $TK^+ = FK^+ \times EK^+$
<p>14. %TK⁺ (mEq.g⁻¹. min⁻¹) = Percentual de potássio transportado</p> $\%TK^+ = TK^+ \times 100 / FK^+$
<p>15. TCl⁻ (mEq.g⁻¹. min⁻¹) = Cloreto transportado</p> $TCl^- = FCl^- \times ECl^-$
<p>16. % TCl⁻ (mEq.g⁻¹. min⁻¹) = Percentual de cloreto transportado</p> $\% TCl^- = TCl^- \times 100 / F TCl^-$

4.3.8 Estudo histológico

Ao final de cada experimento foi realizado um corte longitudinal para coleta de fragmentos do rim perfundido (direito) e daquele não perfundido (esquerdo) e ambos foram colocados em formol a 10% para posterior análise histológica. Os fragmentos obtidos foram submetidos à desidratação e diafanização, e em seguida cortados, em uma espessura de 5 mm. Foram realizadas colorações de hematoxilina-eosina (HE) e as lâminas analisadas através de um microscópio óptico (NIKON). Também foi realizado o estudo histológico nos rins perfundidos somente com solução de Krebs-Henseleit modificada e nos rins esquerdos, isolados dos ratos, que não sofreram perfusão, sendo estes os grupos controles. Esta análise foi realizada em colaboração com o Professor Dr Cláudio Gleidiston Lima da Silva do Laboratório de Patologia Experimental da Universidade Federal do Cariri (LAPEX).

4.4 Avaliação da atividade sobre células renais isoladas

4.4.1 Cultivo e tratamento das células MDCK

A linhagem de células MDCK (Madin-Darby Canine Kidney), células tubulares renais foi obtida inicialmente do Laboratório de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP) e cultivadas no Laboratório de Cultivo Celular (LCC), coordenado pela Professora Dra. Alice Maria Costa Martins da UFC.

As células tubulares renais MDCK foram cultivadas em garrafas de plástico ou placas de microcultura, em meio MEM (meio essencial mínimo), suplementado com 10% v/v de Soro Bovino Fetal (SBF), penicilina (100U/mL) e estreptomicina (100µg/mL). As células foram incubadas a 37°C, em atmosfera com 95% de umidade e 5% de CO₂. O crescimento celular foi observado em microscopia de inversão a cada 24 horas (FRESHENY, 2000; BUTLER & DAWSON, 1992). Esta linhagem de células é aderente, formando uma monocamada sobre a superfície da garrafa de cultivo. Após confluência, onde toda superfície de cultivo foi preenchida, as células foram deslocadas utilizando tripsina EDTA (0,05-0,02%), e a suspensão celular foi redistribuída para outras garrafas de cultivo para expansão da cultura celular.

Antes de cada experimento as células foram armazenadas em meio sem SBF por 24 horas para a obtenção de células na fase G₀ do ciclo celular. Para cada experimento foi removido o meio da cultura e as células incubadas em estufa de CO₂ com tripsina-EDTA (0,25/0,02% v/v) a 37°C por aproximadamente 10 minutos. A tripsina foi inativada adicionando o mesmo volume de meio com SBF. A suspensão foi então

centrifugada a 200 g por 10 minutos a 4000 rpm (MARTINS *et al.* 2005; CHAIM, 2005). O sobrenadante foi descartado e as células resuspensas em meio de cultura. As células foram quantificadas em câmara de Neubauer e subcultivadas ($1-2 \times 10^6$ células/mL) permitindo o crescimento confluyente por 24h. Decorridos 24 horas do plaqueamento, as células foram incubadas na presença de diferentes concentrações dos polissacarídeos de *Gracilaria cornea* por 24 horas. As placas foram avaliadas com 24 horas de cultivo em microscópio invertido. Para o grupo controle foi considerado os poços contendo células MDCK incubadas unicamente com PBS, o veículo de diluição das substâncias testadas. As alíquotas de células para estoque foram mantidas em meio MEM acrescido de SBF a 50% e DMSO a 10%, congeladas primeiramente à -70°C e mantidas em nitrogênio líquido (FRESHENEY, 2000).

4.4.2 Testes de viabilidade celular

4.4.2.1 Ensaio com MTT

Este ensaio consiste em uma análise colorimétrica que mede a citotoxicidade de forma indireta. O 3-(4,5-dimetilazil-2-il)-2,5 difenil tetrazólico (MTT) é um sal tetrazólico solúvel em água, o qual é convertido em cristais de formazan de cor púrpura, insolúveis em água, após clivagem do anel de tetrazólico por desidrogenases mitocondriais citoplasmáticas, bem como outras enzimas lisossomais. O MTT é reduzido em formazan, um sal insolúvel de cor violácea pelos subprodutos das desidrogenases celulares em NADH e NADPH. Os cristais de formazan são solubilizados, formando um produto colorido cuja medição da densidade óptica é feita em espectrofotômetro a 570 nm de absorbância. A intensidade do produto colorido formado é diretamente proporcional ao número de células viáveis presentes na amostra, confirmando a capacidade redutora do sistema sobre o MTT (MOSMANN, 1983; HEINRICH *et al.*, 2005).

4.4.2.2 Protocolo experimental

As células MDCK foram plaqueadas em placas de 96 poços em uma densidade de $0,1 \times 10^3$ células e tratadas com os polissacarídeos sulfatados totais (PSTs) da alga *Gracilaria cornea* (200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,12 $\mu\text{g/mL}$) por 24, 48 e 72 horas. Após o tratamento das células, as placas foram centrifugadas a 1500 rpm por 15 minutos e 100 μL do sobrenadante da cultura foi descartado. Foi então, adicionado 500 $\mu\text{g/mL}$ do MTT (Sigma) dissolvido em PBS. Após incubação por 4 horas à 37°C em

estufa com 5% de CO₂, a placa foi novamente centrifugada (3000 rpm por 10 minutos), o sobrenadante foi removido e então adicionado dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% dissolvido em HCl 0,01N para solubilizar os cristais de formazan formados. Após 17 horas mantidas na estufa à 37°C com 5% de CO₂ foi realizada a leitura em espectrofotômetro de placas Elisa com comprimento de onda de 570 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata (MOSMANN, 1983). A porcentagem de viabilidade dos grupos tratados foi calculada pela comparação da absorbância dos grupos testes em relação ao grupo controle, sendo considerada como 100% a viabilidade média do grupo controle (MOSMANN, 1983)

4.4.3 Avaliação do tipo de morte celular

A avaliação do tipo de morte celular induzida pelos PSTs da alga foi realizada pela determinação de características celulares indicativas de morte por apoptose ou necrose. A apoptose pode ser estimada através de ensaios que avaliam a integridade da membrana, determinação da fragmentação do DNA e detecção da externalização de fosfatidilserina

A citometria de fluxo é uma metodologia usada para o estudo dos eventos celulares, pois uma das características deste método é a manutenção das condições vitais da célula após sua manipulação, permitindo realizar investigações mais aprofundadas do comportamento biológico e avaliação funcional da população de células em estudo. No citômetro as células são individualmente conduzidas em canal de corrente fluida que, ao interceptarem o feixe de luz geralmente proveniente de um laser, causam sua dispersão em várias direções, dependendo do tamanho, da estrutura interna, das características topográficas e de densidade óptica de cada célula (MACEY, 1994), as quais estão diretamente correlacionadas com a morfologia celular. Neste contexto, o feixe de luz que passa pela partícula com um mínimo de desvio está relacionado com o tamanho celular (forward light scatter-FSC), enquanto aqueles que captam o desvio ortogonal aos eixos do fluido celular (side light scatter- SSC) estão relacionados com a complexidade celular interna, em particular sua granularidade. Após análise simultânea desses parâmetros, gráficos de coordenadas x e y são gerados (MACHADO-JÚNIOR *et al.*, 2006). Para os ensaios de integridade de membrana, as células, após tratadas com os PSTs, foram ressuspensas em PBS e então incubadas com uma solução de iodeto de propídio (0,1% de citrato de sódio, 0,1% de triton X-100, 2µg/mL de iodeto de propídio) por 5 minutos à temperatura ambiente e observada a integridade celular.

A fragmentação do DNA foi observada após tratamento das células de forma semelhante aos testes de integridade, porém as amostras foram incubadas ao abrigo da luz por 24 h, a 4°C para esse fim. Para o teste de externalização de fosfatidilserina, foi adicionada anexina V marcada com FITC e a suspensão foi incubada por 15 minutos à temperatura ambiente. Após esse período foi adicionado mais tampão de ligação e, imediatamente antes da leitura no citômetro de fluxo, foi adicionada solução de iodeto de propídio (2µg/mL em PBS). Após esse período foi realizada a leitura em citômetro de fluxo (DE LIMA, 2005).

4.4.3.1 Detecção da externalização de fosfatidilserina e da perda de permeabilidade de membrana

Neste estudo a determinação da externalização da fosfatidilserina pelas células tratadas com o polissacarídeos foi realizada utilizando-se o ensaio de detecção da anexina V com o Kit BD PharmingenTM Anexina V-FITC. A anexina V tem a capacidade de se ligar fortemente aos fosfolipídeos de membrana plasmática através de suas cargas negativas na presença de íons cálcio. Esse marcador pode ser conjugado com fluorocromos como o FITC, servindo como uma sonda sensível para análise por citometria de fluxo das células que expressam a fosfatidilserina na face externa da membrana plasmática. A externalização da fosfatidilserina é um evento precoce de células que entram em apoptose, exercendo sinalização para a fagocitose por macrófagos e outras células inflamatórias (DE LIMA, 2005).

Também foi realizada a análise da perda da integridade da membrana pela incubação dos grupos experimentais com iodeto de propídeo (IP), um marcador de DNA impermeável a membrana plasmática íntegra, marcando, portanto, apenas as células que apresentam perda de permeabilidade de membrana. Essa alteração é uma importante característica de células necróticas. O corante IP liga-se ao DNA e emite alta característica fluorescência quando excitado pelo laser. As células viáveis apresentam baixa fluorescência podendo distinguir as células em apoptose precoce (Anexina V-FITC positivas) das células em necrose (IP positivas). As células viáveis também são diferenciadas por serem FITC e IP negativas. No entanto, células em apoptose tardia coram-se com ambos, FITC e IP, devido ao estágio final de desintegração celular (BOERSMA *et al.*, 2005).

4.4.3.2 Protocolo experimental

As células MDCK foram tratadas com os PSTs na concentração de 50 µg/mL. Após 24 horas do tratamento, o meio de cultura foi transferido para um tubo (5mL) e centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos para coletar células em suspensão. As células aderidas á placa foram lavadas com PBS três vezes e tripinizadas. As células obtidas foram adicionadas ao sobrenadante coletado e a mistura foi novamente centrifugada por 10 minutos a 4000 rpm. O pellet foi ressuspensão em 500 µL de tampão para detecção de apoptose e necrose. Foram em seguida retirados 100 µL dessa suspensão e colocados em frascos para a citometria. Foi adicionado 5 µL de anexina V-FITC, iodeto de propídeo (IP), e ambos, em cada tubo, os quais ficaram incubados por 15 minutos protegidos do abrigo da luz. Por fim, foram adicionados 400 µL do tampão e os frascos foram levados para leitura em citômetro de fluxo (FACS, BD, New Jersey, USA) (DE LIMA, 2005). As culturas não tratadas foram utilizadas como controle negativo. Os dados foram obtidos por software Cell Quest e os resultados foram analisados utilizando o software WinMDI.

4.4 Análises estatísticas

Para os experimentos de perfusão renal, os dados (n=4) foram comparados por ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls e teste t de Student. A significância do teste estatístico foi considerada para $p < 0,05$.

Para os protocolos experimentais realizados na cultura de células MDCK, os dados (n=3) foram comparados por ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni e teste t de Student. A significância do teste estatístico foi considerada para $p < 0,05$. Os dados foram expressos como porcentagem de viabilidade celular versus concentração dos polissacarídeos para os ensaios de MTT.

4.5 Aspectos éticos

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (CEPA) da UFC sob número de protocolo 79/08.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Perfusão renal

A administração dos polissacarídeos sulfatados totais (PSTs) da alga na concentração de $1\mu\text{g/mL}$ no sistema de perfusão renal em ratos não demonstrou nenhuma alteração dos parâmetros vasculares. A pressão de perfusão (PP) máxima foi aos 90 minutos de $116.0 \pm 2,1$ mmHg em comparação ao controle interno, 113.0 ± 1.3 mmHg (figura 8 e tabela 3), não apresentando significância. Neste mesmo tempo, a resistência vascular renal (RVR) apresentada foi de 6.0 ± 0.3 mmHg/mL/g/min, muito próxima da do controle interno no tempo de 30 minutos que foi de 6.0 ± 0.3 mmHg/mL/g/min. Como se pode observar ainda na figura 9 e tabela 4, não ocorreu qualquer alteração na pressão de perfusão e resistência vascular renal nos tempos de 90 e 120 minutos ($C_{30}=113.0 \pm 1.3$; $PST_{s90}= 116.2 \pm 2.1$; $PST_{s120}= 114.1 \pm 2.9$ mmHg; $C_{30}=6.0 \pm 0.3$; $PST_{s90}= 6.0 \pm 0.3$; $PST_{s120}= 6.0 \pm 0.3$ mmHg/mL/g/min⁻¹).

Por outro lado, a administração dos PSTs na concentração de $3\mu\text{g/ml}$ no sistema de perfusão causou intensas alterações nos parâmetros vasculares. A PP aumentou para 114.0 ± 7.21 e 123.4 ± 10.9 mmHg em comparação ao controle, 96.86 ± 1.72 mmHg, aos 90 e 120 minutos, respectivamente. A RVR também apresentou acréscimos aos 90 e 120 minutos de 4.000 ± 0.29 e 5.092 ± 0.452 mmHg/mL/g/min⁻¹, respectivamente em comparação ao controle de $C_{30}=3.997 \pm 0.07$ mmHg/mL/g/min⁻¹.

Na concentração de $4,5\mu\text{g/ml}$ ocorreram alterações ainda mais intensas nos parâmetros vasculares. Estes foram imensamente afetados já a partir dos 60 minutos, onde se observou aumento significativo da PP ($PST_{s60}=191.5 \pm 30.6$ mmHg), resultado este que só se intensificou aos 90 e 120 minutos ($PST_{s90}= 262.0 \pm 5.02$; $PST_{s120}=274.5 \pm 4.01$ mmHg). A RVR também apresentou acréscimos consideráveis ($C_{30}= 3.420 \pm 0.16$; $PST_{s60}= 8.887 \pm 1.08$; $PST_{s90}= 9.000 \pm 0.15$; $PST_{s120}=9.89 \pm 0.18$ mmHg/mL/g/min⁻¹).

Figura 8: Pressão de Perfusão (PP) em rim isolado de ratos. Efeitos dos polissacarídeos sulfatados totais da alga *Gracilaria cornea* na concentração de 1,0; 3,0 e 4,5 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados dos experimentos dos grupos perfundidos (n=4) com os PSTs (n=4) foram expressos em média \pm E.P.M, compilados e distribuídos em quatro períodos (30, 60, 90 e 120min), comparando com os respectivos grupos controles internos em cada tempo de dosagem, considerando $p < 0,05$. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Newman-Keuls) e teste t de Student, considerando $p < 0,05$.

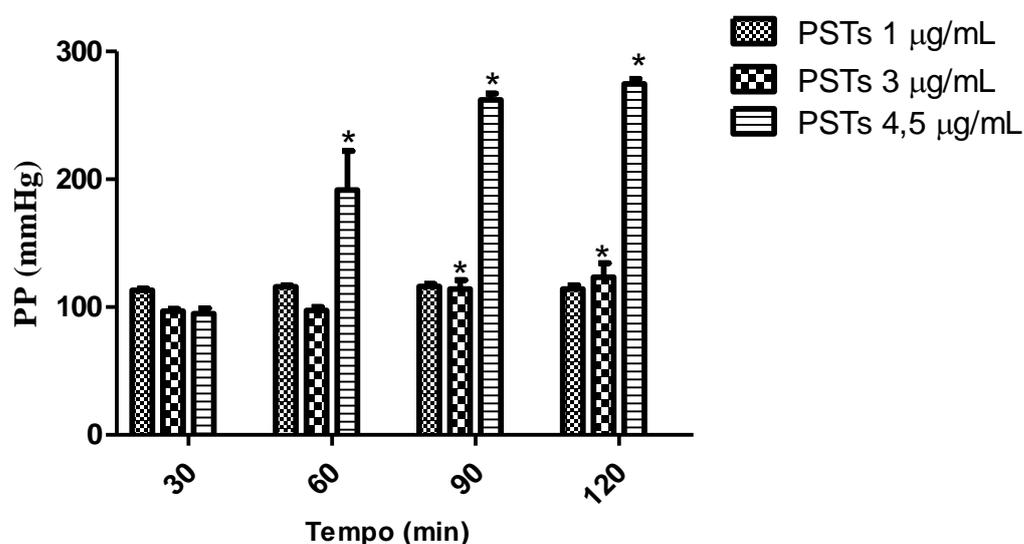


Tabela 3: Efeitos dos polissacarídeos sulfatados totais sobre a pressão de perfusão renal (PP).

Tempo (min)	Grupos estudados			
	Grupo controle externo (Média + EPM)	Grupos perfundidos com PSTs (Média + EPM)		
		Concentração 1 $\mu\text{g/mL}$	Concentração 3 $\mu\text{g/mL}$	Concentração 4,5 $\mu\text{g/mL}$
30	118,0 \pm 1,539	113,1 \pm 1,307	96,86 \pm 1,721	94,87 \pm 4,225
60	122,2 \pm 1,807	115,9 \pm 1,340	97,45 \pm 2,702	191,5 \pm 30,66*
90	118,1 \pm 1,513	116,0 \pm 2,106	114,0 \pm 7,214*	262,0 \pm 5,202*
120	111,4 \pm 2,597	114,1 \pm 2,911	123,4 \pm 10,9*	274,5 \pm 4,012*

Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=4) e PSTs (n=4) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em mmHg, compilados e distribuídos em quatro períodos (30, 60, 90 e 120 min).

Figura 9: Resistência Vascular Renal (RVR) em rim isolado de ratos. Efeitos dos polissacarídeos sulfatados totais da alga *Gracilaria cornea* na concentração de 1,0; 3,0 e 4,5 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados dos experimentos dos grupos perfundidos (n=4) com os PSTs (n=4) foram expressos em média \pm E.P.M, compilados e distribuídos em quatro períodos (30, 60, 90 e 120min), comparando com os respectivos grupos controles internos em cada tempo de dosagem, considerando $p < 0,05$. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Newman-Keuls) e teste t de Student, considerando $p < 0,05$.

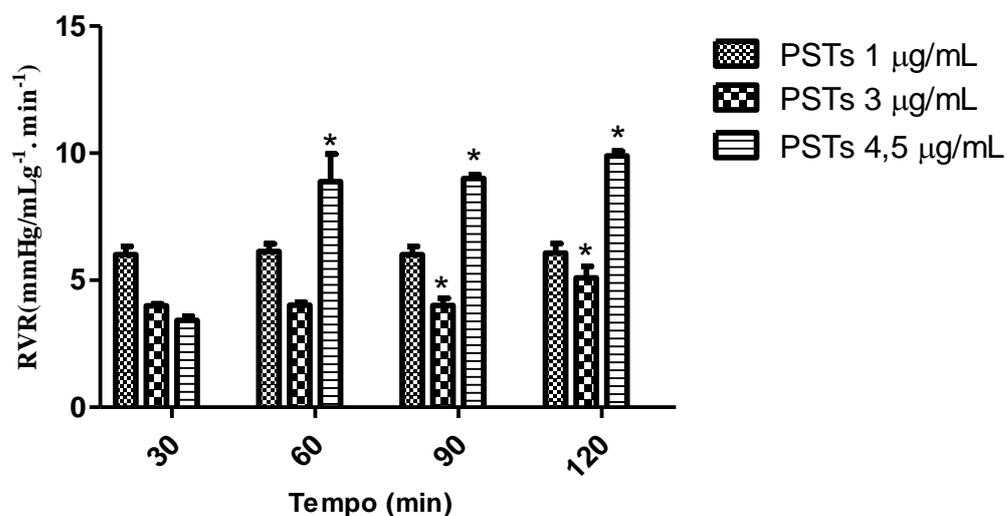


Tabela 4: Efeitos dos polissacarídeos sulfatados totais sobre a resistência vascular renal (RVR).

Tempo (min)	Grupos estudados			
	Grupo controle externo (Média + EPM)	Grupos perfundidos com PSTs (Média + EPM)		
		Concentração 1 $\mu\text{g/mL}$	Concentração 3 $\mu\text{g/mL}$	Concentração 4,5 $\mu\text{g/mL}$
30	4,239 \pm 0,148	6,005 \pm 0,331	3,997 \pm 0,070	3,420 \pm 0,165
60	4,284 \pm 0,124	6,131 \pm 0,294	4,022 \pm 0,111	8,887 \pm 1,086*
90	4,170 \pm 0,123	6,000 \pm 0,328	4,471 \pm 0,298*	9,000 \pm 0,157*
120	4,380 \pm 0,067	6,068 \pm 0,371	5,092 \pm 0,452*	9,895 \pm 0,180*

Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=4) e PSTs (n=4) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em $\text{mmHg/mL.g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, compilados e distribuídos em quatro períodos (30, 60, 90 e 120 min).

Diferentemente dos parâmetros vasculares, o fluxo urinário (FU) e o ritmo de filtração glomerular (RFG) sofreram intensas modificações mesmo com a concentração de $1\mu\text{g/mL}$ dos PSTs. A partir dos 90 minutos de perfusão, o FU foi reduzido, ocorrendo um maior decréscimo aos 120 minutos, atingindo valores de 0.090 ± 0.008 mL/g/min, equivalente a 57% do controle ($C_{30} = 0.157 \pm 0.010$ mL/g/min⁻¹). Esses resultados são mostrados nas figuras 10 e 11 e nas tabelas 5 e 6. O RFG teve decréscimos aos 60, 90 e 120 minutos, atingindo valores de 0.455 ± 0.071 ; 0.314 ± 0.058 e 2.57 ± 0.034 ml.g⁻¹.min⁻¹, respectivamente, quando comparado ao controle interno que foi de 0.995 ± 0.145 ml.g⁻¹.min⁻¹. Com a concentração de $3\mu\text{g/ml}$ também se observou alterações nos parâmetros funcionais. Aos 120 minutos de perfusão, o FU aumentou, atingindo valores de 0.193 ± 0.01 ml.g⁻¹.min⁻¹, equivalente a 38% do controle ($C_{30} = 0.149 \pm 0.01$ ml.g⁻¹.min⁻¹). O RFG teve decréscimos aos 60, 90 e 120 minutos, quando comparado com o controle ($C_{30} = 1.074 \pm 0.15$; $\text{PST}_{s60} = 0.400 \pm 0.05$; $\text{PST}_{s90} = 0.550 \pm 0.07$; $\text{PST}_{s120} = 0.619 \pm 0.07$ ml.g⁻¹.min⁻¹).

Aos 90 e 120 minutos de perfusão, o FU sofreu aumento significativo com a concentração de $4,5\mu\text{g/mL}$, atingindo valores de 0.290 ± 0.017 e 0.331 ± 0.02 ml.g⁻¹.min⁻¹, respectivamente, equivalente a 52 e 73% do controle interno ($C_{30} = 0.191 \pm 0.03$ ml.g⁻¹.min⁻¹). O RFG não sofreu tantas alterações como com a concentração anterior, porém ainda apresentou decréscimos aos 60 minutos, quando comparado com o controle interno ($C_{30} = 0.996 \pm 0.19$; $\text{PST}_{s60} = 0.496 \pm 0.12$ ml.g⁻¹.min⁻¹).

Figura 10: Fluxo Urinário (FU) em rim isolado de rato. Efeitos dos polissacarídeos sulfatados totais da alga *Gracilaria cornea* na concentração de 1,0; 3,0 e 4,5 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados dos experimentos dos grupos perfundidos (n=4) com os PSTs (n=4) foram expressos em média \pm E.P.M, compilados e distribuídos em quatro períodos (30, 60, 90 e 120min), comparando com os respectivos grupos controles internos em cada tempo de dosagem, considerando $p < 0,05$. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Newman-Keuls) e teste t de Student, considerando $p < 0,05$.

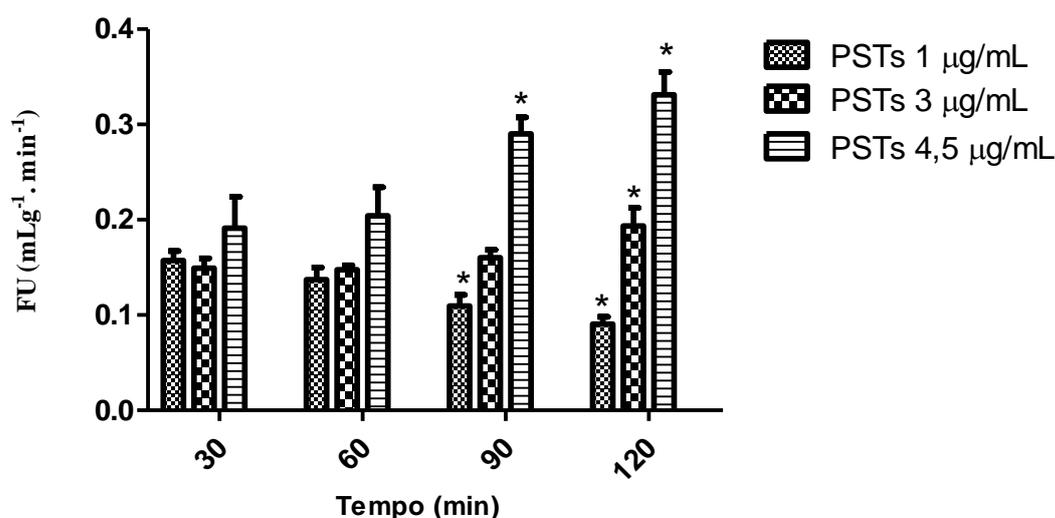


Tabela 5: Efeitos dos polissacarídeos sulfatados totais sobre o fluxo urinário (FU).

Tempo (min)	Grupos estudados			
	Grupo controle externo (Média + EPM)	Grupos perfundidos com PSTs (Média + EPM)		
		Concentração 1 $\mu\text{g/mL}$	Concentração 3 $\mu\text{g/mL}$	Concentração 4,5 $\mu\text{g/mL}$
30	0,133 \pm 0,003	0,157 \pm 0,010	0,149 \pm 0,010	0,191 \pm 0,032
60	0,158 \pm 0,007	0,137 \pm 0,013	0,147 \pm 0,004	0,204 \pm 0,030
90	0,160 \pm 0,006	0,109 \pm 0,011*	0,160 \pm 0,008	0,290 \pm 0,017*
120	0,155 \pm 0,004	0,090 \pm 0,008*	0,193 \pm 0,019*	0,331 \pm 0,023*

Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=4) e PSTs (n=4) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em $\text{mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$, compilados e distribuídos em quatro períodos (30, 60, 90 e 120 min).

Figura 11: Ritmo de Filtração Glomerular (RFG) em rim isolado de rato. Efeitos dos polissacarídeos sulfatados totais da alga *Gracilaria cornea* na concentração de 1,0; 3,0 e 4,5 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados dos experimentos dos grupos perfundidos ($n=4$) com os PSTs ($n=4$) foram expressos em média \pm E.P.M, compilados e distribuídos em quatro períodos (30, 60, 90 e 120min), comparando com os respectivos grupos controles internos em cada tempo de dosagem, considerando $p<0,05$. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Newman-Keuls) e teste t de Student, considerando $p<0,05$.

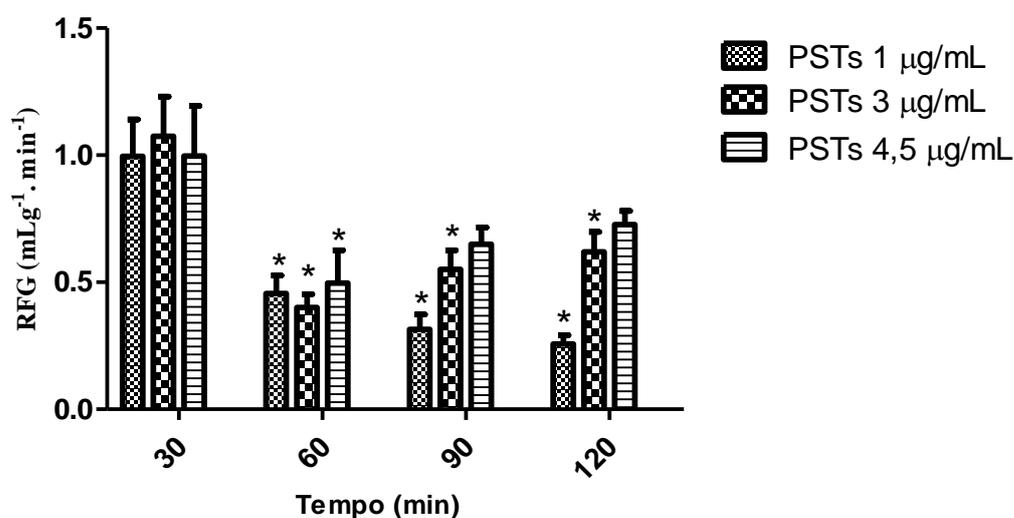


Tabela 6: Efeitos dos polissacarídeos sulfatados totais sobre o ritmo de filtração glomerular (RFG).

Tempo (min)	Grupos estudados			
	Grupo controle externo (Média + EPM)	Grupos perfundidos com PSTs (Média + EPM)		
		Concentração 1 $\mu\text{g/mL}$	Concentração 3 $\mu\text{g/mL}$	Concentração 4,5 $\mu\text{g/mL}$
30	0,836 \pm 0,094	0,995 \pm 0,145	1,074 \pm 0,157	0,996 \pm 0,197
60	0,793 \pm 0,055	0,455 \pm 0,071*	0,400 \pm 0,053*	0,496 \pm 0,129*
90	0,821 \pm 0,072	0,314 \pm 0,058*	0,550 \pm 0,074*	0,654 \pm 0,065
120	0,742 \pm 0,054	0,257 \pm 0,034*	0,619 \pm 0,078*	0,727 \pm 0,053

Os resultados dos experimentos dos grupos Controle ($n=4$) e PSTs ($n=4$) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em $\text{mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$, compilados e distribuídos em quatro períodos (30, 60, 90 e 120 min).

Outros parâmetros funcionais também foram alterados como o transporte de eletrólitos. O percentual de transporte de sódio (%TNa⁺) apresentou uma discreta redução aos 60, 90 e 120 minutos de perfusão com a concentração de 1 µg/mL (C₃₀=85.70 ± 1.63; PST_{s60}=76.57 ± 1.61; PST_{s90}=73.31 ± 2.04 e PST_{s120}=74.44 ± 3.12 %TNa⁺), como mostra a figura 12 e tabela 7. Houve também alteração no percentual de transporte de cloreto (%TCl⁻) aos 60, 90 e 120 minutos quando comparado com o controle, como mostra a figura 13 e tabela 8 (C₃₀=83.83 ± 1.80; PST_{s60}=73.10 ± 1.83; PST_{s90}=67.00 ± 2.61; PST_{s120}=68.75 ± 3.68 %TCl⁻). Ainda com essa mesma concentração, o transporte percentual de potássio (%TK⁺), também foi alterado nos mesmos tempos de 60, 90 e 120 minutos de (PST_{s60}=51.91 ± 4.42; PST_{s90}=27.44 ± 7.14; PST_{s120}=28.91 ± 8.15 %TK⁺), quando comparados com o controle interno de 74.74 ± 2.83 %TK⁺ (figura 14 e tabela 9)

Com a concentração de 3 µg/mL, o %TNa⁺ apresentou redução significativa aos 60 minutos (C₃₀=86.72 ± 1.27; PST_{s60}=65.92 ± 4.27 %TNa⁺), resultado que se estendeu até os 120 minutos de perfusão (PST_{s90}=73.00 ± 2.50; PST_{s120}=72.38 ± 1.76 %TNa⁺). Alteração semelhantes foram observados no %TCl⁻ (C₃₀=84.32 ± 1.55; PST_{s60}=59.06 ± 5.34; PST_{s90}=61.80 ± 7.63; PST_{s120}=68.08 ± 1.97 %TCl⁻). O %TK⁺ sofreu redução nos tempos de 60 e 90 e 120 minutos (PST_{s60}=51.59 ± 5.50; PST_{s90}=56.19 ± 6.68; PST_{s120}=64.55 ± 1.84 %TK⁺), quando comparado com o controle interno de 81.89 ± 1.49 %TK⁺. Essa redução se estendeu até os 120 minutos (PST_{s120}=64.55 ± 1.84 %TK⁺).

Reduções ainda mais significativas foram observadas nos transportes de eletrólitos na concentração de 4 µg/mL. O %TNa⁺ apresentou redução aos 60 minutos (C₃₀=83.82 ± 1.48; PST_{s60}=54.62 ± 5.91 %TNa⁺), resultado que se estendeu até os 120 minutos de perfusão (PST_{s90}=53.00 ± 5.40; PST_{s120}=54.95 ± 2.79 %TNa⁺). Alteração semelhante foi observada no %TCl⁻ (C₃₀=81.92 ± 1.41; PST_{s60}=51.47 ± 6.31; PST_{s90}=52.00 ± 5.75; PST_{s120}=54.16 ± 2.91 %TCl⁻). Com relação ao %TK⁺, ocorreram alterações significativas nos tempos de 60 e 90 minutos (PST_{s60}=44.75 ± 7.71; PST_{s90}=50.00 ± 6.57 %TCl⁻), onde o transporte se encontrou reduzido, quando comparado com o controle de 73.48 ± 2.94%TCl⁻. Essa redução se estendeu até os 120 minutos (PST_{s120}=53.51 ± 3.38 %TCl⁻).

Figura 12: Percentual do Transporte de Sódio (%TNa⁺) em rim isolado de rato. Efeitos dos polissacarídeos sulfatados totais da alga *Gracilaria cornea* na concentração de 1,0; 3,0 e 4,5 µg/mL. Os resultados dos experimentos dos grupos perfundidos (n=4) com os PSTs (n=4) foram expressos em média ± E.P.M, compilados e distribuídos em quatro períodos (30, 60, 90 e 120min), comparando com os respectivos grupos controles internos em cada tempo de dosagem, considerando p<0,05. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Newman-Keuls) e teste t de Student, considerando p<0,05.

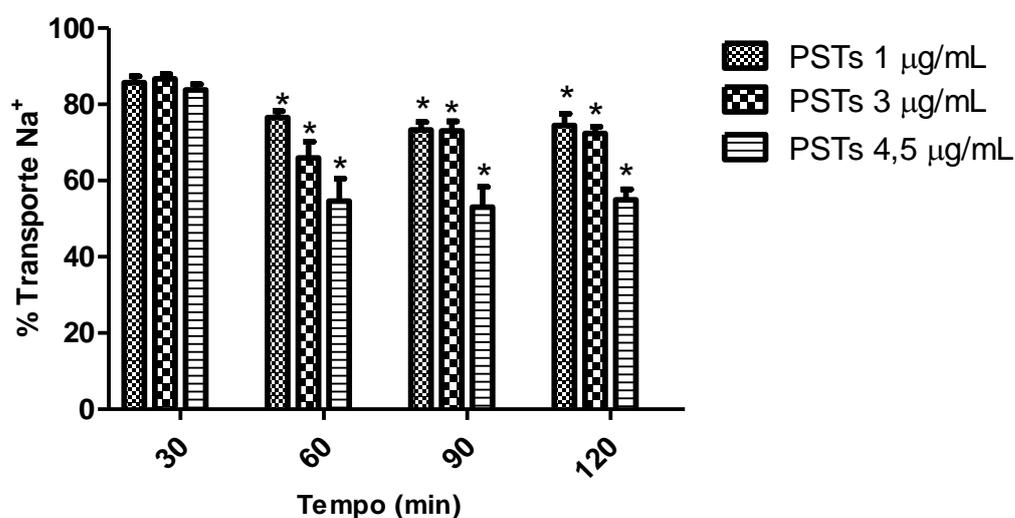


Tabela 7: Efeitos dos polissacarídeos sulfatados totais sobre o percentual de transporte de sódio (%TNa⁺).

Tempo (min)	Grupos estudados			
	Grupo controle externo (Média + EPM)	Grupos perfundidos com PSTs (Média + EPM)		
		Concentração 1µg/mL	Concentração 3µg/mL	Concentração 4,5µg/mL
30	83,85 ± 2,153	85,70 ± 1,638	86,72 ± 1,275	83,82 ± 1,489
60	82,43 ± 1,726	76,57 ± 1,616*	65,92 ± 4,274*	54,62 ± 5,914*
90	82,45 ± 1,914	73,31 ± 2,040*	73,00 ± 2,507*	53,00 ± 5,401*
120	81,97 ± 1,395	74,44 ± 3,129*	72,38 ± 1,768*	54,95 ± 2,799*

Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=4) e PSTs (n=4) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em %, compilados e distribuídos em quatro períodos (30, 60, 90 e 120 min).

Figura 13: Percentual do Transporte de Cloreto (%TC⁻) em rim isolado de rato. Efeitos dos polissacarídeos sulfatados totais da alga *Gracilaria cornea* na concentração de 1,0; 3,0 e 4,5 µg/mL. Os resultados dos experimentos dos grupos perfundidos (n=4) com os PSTs (n=4) foram expressos em média ± E.P.M, compilados e distribuídos em quatro períodos (30, 60, 90 e 120min), comparando com os respectivos grupos controles internos em cada tempo de dosagem, considerando p<0,05. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Newman-Keuls) e teste t de Student, considerando p<0,05.

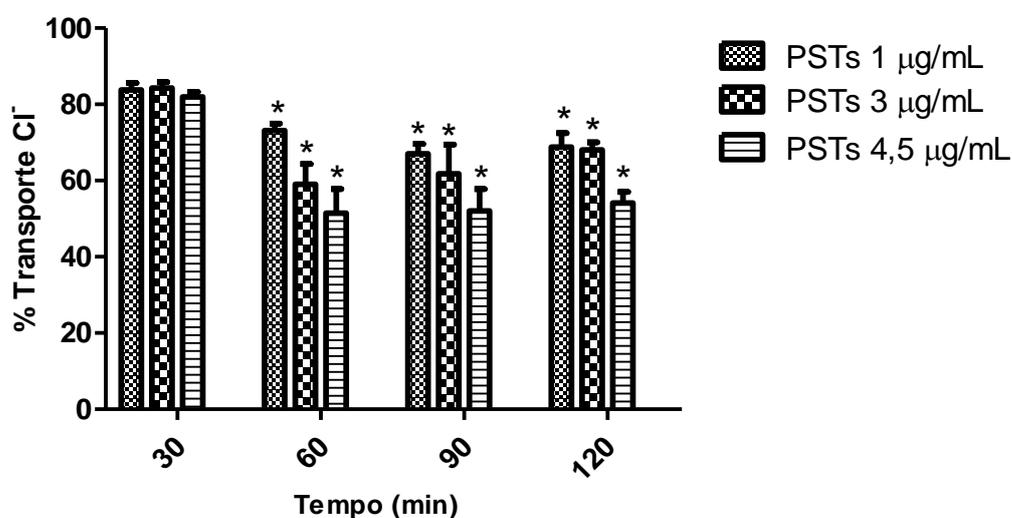


Tabela 8: Efeitos dos polissacarídeos sulfatados totais sobre o percentual de transporte de cloreto (%TC⁻).

Tempo (min)	Grupos estudados			
	Grupo controle externo (Média + EPM)	Grupos perfundidos com PSTs (Média + EPM)		
		Concentração 1µg/mL	Concentração 3µg/mL	Concentração 4,5µg/mL
30	79,46 ± 0,493	83,83 ± 1,803	84,32 ± 1,559	81,92 ± 1,413
60	81,99 ± 1,035	73,10 ± 1,837*	59,06 ± 5,346*	51,47 ± 6,317*
90	79,34 ± 0,452	67,00 ± 2,614*	61,80 ± 7,631*	52,00 ± 5,752*
120	79,64 ± 0,779	68,75 ± 3,681*	68,08 ± 1,971*	54,16 ± 2,914*

Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=4) e PSTs (n=4) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em %, compilados e distribuídos em quatro períodos (30, 60, 90 e 120 min).

Figura 14: Percentual do Transporte de Potássio (%TK⁺) em rim isolado de rato. Efeitos dos polissacarídeos sulfatados totais da alga *Gracilaria cornea* na concentração de 1,0; 3,0 e 4,5 µg/mL. Os resultados dos experimentos dos grupos perfundidos (n=4) com os PSTs (n=4) foram expressos em média ± E.P.M, compilados e distribuídos em quatro períodos (30, 60, 90 e 120min), comparando com os respectivos grupos controles internos em cada tempo de dosagem, considerando p<0,05. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Newman-Keuls) e teste t de Student, considerando p<0,05.

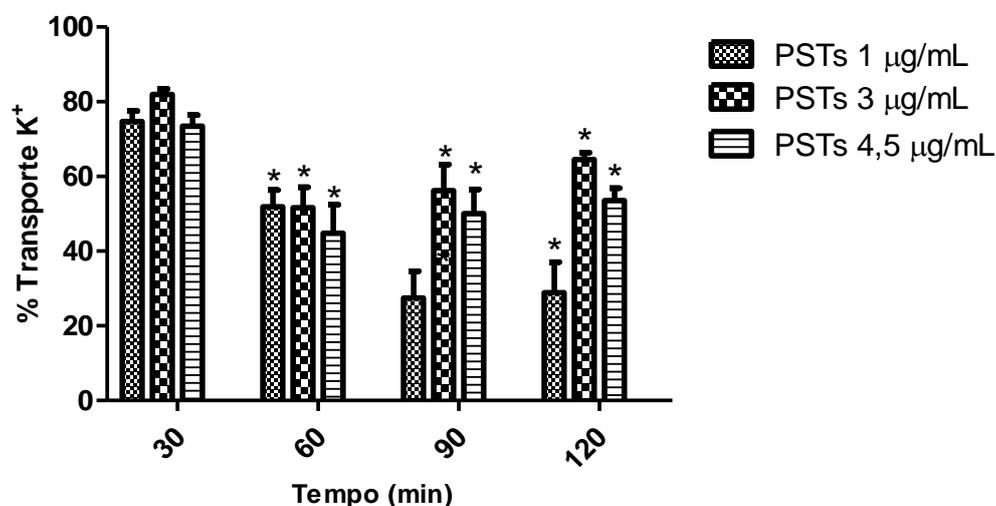


Tabela 9: Efeitos dos polissacarídeos sulfatados totais sobre o percentual de transporte de potássio (%TK⁺).

Tempo (min)	Grupos estudados			
	Grupo controle externo (Média + EPM)	Grupos perfundidos com PSTs (Média + EPM)		
		Concentração 1µg/mL	Concentração 3µg/mL	Concentração 4,5µg/mL
30	70,88 ± 2,171	74,74 ± 2,833	81,98 ± 1,493	73,48 ± 2,946
60	74,65 ± 3,005	51,91 ± 4,429*	51,59 ± 5,503*	44,75 ± 7,717*
90	76,73 ± 3,325	27,44 ± 7,144*	56,19 ± 6,984*	50,00 ± 6,571*
120	77,14 ± 2,824	28,91 ± 8,151*	64,55 ± 1,845*	53,51 ± 3,382*

Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=4) e PSTs (n=4) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em %, compilados e distribuídos em quatro períodos (30, 60, 90 e 120 min).

Para verificar a capacidade de depuração do rim isolado em nível de moléculas osmoticamente ativas, realizou-se o cálculo *do clearance* osmótico (C_{OSM}). Os PSTs na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ promoveram alterações nesse parâmetro aos 90 e 120 minutos, quando comparado com o controle interno ($C_{30}=0.144 \pm 0.013$; $PST_{s90}=0.090 \pm 0.010$; $PST_{s120}=0.073 \pm 0.007 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$), como pode ser observado na figura 15 e tabela 10.

Já na concentração de 3 $\mu\text{g/mL}$, os PSTs não foram capazes de promover qualquer alteração no C_{OSM} ($C_{30}=0.138 \pm 0.009$; $PST_{s60}=1.333 \pm 0.00$; $PST_{s90}=0.155 \pm 0.01$; $PST_{s120}=1.555 \pm 0.01 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$), resultado este que difere daquele encontrado com a concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$. Na concentração de 4,5 $\mu\text{g/mL}$ ocorreu alteração diferente no C_{OSM} daquela observada com a concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ que causou diminuição. O C_{OSM} sofreu aumento significativo nos tempos de 90 e 120 minutos quando comparado com o controle interno ($C_{30}=0.1750 \pm 0.035$; $PST_{s90}=0.2733 \pm 0.014$; $PST_{s120}=0.3267 \pm 0.026 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$).

Figura 15: Clearance Osmótico (C_{OSM}) em rim isolado de rato. Efeitos dos polissacarídeos sulfatados totais da alga *Gracilaria cornea* na concentração de 1,0; 3,0 e 4,5 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados dos experimentos dos grupos perfundidos ($n=4$) com os PSTs ($n=4$) foram expressos em média \pm E.P.M, compilados e distribuídos em quatro períodos (30, 60, 90 e 120min), comparando com os respectivos grupos controles internos em cada tempo de dosagem, considerando $p<0,05$. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Newman-Keuls) e teste t de Student, considerando $p<0,05$.

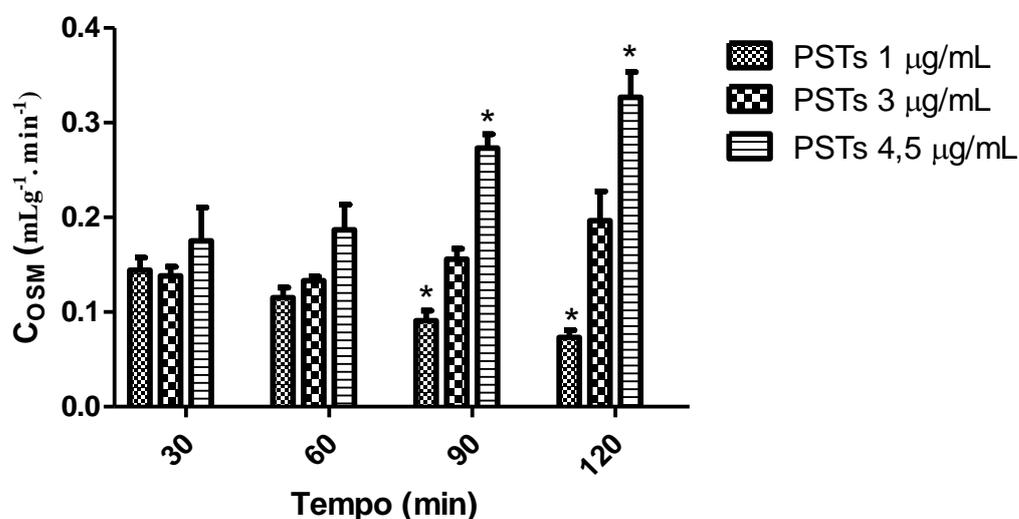


Tabela 10: Efeitos dos polissacarídeos sulfatados totais sobre o *clearance* osmótico (C_{OSM}).

Tempo (min)	Grupos estudados			
	Grupo controle externo (Média + EPM)	Grupos perfundidos com PSTs (Média + EPM)		
		Concentração 1µg/mL	Concentração 3µg/mL	Concentração 4,5µg/mL
30	0,122 ± 0,007	0,144 ± 0,013	0,138 ± 0,009	0,175 ± 0,035
60	0,134 ± 0,003	0,115 ± 0,010	0,133 ± 0,004	0,186 ± 0,026
90	0,142 ± 0,007	0,090 ± 0,010*	0,155 ± 0,011	0,273 ± 0,014*
120	0,130 ± 0,010	0,073 ± 0,007*	0,155 ± 0,011	0,326 ± 0,026*

Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=4) e PSTs (n=4) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em $\text{mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$, compilados e distribuídos em quatro períodos (30, 60, 90 e 120 min).

A tabela 11 relaciona os efeitos dos PSTs nas três concentrações estudadas com os parâmetros renais, como PP, RVR, RFG, FU, %TNa⁺, %TCl⁻, %TK⁺ e C_{OSM} , em todos os tempos de perfusão.

Tabela 11: Efeitos dos polissacarídeos sulfatados totais sobre os parâmetros renais.

Parâmetros renais	PSTs (1µg/mL)				PSTs (3µg/mL)				PSTs (4,5µg/mL)			
	30	60	90	120	30	60	90	120	30	60	90	120
PP	-	-	-	-	-	-	↑	↑	-	↑	↑	↑
RVR	-	-	-	-	-	-	↑	↑	-	↑	↑	↑
FU	-	-	↓	↓	-	-	-	↑	-	-	↑	↑
RFG	-	↓	↓	↓	-	↓	↓	↓	-	↓	-	-
%TNa ⁺	-	↓	↓	↓	-	↓	↓	↓	-	↓	↓	↓
%TCl ⁻	-	↓	↓	↓	-	↓	↓	↓	-	↓	↓	↓
%TK ⁺	-	↓	↓	↓	-	↓	↓	↓	-	↓	↓	↓
C_{OSM}	-	-	↓	↓	-	-	-	-	-	-	↑	↑

- Não houve efeito; ↓ Redução; ↑ Aumento; PP Pressão de perfusão (mmHg); RVR Resistência vascular renal ($\text{mmHg/mL/g}.\text{min}^{-1}$); FU Fluxo urinário ($\text{mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$); RFG Ritmo de filtração glomerular ($\text{mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$); %TNa⁺ Porcentagem no transporte de sódio (%); %TCl⁻ Porcentagem no transporte de cloreto (%); %TK⁺ Porcentagem no transporte de potássio (%); C_{OSM} *Clearance* osmótico ($\text{mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$).

5.1.1 Histologia dos rins perfundidos com os polissacarídeos sulfatados totais

As lâminas analisadas demonstraram que os rins esquerdos não perfundidos utilizados como controle possuíam estruturas normais (glomérulos, túbulos, vasos e interstícios), assim como os rins do grupo controle externo, perfundidos somente com a solução de Krebs. Esses resultados são mostrados nas figuras 16, 17, 18 e 19.

Figura 16: Fotomicrografia de rim esquerdo demonstrando túbulos (T) e glomérulo (G) normais (coloração de hematoxilina-eosina, aumento de 400X).

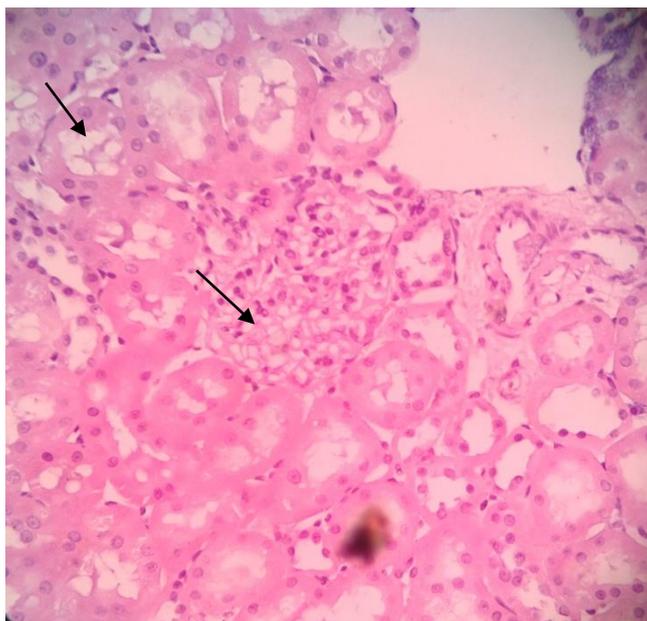


Figura 17: Fotomicrografia de rim direito perfundido com solução de Krebs-Henseleit demonstrando túbulos (T) e glomérulo (G) normais (coloração de hematoxilina-eosina, aumento de 400X).

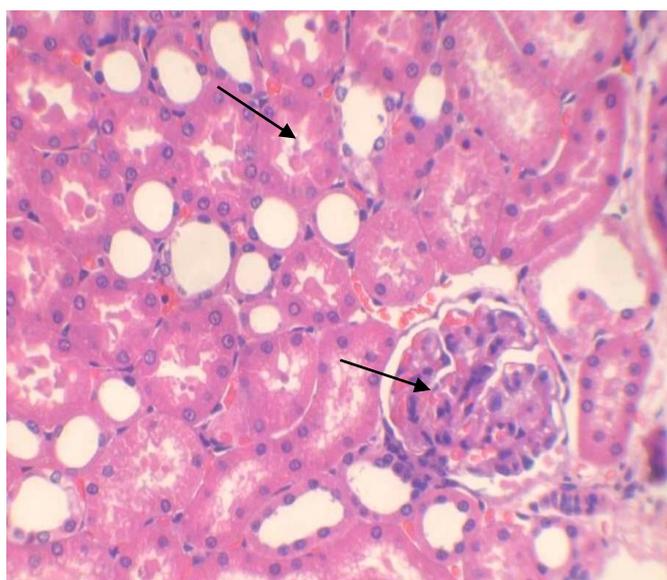


Figura 18: Fotomicrografia de rim esquerdo demonstrando túbulos medulares (TM) normais (coloração de hematoxilina-eosina, aumento de 400X).

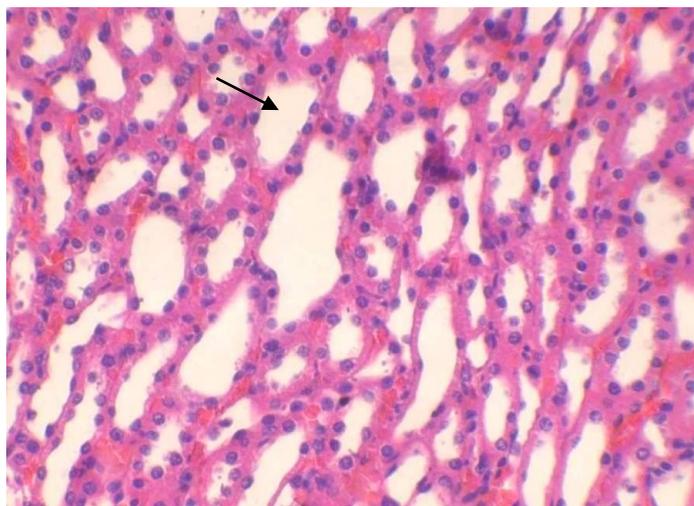
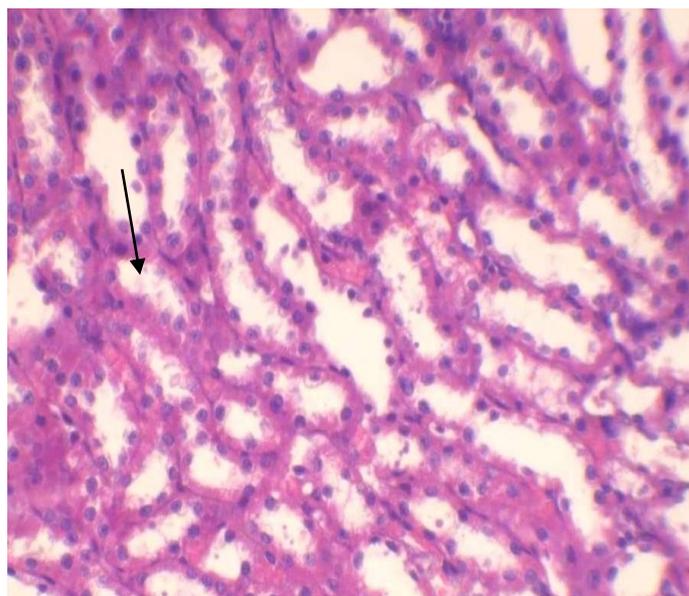


Figura 19: Fotomicrografia de rim direito demonstrando túbulos medulares (TM) normais (coloração de hematoxilina-eosina, aumento de 400X).



As análises histológicas realizadas com os rins perfundidos com os PSTs nas três concentrações demonstraram alterações corticais, tanto nos glomérulos como nos labirintos corticais que incluem os túbulos proximais e distais. Os glomérulos apresentaram depósitos de material proteináceo em forma de meia-lua, assim como os túbulos corticais (tubos cilíndricos depositados nos lúmens), como mostram as figuras 20 e 21. Essas alterações tubulares limitaram-se aos túbulos proximais e distais. As

porções medulares não demonstraram alterações morfológicas, apresentando alças de Henle e ductos coletores normais (figura 22).

Figura 20: Fotomicrografias de rim direito perfundido com solução de Krebs-Henseleit e PSTs demonstrando glomérulos (G) com presença de material proteináceo (coloração de hematoxilina-eosina, aumento de 400X).

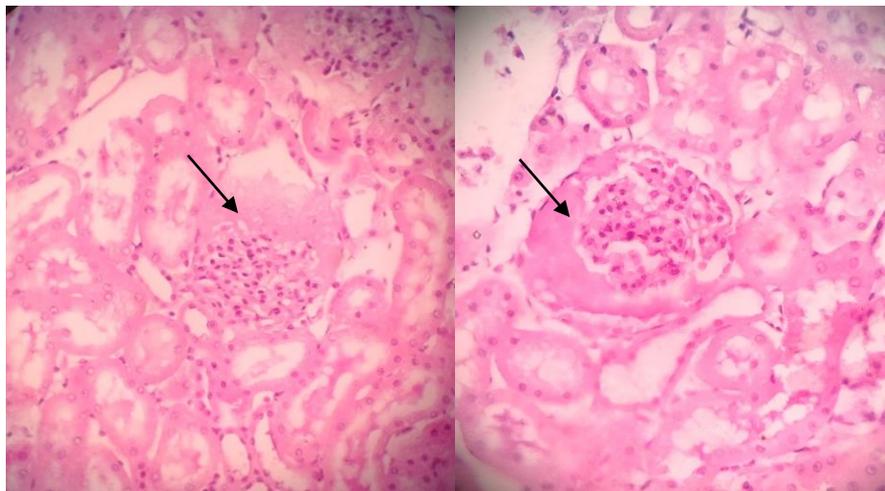


Figura 21: Fotomicrografia de rim direito perfundido com solução de Krebs-Henseleit e PSTs demonstrando túbulos corticais (T) com presença de material proteináceo (coloração de hematoxilina-eosina, aumento de 400X).

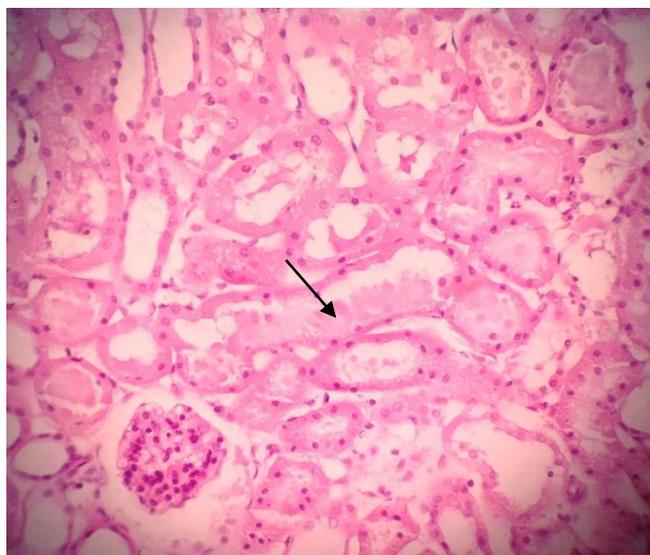
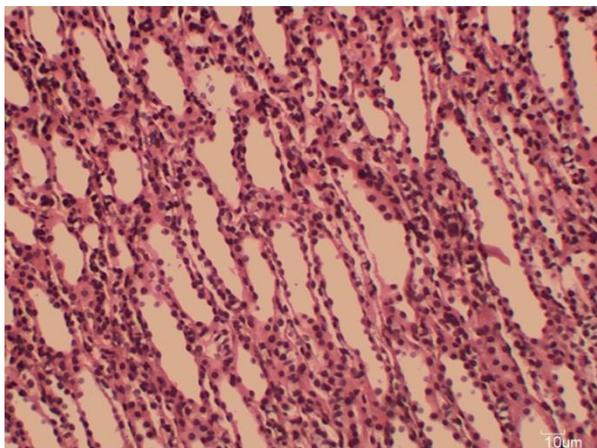


Figura 22: Fotomicrografia de rim direito perfundido com solução de Krebs-Henseleit e PSTs demonstrando túbulos medulares (TM) normais (coloração de hematoxilina-eosina, aumento de 400X).



5.2 Cultura de células MDCK (ensaios de viabilidade celular)

5.2.1 Ensaio com MTT

Os ensaios de viabilidade com culturas MDCK ($1,0 \times 10^5$ céls./mL) foram realizados pelo método MTT. Neste teste as células foram tratadas com os PSTs da *Gracilaria cornea* em diferentes concentrações de 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,12 $\mu\text{g/mL}$, durante 24 horas de incubação sendo em seguida realizada a análise de viabilidade. Os PSTs apresentaram significativo efeito citotóxico já que mostrou redução da viabilidade celular em todas as concentrações estudadas quando comparada com o grupo controle (figura 23 e tabela 12).

Figura 23: Efeito citotóxico dos polissacarídeos sulfatados totais da alga *Gracilaria cornea* nas concentrações de 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,12 $\mu\text{g/mL}$ sobre células MDCK pelo método do MTT. Os resultados dos experimentos foram expressos como média \pm EPM (n=3) e analisado por ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando $p < 0,05$.

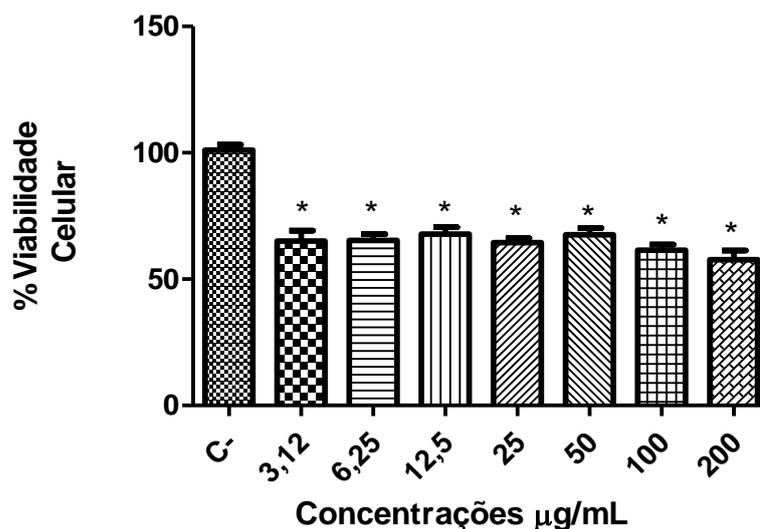


Tabela 12: Percentual de viabilidade celular dos experimentos realizados com os polissacarídeos sulfatados totais (n=3).

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Viabilidade celular (%) Média \pm EPM
Controle	100 \pm 2,162
3,12	65,07 \pm 4,085
6,25	65,27 \pm 2,583
12,5	67,75 \pm 2,861
25	64,48 \pm 1,659
50	67,54 \pm 2,606
100	61,41 \pm 2,228
200	57,64 \pm 3,710

Os resultados dos experimentos foram expressos em média e erro padrão da média (EPM). $P < 0,05$.

5.2.2 Citometria de fluxo (FACS)

Após ter apresentado diminuição da viabilidade celular pelo método citado anteriormente, os efeitos dos PSTs foram estudados na citometria para avaliar que tipo de morte celular esses estariam causando nas células renais, necrose ou apoptose, na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$. Para determinar as alterações induzidas pelos PSTs nas células MDCK, foi realizado o teste de detecção da externalização da fosfatidilserina e da perda de permeabilidade de membrana por citometria de fluxo utilizando anexina V-FITC e iodeto de propídeo (PI) como marcadores. Para o controle negativo foram utilizadas culturas de células não tratadas. Observou-se que uma parcela significativa das células tratadas com a substância foi marcada com anexina V-FITC quando comparado com o controle negativo (figura 24 e 25). Com relação a marcação com iodeto de propídeo, o que caracteriza células com perda de permeabilidade de membrana, não se observou qualquer porcentagem de células marcadas. Também ocorreu marcação dupla de anexina V-FITC e PI nas células tratadas com PSTs, o que representa evidências de um processo de morte celular por apoptose incompleta que culmina em necrose, já que se trata de um experimento *in vitro*. Esta marcação, porém, não se observa com a intensidade da marcação com anexina V-FITC (figura 26 e tabela 13).

Figura 24: Controle negativo de células MDCK não tratadas. Representação da marcação simultânea de anexina V-FITC e iodeto de proídio (PI). Quadrante inferior esquerdo: células viáveis (não-marcadas); quadrante inferior direito: células marcadas com anexina V; quadrante superior esquerdo; células marcadas apenas com PI; quadrante superior direito: células marcadas duplamente com PI e anexina V-FITC.

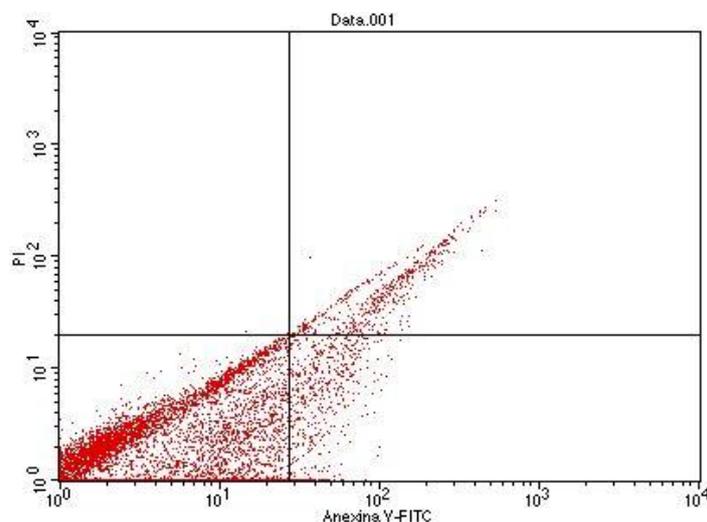


Figura 25: Avaliação do potencial apoptótico dos polissacarídeos sulfatados totais da alga *Gracilaria cornea* sobre células MDCK. Representação da marcação simultânea de anexina V-FITC e iodeto de pródio (PI). Quadrante inferior esquerdo: células viáveis (não-marcadas); quadrante inferior direito: células marcadas com anexina V; quadrante superior esquerdo; células marcadas apenas com PI; quadrante superior direito: células marcadas duplamente com PI e anexina V-FITC.

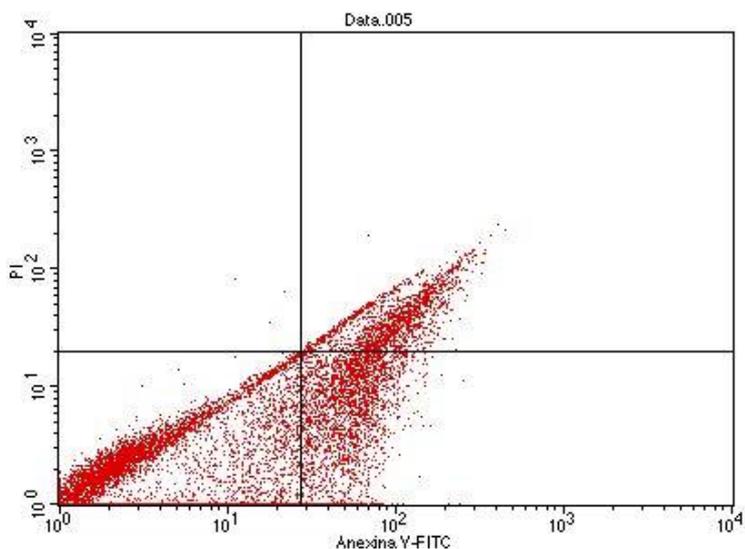


Figura 26: Porcentagem de células MDCK viáveis, de células MDCK com marcação de anexina V-FITC, com marcação de iodeto de propídio e com marcação dupla de anexina e iodeto de propídio. Efeitos dos polissacarídeos sulfatados totais da alga *Gracilaria cornea*. Os resultados dos experimentos foram expressos como média \pm EPM (n=3) e analisado por ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando $p < 0,05$.

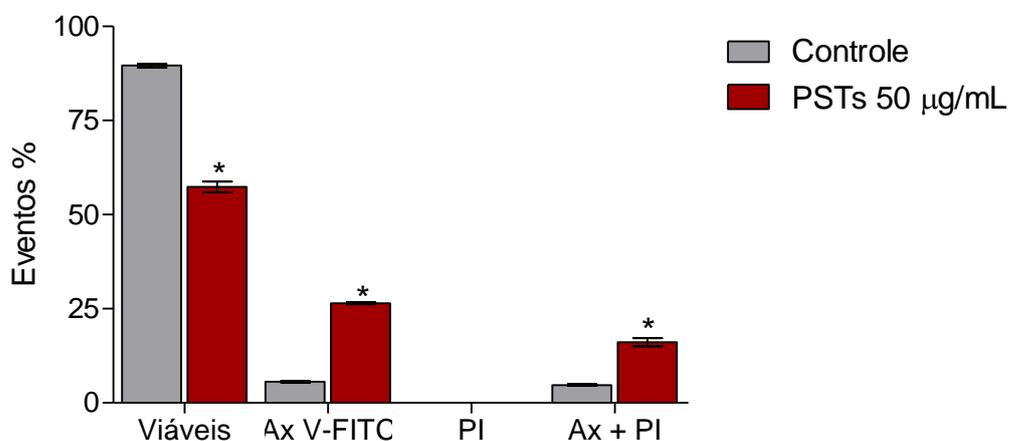


Tabela 13: Porcentagem de células MDCK viáveis, de células MDCK com marcação de anexina V-FITC, com marcação de iodeto de propídio e com marcação dupla de anexina e iodeto de propídio dos experimentos realizados com os polissacarídeos sulfatados totais (n=3).

Marcação	Grupos estudados			
	Grupo controle		PSTs 50µg/mL	
	Média	EPM	Média	EPM
Viáveis	89,62	0,4596	57,37	1,402
Ax V-FITC	5,600	0,2444	26,49	0,3100
PI	0,03333	0,006667	0,03333	0,01764
Ax + PI	4,747	0,2106	16,11	1,106

Os resultados dos experimentos foram expressos em média e erro padrão da média (EPM). $P < 0,05$.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Embora as algas sejam enormemente consumidas em produtos alimentícios no mundo inteiro, pouco se sabe a respeito dos seus efeitos renais. Diversos trabalhos recentes vêm mostrando uma gama de atividades biológicas desses vegetais marinhos e suas frações, porém há uma escassez de estudos com as mesmas em modelos experimentais para avaliar função renal. Objetivando-se estudar os efeitos dos PSTs no sistema renal, utilizou-se um sistema de perfusão de rim isolado que permite avaliar os efeitos de substâncias sobre a função e a morfologia renal sem qualquer interferência de fatores sistêmicos.

Estudou-se três diferentes concentrações dos PSTs no sistema de perfusão renal. A adição dos PSTs neste sistema na concentração de $1\mu\text{g/mL}$ não causou qualquer alteração na pressão de perfusão (PP) e na resistência vascular renal (RVR). Porém o mesmo não ocorreu com os outros parâmetros que foram alterados. Aos 90 minutos, ocorreu um decréscimo significativo no ritmo de filtração glomerular (RFG) e no fluxo urinário (FU). O RFG foi reduzido já aos 60 minutos. Em relação ao transporte de eletrólitos, na concentração de $1\mu\text{g/mL}$, houve uma redução gradual e discreta no transporte tubular de sódio e cloreto já aos 60 minutos, sendo o transporte de cloreto um pouco mais afetado. Alteração mais significativa foi observada no percentual de transporte de potássio, que mostrou redução significativa aos 60 minutos, tornando-se ainda menor aos 90 minutos. O *clearance* osmótico, que é a capacidade de depuração renal em relação às moléculas osmoticamente ativas, teve seus valores decrescidos aos 90 e 120 minutos. Esta diminuição pode estar relacionada a diminuição do fluxo urinário, uma vez que este parâmetro é um produto do fluxo urinário e da relação entre osmolaridade urinária e do perfusato.

A formação de urina começa quando uma grande quantidade de fluido que é praticamente livre de proteína é filtrada a partir dos capilares glomerulares na cápsula de Bowman. A maioria das substâncias no plasma, com exceção de proteínas, são livremente filtradas, de modo que a sua concentração nos glomérulos é quase a mesma que no plasma. O ritmo de filtração glomerular é determinado pelo produto do coeficiente de ultrafiltração com as pressões de ultrafiltração dos capilares. As pressões de ultrafiltração compostas pelas pressões hidrostáticas nos capilares glomerulares e na

cápsula de Bowman, bem como pelas pressões coloidosmóticas nestes dois segmentos. A pressão hidrostática nos capilares glomerulares é modulada pelas resistências arteriolares aferentes e eferentes. O aumento da resistência das arteríolas aferentes reduz a pressão hidrostática e o RFG diminui. Todavia, a dilatação das arteríolas aferentes aumenta tanto a pressão hidrostática quanto o RFG (GUYTON *et al.*, 2009POR ULTIMA EDIÇÃO).

Logo, analisando os parâmetros vasculares, os quais não sofreram alteração, é consensual de que estes não tiveram qualquer influência sobre a redução do ritmo de filtração glomerular e fluxo urinário, excluindo a hipótese de alterações na função renal em decorrência de alterações na hemodinâmica renal, uma vez que se sabe que ritmo de filtração glomerular e fluxo urinário sofrem influências diretas do estado pressórico das arteríolas aferentes e eferentes renais. A medida da filtração glomerular permite avaliar em parte a função renal. Este parâmetro renal é um dos fatores determinantes na velocidade de formação da urina ou fluxo urinário. O perfusato é conduzido sob pressão nos capilares do glomérulo. Essa pressão tem intensidade suficiente para que parte da solução passe para a cápsula de Bowman, onde as substâncias pequenas saem do glomérulo e entram na cápsula de Bowman, formando o filtrado. Então, o estado pressórico das arteríolas aferentes e eferentes que compõem os glomérulos influencia o ritmo de filtração glomerular. Porém não é este o único determinante do RFG e, conseqüentemente, da formação da urina. O filtrado ao percorrer o sistema de túbulos nos néfrons, ainda sofre influências de transportadores de eletrólitos e de água, tendo sua composição alterada ao longo do trajeto. Logo, outros fatores determinantes do fluxo urinário são os transportes de eletrólitos e água ao longo dos túbulos renais (KOEPPEN *et al.*, 2009). A partir disso, a diminuição do fluxo urinário pode ter sido consequência da diminuição do ritmo de filtração glomerular, porém, não sendo este o único fator determinante, a alteração dos transportes de eletrólitos e água podem também ter influenciado este parâmetro. A redução do FU teria sido causada, então, por uma soma na alteração desses dois parâmetros: redução no RFG e redução no transporte de eletrólitos e água.

Resultados diferentes foram obtidos com concentrações maiores dos PSTs. A adição dos PSTs no sistema de perfusão renal na concentração de 3µg/mL causou alteração na pressão de perfusão (PP) e na resistência vascular renal (RVR) que não

havia sido alterados com a concentração de $1\mu\text{g/mL}$. Aos 90 e 120 minutos foram observados acréscimos significativos da PP, assim como na RVR.

O aumento na PP e na RVR pode estar relacionado com alguma atividade vasoativa dos PSTs sobre as arteríolas glomerulares aferentes e eferentes. Qualquer influência pressórica contrátil em um dos vasos citados promoveria aumento da PP, uma vez que são componentes do sistema vascular com maior influência sobre controle vasoativo. Observou-se um decréscimo significativo no ritmo de filtração glomerular (RFG) já a partir dos 60 minutos, permanecendo até os 120 minutos. Em contrapartida o fluxo urinário se intensificou, mostrando acréscimo aos 120 minutos, diferindo dos resultados encontrados com a concentração menor do PST. Os resultados no percentual de transporte de sódio obtidos no experimento de perfusão renal, na concentração de $3\mu\text{g/mL}$, mostraram aumento na excreção de sódio e cloreto aos 60, 90 e 120 minutos, sendo novamente o transporte de cloreto o mais afetado. No transporte de potássio, observou-se redução ainda mais significativa também aos 60, 90 e 120 minutos. Analisando o aumento do fluxo urinário aos 120 minutos, o que diferiu dos resultados encontrados com a concentração anterior, este pode estar relacionado com a alteração dos parâmetros vasculares, uma vez que o FU sofre influência direta do estado pressórico das arteríolas aferentes e eferentes renais. Com relação ao *clearance* osmótico, não foram observadas alterações significativas neste parâmetro com esta concentração dos PSTs.

A adição dos PSTs no sistema de perfusão renal na concentração de $4,5\mu\text{g/mL}$ causou alteração na pressão de perfusão (PP) e na resistência vascular renal (RVR), resultados que se assemelham aqueles encontrados com a concentração de $3\mu\text{g/mL}$. Aos 60, 90 e 120 minutos foram observados acréscimos significativos da PP, assim como na RVR. No ritmo de filtração glomerular (RFG) foi observado alteração somente aos 60 minutos. Em contrapartida o fluxo urinário se intensificou, mostrando acréscimos aos 90 e 120 minutos. Na concentração de $4,5\mu\text{g/mL}$, os resultados no percentual de transporte de sódio e cloreto obtidos no experimento de perfusão renal mostraram aumento na excreção de desses eletrólitos já aos 60, 90 e 120 minutos, resultados bem semelhantes aos encontrados com a concentração de $3\mu\text{g/mL}$. O *clearance* osmótico teve seus valores acrescidos aos 90 e 120 minutos. Este aumento do *clearance* osmótico pode ser devido a uma possível disfunção tubular somado ao aumento do fluxo urinário.

A diminuição da reabsorção tubular do sódio, eletrólitos com grande capacidade de carrear água, pode ter sido responsável pela alteração desse parâmetro.

Os resultados encontrados nas análises histológicas realizadas com os rins perfundidos com os PSTs nas três concentrações demonstraram alterações corticais. Foram observadas alterações tubulares (túbulos proximais e distais) e glomerulares. Esses resultados podem justificar as alterações nos transportes de eletrólitos, encontradas nos experimentos de perfusão, reforçando a hipótese de disfunção tubular renal promovida pelos polissacarídeos sulfatados totais. Não foram observadas alterações medulares.

Com o objetivo de verificar de maneira mais direta as atividades dos PSTs sobre as células renais em um curto período de tempo, avaliou-se o potencial citotóxico dos polissacarídeos utilizando culturas de células tubulares renais (MDCK), linhagem de células já bem estabelecida, com aspectos morfológicos e funcionais semelhantes às células tanto do túbulo coletor como do túbulo distal de mamíferos. Uma porção do néfron também já bastante caracterizada do ponto de vista molecular e funcional (COLLARES-BUZATO *et al.*, 2002). Para estudar a citotoxicidade dos PSTs da alga sobre as células renais, foi utilizado o método de redução do MTT, técnica utilizada para verificar a viabilidade celular através da avaliação de sua capacidade metabólica (MOSMAN *et al.*, 1983). Trata-se de um método indireto de avaliar efeitos citotóxicos de substâncias.

Podemos verificar através dos resultados que os PSTs demonstraram significativo efeito citotóxico sobre culturas de células tubulares MDCK, caracterizado pela redução da viabilidade celular em todas as concentrações estudadas quando comparada ao grupo controle. Em parte, estes resultados corroboram com aqueles demonstrados nos experimentos de perfusão de rim isolado de rato que mostraram desde alterações fisiológicas e funcionais, até alterações morfológicas, todas, podendo ser indicativas de danos tubulares, já que houve significativa alteração dos transportes de eletrólitos pelas células epiteliais renais em todas as concentrações estudadas dos PSTs neste sistema. De fato, em concordância com os resultados encontrados neste trabalho, achados recentes na literatura têm enfatizado efeitos citotóxicos de algas em diferentes linhagens celulares. Muitas espécies de algas do gênero *Gracilaria* já são bem reconhecidas por serem uma fonte potencial de descoberta de substâncias com atividades biológicas

diversas, inclusive por terem demonstrado efeitos citotóxicos (COURA *et al.*, 1012; FURUNO *et al.*, 2010; SHU *et al.*, 2013; YEH *et al.*, 2012).

Um trabalho recente estudando uma alga *Gracilaria*, comprovou o efeito citotóxico deste agente sobre cultura de células. Linhagens de células orais cancerígenas foram incubadas por 24 horas com o extrato da *Gracilaria tenuistipitata* para avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT, o mesmo utilizado em nosso trabalho. Em todas as concentrações, o extrato mostrou possuir efeitos citotóxicos contra células de câncer bucal de maneira dose-dependente (YEH *et al.*, 2012). Por outro lado, Yang *et al.* (2012) estudando os efeitos do extrato aquoso de *Gracilaria tenuistipitata* mostraram um papel citoprotetor e antioxidante em outras linhagens celulares. Neste trabalho foram testados diferentes concentrações do extrato (0,5; 1,2 e 4 mg/mL) em cultura de células de câncer de pulmão durante 24 horas para avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT. Estas células foram previamente tratadas com peróxido de hidrogênio (H₂O₂), substância que promove indução de estresse oxidativo. O resultado mostrado indicou que o extrato da alga aumentou a sobrevivência das células modulando o estresse oxidativo. Esta discordância de resultados pode estar ligada ao fato de em ambos os trabalhos citados acima terem sido realizados com extrato da alga. Isto sugere que diferentes frações do extrato poderia estar gerando atividades ambíguas. Em síntese, não somente algas da espécie *Gracilaria*, mas outras espécies e compostos marinhos em geral fornecem recursos abundantes para descoberta de drogas antiproliferativas (FAULKNER, 2002; HSU *et al.*, 2007).

Para determinação dos mecanismos de citotoxicidade dos PSTs da alga *Gracilaria cornea*, o efeito citotóxico da mesma sobre as células MDCK foi avaliado por citometria de fluxo. Este modelo trata-se de um método de análise de partículas, as quais passam individualmente por um feixe de luz, permitindo a verificação de diversos parâmetros, tanto morfológicos quanto funcionais, a partir da ocorrência de dispersão da luz e emissão de fluorescência de comprimento de onda específico. Para avaliação da externalização da fosfatidilserina pela membrana celular, as células tratadas com a substância em estudo, na concentração de 50 µg/mL, foram incubadas com anexina V marcada com FITC. Quando o sinal de morte celular ocorre, a fosfatidilserina é translocada para a face externa da membrana. A exposição da fosfatidilserina parece começar durante as fases procozes da apoptose, enquanto a membrana celular continua intacta, até os estágios finais, nos quais a célula se fragmenta, formando os corpos

apoptóticos (ENGELAND *et al.*, 1998). Dessa forma, a externalização e a ligação de anexina V são evidências de apoptose (MCHUGH *et al.*, 2006). A fosfatidilserina no folheto externo da membrana plasmática exerce a sinalização para a fagocitose, impedindo a lise celular e a liberação de antígenos intracelulares, evitando uma resposta inflamatória. As células foram, ainda, submetidas à marcação com iodeto de propídeo (IP) isoladamente ou em conjunto com anexina V-FITC. O IP é um corante vital que se liga ao DNA das células, mas não é capaz de penetrar em membranas celulares íntegras. O aparecimento de células marcadas unicamente com IP é indicativo de necrose, haja vista que nesse processo ocorre perda da integridade de membrana. No entanto, células em apoptose tardia são marcadas por anexina V-FITC e IP, estando no estágio final de desintegração celular.

O nosso trabalho mostrou claramente que os PSTs em todas as concentrações levaram a uma marcação significativa com anexina V-FITC, o que sugere fortemente indícios de processo apoptótico, não havendo células marcadas somente com IP, que indicaria morte por necrose. Adicionalmente, uma quantidade discreta de células apresentou marcação dupla de anexina V-FITC e IP, o que indica que este grupo estaria em apoptose tardia, característico de células que sofrem apoptose porém por não serem fagocitadas terminam por apresentar também características de células necróticas. Aquelas células que não são fagocitadas em tempo hábil podem apresentar características necróticas, processo conhecido como apoptose tardia. O modelo experimental utilizado no presente estudo é realizado com cultivo de células isoladas, não estando em contato com células fagocitárias, o que provavelmente levou a esta dupla marcação.

O mesmo grupo de Yeh *et al.* (2012) citados anteriormente, também estudou os tipos de morte celular que o extrato de outra espécie de *Gracilaria* estaria induzindo em culturas de células e seus achados corroboram com os do presente estudo. Estes pesquisadores trabalharam com células da mucosa bucal marcadas com anexina V-FITC, havendo intensa marcação dessas células de uma forma dose-dependente, confirmando a indução de apoptose causada por esta espécie de *Gracilaria* e que este mecanismo de morte estava ligado a via molecular das caspases. Bechelli *et al.* (2011) demonstraram estes mesmos efeitos citotóxicos ao estudar extratos diversos de algas marinhas. Cultura de células mielóides leucêmicas e normais foram marcadas tanto com anexina V quanto com IP e subsequentemente incubadas com diferentes extratos de algas para análise por citometria de fluxo. Tanto o extrato da alga *Dunaliella salina*

como o da *Aphanizomenon flos-aquae* promoveram aumento na indução de apoptose, caracterizado por intensa marcação de células normais e leucêmicas com anexina V.

Foi avaliado o efeito citotóxico do extrato de uma alga marrom, a *Sargassum muticum*, sobre linhagens de células carcinogênicas de mama e células renais de macaco. Neste estudo foi demonstrado mais uma vez o efeito citotóxico sobre células tumorais, porém não se observou o mesmo para as células renais normais. Assim, a alga marrom mostrou inibir o crescimento de células cancerígenas, o que poderia estar induzindo apoptose de forma dose-dependente pela ativação de caspases. Este estudo ainda sugeriu que substâncias ativas da alga poderiam estar interagindo com receptores especiais associados ao câncer, provocando mecanismos que causariam a morte de células tumorais (NAMVAR *et al.*, 2013). Outro trabalho que avaliou a atividade citotóxica da alga verde *Udotea flabellum* proveniente da costa do México em linhagens de células tumorais, foi empregada o teste colorimétrico com rodamina e o ensaio com MTT. Novamente os resultados deste trabalho corroboram com os do presente estudo, mostrando elevada atividade citotóxica e antiproliferativa nestas linhagens celulares (MOO-PUC *et al.*, 2011).

Um grupo de pesquisadores investigou a atividade citotóxica de uma fração fucoidana de alga marrom. As fucoidanas são polissacarídeos sulfatados purificados isolados de certas espécies de algas. Foi demonstrado neste trabalho o efeito citotóxico da fucoidana em culturas de células de adenocarcinoma gástrico por indução de apoptose, efeito este que estava sendo mediado por uma diminuição na expressão de genes antiapoptóticos, como o Bcl-2 e Bcl-xL, além de ativação de caspases (PARK *et al.*, 2011).

Ao induzir apoptose em um determinado tecido ou cultura de células um composto torna-se alvo para investigações mais aprofundadas, tendo como objetivo a elucidação das vias moleculares que levam a morte celular, sendo uma fonte para desenvolvimento de substâncias usadas nos protocolos terapêuticos contra doenças carcinogênicas. Como mencionado anteriormente, são muitos os estudos recentes que comprovam o envolvimento de algas marinhas ou componentes isolados destas em processo apoptóticos, inclusive espécies de *Gracilaria*. Até a presente data não há relatos de trabalhos que relacionam a *Gracilaria cornea* e a apoptose, porém alguns pesquisadores já mostraram envolvimento da espécie no processo (YEH *et al.*, 2012; YANG *et al.*, 2012).

Os resultados encontrados neste estudo que correlacionam os PSTs da *Gracilaria cornea* e a capacidade de induzirem apoptose em células tubulares renais, pode servir como base para justificar os resultados encontrados nos experimentos de perfusão de rim de rato isolado. A insuficiência renal aguda (IRA) é uma hipótese levantada para os efeitos dos PSTs no sistema de perfusão, uma vez que este alterou todos os transportes de eletrólitos nas três concentrações estudadas, levando a uma diminuição da função renal. Sugestivamente, esta insuficiência renal poderia estar sendo causada por indução de apoptose de células epiteliais renais promovida pelos polissacarídeos. De acordo com Basile *et al.* (1997), existem fortes evidências de trabalhos que estudaram vias de sinalização dentro deste contexto e que mostram o papel da apoptose na fisiopatologia da IRA.

A elucidação das vias de sinalização molecular relacionada com este processo de apoptose faz-se muito importante e uma vez conhecendo-se os mensageiros envolvidos no controle da apoptose promovida pelos PSTs, pode-se pensar na busca pelo desenvolvimento de drogas antitumorais a partir de frações das algas dessa espécie, ou mesmo, em estratégias terapêuticas que objetivem reduzir a insuficiência renal.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Os polissacarídeos sulfatados totais (PSTs) causaram alterações significativas na fisiologia e morfologia renal. Todos os parâmetros dos experimentos de perfusão foram alterados nas três concentrações estudadas do PSTs. Estes resultados estão resumidos na tabela 11. Os parâmetros vasculares, PP e RVR, sofreram aumento significativo nos tempos de 90 e 120 minutos com as concentrações de 3,0 e 4,5 µg/mL. Com a concentração maior essas alterações já foram observadas aos 60 minutos de perfusão.

O RFG sofreu redução com a concentração de 1 µg/mL nos tempos de 90 e 120 minutos. O FU, com esta concentração também apresentou decréscimos. Isto pode ter sido consequência de uma possível disfunção tubular, uma vez que o transporte de todos os eletrólitos encontrou-se reduzido. O FU sofreu aumento nos tempos de 90 e 120 minutos de perfusão com as maiores concentrações, efeito este que pode ser explicado pelo aumento dos parâmetros vasculares, manifestando-se como uma diurese pressórica. Os transportes de sódio, cloreto e potássio sofreram diminuição nos tempos de 60, 90 e 120 minutos de perfusão com todas as concentrações estudadas. Sugestivamente, estes efeitos podem estar ligados a uma possível lesão tubular renal promovida pelos PSTs, hipótese esta que se confirma com as análises histológicas dos rins perfundidos.

Os polissacarídeos da alga também exerceram efeitos citotóxicos em cultura de células tubulares renais MDCK. Os resultados encontrados nesse estudo demonstram que a citotoxicidade induzida pelos polissacarídeos, está relacionada sugestivamente ao mecanismo de morte por apoptose, não sendo este efeito dependente da concentração, uma vez que todas as concentrações causaram morte por igual. Este estudo abre caminhos para realização de mais trabalhos com o objetivo de buscar elucidar as vias de sinalização celular envolvidas no efeito apoptótico dos PSTs e sugere o uso potencial dessas moléculas no desenvolvimento de compostos bioativos.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ADAMS, Y.; SMITH, S. L.; SCHWARTZ ; ALBIEZ, R.; ANDREWS, K. T. Carrageenans inhibit the in vitro growth of *Plasmodium falciparum* and cytoadhesion to CD36. **Parasitol Res.**v. 97, p. 290-294, 2005.
- ARAÚJO, G. S.; FARIAS, W. R. L.; RODRIGUES, J. A. G.; TORRES, V. M.; PONTES, G. C. Administração oral dos polissacarídeos sulfatados da rodofícea *Gracilaria caudata* na sobrevivência de pós-larvas de tilápia. **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 39, p. 548-554, 2008.
- ASSREUY, A. M. S.; GOMES, D. M.; DA SILVA, M. S. J.; TORRES, V. M.; SIQUEIRA, R. C. L.; PIRES, A. F.; CRIDDLE, D. N.; DE ALENCAR, N. M. N.; CAVADA, B. S.; SAMPAIO, A. H.; FARIAS, W. R. L. Biological effects of a sulfated-polysaccharide isolated from the marine red algae *Champia feldmannii*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.31, p.691-695, 2008.
- BASILE, D. P. Expression of bcl-2 and bax in regeneration rat renal tubules following ischemic injury. **Am. J. Physiol.**, v. 272, p. 640-647, 1997.
- BEHELLI, J.; COPPAGE, M.; ROSELL, K.; LIESVELD, J. Cytotoxicity of Algae Extracts on Normal and Malignant Cells. **Leukemia Research and Treatment** Volume, 2011.
- BERTEAU, O.; MULLOY, B. Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, function, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. **Glycobiology**, v. 13, p. 29-40, 2003.
- BOERSMA, H. H.; KIETSELAER, B. L.; STOLK, L. M.; BENNAGHMOUCH, A.; HOFSTRA, L.; NARULA, J.; HEIDENDAL, G. A.; REUTELINGSPERGER, C. P. Past, present, and future of annexin A5: from protein discovery to clinical applications. **J. Nucl. Med.**, v. 46, p. 2035-2050, 2005.
- BOUJRAD, H.; GUBKINA O.; ROBERT N.; KRANTIC S.; SUSIN S. A. AIF-Mediated Programmed Necrosis: A Highly Regulated Way to Die. **Cell Cycle**, v. 6, n. 21, p. 2612- 2619, 2007.
- BOYD, W.C.; ALMODOVAR, L.R.; BOYD, L.G. Agglutinin in marine algae for human erythrocytes. **Transfusion**, p. 82-83, 1966.
- BUTLER, M.; DAWSON, M. (Ed.). **Cell culture**. Oxford: Blackwell, 1992.
- CARDOSO, M. A.; NOSEDA, M. D.; FUJII, M. T.; ZIBETTI, R. G.; DUARTE, M. E. Sulfated xylomannans isolated from red seaweeds *Chondrophycus papillosum* and *C. flagelliferus* (Ceramiales) from Brazil. **Carbohydr Res.**v. 342, p. 2766-2775, 2007.

CHAIM, O. M. Estudo da atividade citotóxica da proteína dermonecrótica do veneno da aranha marrom (*Loxosceles intermédia*) com ênfase no efeito nefrotóxico. Dissertação de Mestrado em Biologia Celular - Universidade Federal do Paraná, 2005.

CHAVES, F., GUTIÉRREZ, J.M., LOMONTE B, CERDAS, L. Histopathological and biochemical alterations induced by intramuscular injection of *Bothrops asper* (terciopelo) venom in mice. **Toxicon** v.10, p. 1085-1093, 1989.

CHIU, C.C.; CHANG, H.W.; CHUANG, D.W.; CHANG, F.R.; CHANG, Y.C.; CHENG, Y.S.; TSAI, M.T.; CHEN, W.Y.; LEE, S.S.; WANG, C.K.; *et al.* Fern plant-derived protoapigenone leads to DNA damage, apoptosis, and G(2)/m arrest in lung cancer cell line H1299. **DNA Cell Biol.** V. 28, p. 501–506, **2009**.

COLLARES-BUZATO, C. B.; LE SUEUR, L. P.; CRUZ-HOFLING. M. A. Impairment of the Cell-to-Matrix Adhesion and Cytotoxicity Induced by *Bothrops moojeni* Snake Venom in Cultured Renal Tubular Epithelia. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 181, p. 124–132, 2002.

COURA, C.O.; ARAÚJO, I.W.; VANDERLEI ,E.S.; RODRIGUES, J.A.; QUINDERÉ, A.L.; FONTES, B.P.; QUEIROZ, I.N.; MENEZES, D.B.; BEZERRA, M.M.E.; SILVA, A.A.; CHAVES, H.V.; JORGE, R.J.; EVANGELISTA, .JS.; BENEVIDES, N.M.; Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of Sulphated Polysaccharides from the Red Seaweed *Gracilaria cornea*. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 110, p. 335–341, 2012.

DA SILVA, A.O.; LÓPEZ, M.; GODOY, P. Intensive care unit treatment of acute renal failure following snake bite. **Am. J. Trop Med Hyg.** V. 28, p. 401-407, 1979.

DELATTRE C.; TARATRA ANDRÉE FENORADOSOA, T.A.; MICHAUD, P. Galactans: an overview of their most important sourcing and applications as natural polysaccharides. **Braz. arch. biol. technol.** v.54, **2011**.

DE LIMA, D. C.; ABREU, P. A.; DE FREITAS, C. C.; SANTOS, D. O.; BORGES, R. O.; DOS SANTOS, T. C.; CABRAL, L. M.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. Snake venom: Any clue for antibiotics and CAM. **eCAM**, v. 2, p. 39-47, 2005.

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

DIETRICH, C. P.; FARIAS, G. G. M.; ABREU, L. R. D.; LEITE, E. L.; SILVA, L. F.; NADER, H. B. A new approach for characterization of polysaccharides from algae: presence of four main acidic polysaccharides in three species of the Phaeophyceae. **Plant Science**, v.108, n.2, p.143-153, 1995.

ENGELAND, V. M.; NIELAND, L. J.; RAMAEKERS, F. C.; SCHUTTE, B.; REUTELINGSPERGER, C. P. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. **Cytometry**, v.31, p.1-9, 1998.

ESTEVEZ, J. M., CIANCIA, M., CERESO, A. S. The system of galactans of the red seaweed *Kappaphycus alvarezii* with emphasis on its minor constituents.

Carbohydrate Research, v.339, p.2575-2592, October 2004.

FARNDALE, R. W.; BUTTLE, D. J.; BARRETT, A. J. Improved quantitation and discrimination of sulfated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue.

Biochimica et Biophysica Acta (BBA), v. 883, p. 173-177, 1986.

FARIAS, W.R.L.; VALENTE, M.S.; PEREIRA, M.S.; MOURÃO, P.A.S. Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans – isolation of a unique sulfated galactan from the red algae *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans from in vertebrates. **J Biol. Chem.** V. 275, p. 299–307, 2000.

FARIAS, W. R. L.; NAZARETH, R. A.; MOURÃO, P. A. S. Dual effects of sulfated D-galactans from the red alga *Botryocladia occidentalis* preventing thrombosis and inducing platelet aggregation. **Thrombosis and Haemostasis**, Stuttgart, v.86, p. 1540-1546, 2001.

FAULKNER, D.J. Marine natural products. **Nat. Prod. Rep.**, v. 19, p. 1-48, 2002.

FONSECA, R. J. C., OLIVEIRA, S. N. M. C. G., MELO, F. R., PEREIRA, M. G., BENEVIDES, N. M. B., MOURÃO, P. A. S. Slight differences in sulfation of algal galactans account for differences in their anticoagulant and venous antithrombotic activities. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 99, p. 539-545, 2008.

FONTELES, M.C., COHEN, J.J., BLACK, A.J. AND WERTHEIM, S.J. Support of renal kidney function by long-chain fatty acids derived from renal tissue. **Am. J. Physiol.** V. 244, p. 235-246, 1983.

FRESHENEY, R. I. A manual of basic techniques. **Culture of Animal Cells**, 2000.

FURUNO, A.; WATARI, K.; NAKAMURA, M.; FUKUNAGA, Y.; JUNG, J.H.; ONO, M. A natural anti-inflammatory enone fatty acid inhibits angiogenesis by attenuating nuclear factor- κ B signaling in vascular endothelial cells. **International Journal of oncology**. V. 38, p. 493-501, 2011.

GREENWELL, H. C.; LAURENS, L. M.L.; JARVIS, R. M.; SHIELDS, R. J.; LOVITT, R. W.; FLYNN, K. J. Biocombustível: microalgas podem ser a solução? **Revista Panorama da Aqüicultura**. v. 28, p. 40-45, 2008.

GUYTON, A.C.; HALL, J. E. Guyton & Hall: Textbook of Medical Physiology. 11^a ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2009.

HANSON, R.W., BALLARD, F.S. Citrate, pyruvate and lactate contaminants of commercial serum albumin. **J. Lipid Res.** v. 9, p. 667-668, 1968.

HAYASHI, K.; HAYASHI, T.; KOJIMA, I. A natural sulfated polysaccharide, calcium spirulan, isolated from *Spirulina platensis*: In vitro and ex vivo evaluation of anti-herpes

simplex virus and anti-human immunodeficiency virus activities. **Aids Research and Human Retroviruses**, v.12, p.1463-1471, 1996.

HEINRICH, E.L.; WELTY, L.A.Y.; BANNER, R.R.; OPPENHEIMER, S.B.; Direct targeting of cancer cells: A multiparameter approach. **Acta Histochemica**, v. 107, p. 335-344, 2005.

HENGARTNER, M. O. The Biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407. p. 770– 776, 2000.

HO, Y.T.; LU, C.C.; YANG, J.S.; CHIANG, J.H.; LI, T.C.; IP, S.W.; HSIA, T.C.; LIAO, C.L.; LIN, J.G.; WOOD, W.G.; et al. Berberine induced apoptosis via promoting the expression of caspase-8, -9 and -3, apoptosis-inducing factor and endonuclease G in SCC-4 human tongue squamous carcinoma cancer cells. **Anticancer Res.** v. 29, p. 4063–4070, 2009.

HSU, B.Y.; TSAO, C.Y.; CHIOU, T.K.; HWANG, P.A.; Hwang, D.F. HPLC determination for prostaglandins from seaweed *Gracilaria gigas*. **Food Control**. v. 18, p. 639–645, 2007.

HUHEIHEL, M.; ISHANU, V.; TAL, J.; ARAD, S. M. Activity of *Porphyridium sp.* polysaccharide against herpes simplex viruses in vitro and in vivo. **J Biochem Biophys Methods**. v. 50, p. 189-200, 2002.

KLOAREG, B.; QUATRANO, R. S. Structure of the cell wall of marine algae and ecophysiological functions of matrix polysaccharides. **Oceanography Marine Biological Annual Review**, v.26, p.259-315, 1998.

KOEPPEN, B. M. & STANTON, B. A. Berne & Levy: Fisiologia 6^a ed., Ed. Elsevier, Rio de Janeiro, 2009.

LEE, R.E. Phycology. 2nd ed. New York: **Cambridge University Press**. p. 715, 1989.

LEVRING, T.; HOPPE, H.A.; SCHMID, O.J. Marine Algae. A survey of research and utilization. **Botanical Marine Handbook**. p. 421, 1969.

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) **Journal of Applied Toxicology**. p. 20-26, 2009.

MACEY, M. G. **Flow cytometry - clinical applications**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1994.

MACHADO JUNIOR, J. C.; FLORÃO, A.; FERNANDA, V.R.; MATTANA, F.H.R.; CID, A.M.; SANTOS, A. M.; WEFFORT-SANTOS, A. Citometria de fluxo como instrumento de avaliação da atividade imunomodulatória de extratos e substâncias isoladas de plantas medicinais. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.16, p.645- 652, 2006

MACIEL, J. S.; CHAVES, L. S.; SOUZA, B. W. S.; TEIXEIRA, D. I. A.; FREITAS, A. L. P.; FEITOSA, J. P. A.; DE PAULA, R. C. M. Structural characterization of cold

- extracted fraction of soluble sulfated polysaccharides from red seaweed *Gracilaria birdiae*. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, p. 559-565, 2008.
- MARINHO-SORIANO, E. Agar polysaccharides from *Gracilaria* species (Rhodophyta, Gracilariaceae). **Journal of Biotechnology**, v. 89, p. 81-84, 2001a.
- MARINHO-SORIANO E.; BOURRET E. Effects of season on the yield and quality of agar from *Gracilaria* species (Gracilariaceae, Rhodophyta). **Bioresour Technol.** v. 90, p. 329–33, 2003.
- MARINHO-SORIANO, E; BOURRET, E. Polysaccharides from the seaweed *Gracilaria dura* (Gracilariales, Rhodophyta). **Bioresour. Technol.**, v. 96, p. 379-382, 2005.
- MARTINEZ-MALDONADO, M; OPVA-STITZER, R. Free water clearance curves during saline, mannitol, glucose and urea diuresis. *J. Physiol.*, v. 280, p. 487-497, 1978.
- MARTINS, A. M. C.; SOUSA, F. C. M; BARBOSA, P. S. F. et al. Action of anti-thrombotic factor isolated from *Didelphis marsupialis* on renal effects of *Bothrops erythromelas* venom. **Toxicon**, v. 46, p. 595-599, 2005.
- MASUKO, T.; MINAMI, A.; IWASAKI, N.; MAJIMA, T.; NISHIMURA, S.; LEE, Y. C. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. **Analytical Biochemistry**, v. 339, p. 69-72, 2005.
- MATSUBARA, K.; MATSUURA, Y.; BACIC, A.; LIAO, M. L.; HORI, K.; MIYAZAWA, K. Anticoagulant properties of a sulfated galactan preparation from a marine green alga, *Codium cylindricum*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.28, p.395-399, 2001.
- MCHUGH P., TURINA M. Apoptosis and necrosis: a review for surgeons. **Sur. Infect. (Larchmt)**, v.7, p. 53-68, 2006.
- MELO, M.R.S.; FEITOSA, J.P.A.; FREITAS, A.L.P.; PAULA, R.C.M. Isolation and characterization of soluble of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria cornea*. **Carbohydr Polym.** v. 49, p. 491–498, 2002.
- MOCHIZUKI, T.; KUGE, Y.; ZHAO, S.; TSUKAMOTO, E.; HOSOKAWA, M.; MODESTO, J. C. A.; SPENCER, P. J.; FRITZEN, M.; VALENÇA., R. C.; OLIVA, M. L. V.; SILVA, M. B.; TAVASSI, A. M. C.; GUARNIERI, M. C. BE-I-PLA2, a novel acidic phospholipase A2 from *Bothrops erythromelas* venom: Isolation, cloning and characterization as potent anti-platelet and inductor of prostaglandin I2 release by endothelial cells. **Biochem.Pharmacol.** v. 72, p. 377– 384, 2006.
- MOO-PUC, R.; ROBLEDO, D.; FREILE-PELEGRIN, Y. Improved Antitumoral Activity of Extracts Derived from Cultured *Penicillium dumetosus*. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research.** v. 10, P. 177-177, 2011.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MOURÃO, A.P.S. Use of sulfated fucans as anticoagulant and antithrombotic agents: future perspectives. **Current Pharmacological Design**, v.10, p.967-981, 2004.

MOURÃO, P.A.S. and Pereira M. S. Searching for alternatives to heparin: sulfated fucans from marine invertebrates. **Tren. Cardio. Med.**, v. 9, p. 225-232, 1999.

NAMVAR, F.; MOHAMAD,R.; BAHARARA, J.; ZAFAR-BALANEJAD, S.; FARGAHI, F.; RAHMAN, H.S. Antioxidant, Antiproliferative, and Antiangiogenesis Effects of Polyphenol-Rich Seaweed (*Sargassum muticum*). **Corporation BioMed Research**. International Volume, 2013.

PAINTER, T. J. Algal Polysaccharides. In ASPINALL, G. O. (Ed.). **The Polysaccharides**. Academic Press, New York. v. 2, p 195-285, 1983.

PARK, H.S.; KIM, G.Y.; NAM, T.J.; DEUK KIM, N.; HYUN CHOI, Y. Antiproliferative activity of fucoidan was associated with the induction of apoptosis and autophagy in AGS human gastric cancer cells. **J Food Sci**.v. 76, p. 77-83, 2011.

PATEL T. Apoptosis in hepatic pathophysiology. **Clin Liver Dis**, v. 4, p. 295-317, 2000.

PATEL T., GORES GJ. Apoptosis in liver transplantation: a mechanism contributing to immune modulation, preservation injury, neoplasia, and viral disease. **Liver Transplant Surg**. v. 4, p. 42-50, 1998.

PERCIVAL, E.; McDOWELL, R.H. **Chemistry and enzymology of Marine Algal Polysaccharides**. New York: Academic Press, 1967.

QUEIROZ, I.N.L. Atividade antitrombótica dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *gelidiella acerosa* (forsskål) feldmann & g. hamel coletada nas praias dos municípios de Flecheiras e Paracuru do litoral cearense. Dissertação de Mestrado em Bioquímica - Universidade Federal do Ceará, 2010.

RASMUSSEN, R. S.; MORRISSEY, M. T. Marine biotechnology for production of fooding redients. **Adv Food Nutr Res**.v. 52, p. 237-292, 2007.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 7th ed. Editora Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro, 2007.

REZENDE, N.A., AMARAL, C.F.S., BAMBIRRA, F.A., LACHATT, J.J., COIMBRA, T.M. Functional and histopathological renal changes induced in rats by Bothrops jararaca venom. **Braz. J. Med Biol Res**. v. 22, p. 407-416, 1989.

RODRIGUES, J. A. G.; JÚNIOR, J. S.; LOURENÇO, J. A.; LIMA, P. C. W. C.; FARIAS, W. R. L. Cultivo de camarões tratados com polissacarídeos sulfatados da

- rodofícea *Halymenia pseudofloresia* mediante uma estratégia profilática. **Revista Ciência Agronômica**, v.40, p.71-78, 2009a.
- RODRIGUES, J. A. G.; TORRES, V. M.; DE ALENCAR, D. B.; SAMPAIO, A. H.; FARIAS, W. R. L. Extração e atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresia*. **Revista Ciência Agronômica**, v.40, p.224-231, 2009b.
- RODRIGUES, J. A. G.; VANDERLEI, E. S. O.; QUINDERÉ, A. L. G.; FONTES, B. P.; BENEVIDES, N. M. B. Polissacarídeos sulfatados isolados das clorofíceas *Caulerpa racemosa* e *Caulerpa cupressoides* – extração, fracionamento e atividade anticoagulante. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 32, p. 113-120, 2010.
- SAITO, R.M.; OLIVEIRA, E.C. Chemical screening of Brazilian marine algae producing carrageenans. **Hydrobiology**. p. 585-588, 1990.
- SHANG, L.H.; LI, C.M.; YANG, Z.Y.; CHE, D.H.; CAO, J.Y.; YU, Y. *Luffa echinata* Roxb. Induces human colon cancer cell (HT-29) death by triggering the mitochondrial apoptosis pathway. **Molecules**. v. 17, p. 5780–5794, 2012.
- SOUTH, G.R.; WHITTICK, A. Introduction to Phycology, **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, 1987.
- STEVAN, F. R.; OLIVEIRA, M. B.; BUCCHI, D. F.; NOSEDA; IACOMINI, M.; DUARTE, M. E. Cytotoxic effects against HeLa cells of polysaccharides from seaweeds. **J Submicrosc Cytol Pathol**.v. 33, p. 477-484, 2001.
- STORTZ, C.A.; CERESO, A.S. Novel findings in carrageenans, agaroids and “hybrid” red seaweed galactans. **Curr. Topics Phytochem**. v. 4, p. 121-134, 2000.
- SZE, P. **A biology to the algae** (3 ed). p. 278. New York, 1997.
- TALARICO, L. B.; PUJOL, C. A.; ZIBETTI, R. G. M.; FARIA, P. C. S.; NOSEDA, M. E. R.; DAMONTE, E. B. The antiviral activity of sulfated polysaccharides against dengue virus is dependent on virus serotype and host cell. **Antiviral Research**. v.66, p.103-110, 2005.
- THOMPSON, C.B. Apoptosis. In: Paul WE. **Fundamental immunology** (4 Ed.). Philadelphia, p.813-29, 1999.
- TRIOUS, A.; SEBRANEK, J.G. Carrageenans and their use in meat products. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr**. v. 36, p. 69-85, 1996.
- USOV, A. I. NMR Spectroscopy of red seaweed polysaccharides: agars, carragenans and xylans. **Botanica Marina**. v.27, p. 189-202, 1984.
- VAN DEN HOEK, C.; MANN, D.G.; JAHNS, H.M. *Algae, an introduction to phycology*, (1 Ed.). Cambridge University Press, Cambridge. P. 627, 1989.
- VIEIRA Jr, J. M. Atualização em insuficiência renal: expressão gênica na insuficiência renal aguda (IRA). **J. Bras. Nefrol.**, v. 23, n. 4, p. 230-233, 2001.

YANG, J.I.; YEH, C.C.; LEE, J.C.; YI, S.C.; HUANG, H.W.; CHAO-NENG TSENG, C.N.; CHANG, H.W. Aqueous Extracts of the Edible *Gracilaria tenuistipitata* are Protective Against H₂O₂-Induced DNA Damage, Growth Inhibition, and Cell Cycle Arrest. **Molecules**. v. 17, p. 7241-7254, 2012.

YEH, C.C.; TSENG, C.N.; YANG, J.I.; HUANG, H.W.; FANG, Y.; TANG, J.Y.; CHANG, F.R.; CHANG, H.W. Antiproliferation and Induction of Apoptosis in Ca9-22 Oral Cancer Cells by Ethanolic Extract of *Gracilaria tenuistipitata*. **Molecules**. v. 17, p. 10916-10927, 2012.

YEN, C.Y.; CHIU, C.C.; CHANG, F.R.; CHEN, J.Y.; HWANG, C.C.; HSEU, Y.C.; YANG, H.L.; LEE, A.Y.; TSAI, M.T.; GUO, Z.L.; *et al.* 4beta-Hydroxywithanolide E from *Physalis peruviana* (golden berry) inhibits growth of human lung cancer cells through DNA damage, apoptosis and G2/M arrest. **BMC Cancer** . v. 10, p. 46, 2010.

WALSER, M.; DAVIDSON, D.G.; ORLOFF, J. The renal clearance of alkalistable inulin. **J. Clin. Invest.**, v. 34, p. 1520-1523, 1955.

WANG, Y. F; ZHANG, L. N; LI, Y. Q; HOU, X. H; ZENG, F .B. Correlation of structure to antitumor activities of five derivates of a glucan from *Poria cocos* sclerotium. **Carbohydrate Research**, v. 339, p.2567-2574, 2004.

WIJESEKARA, I.; PANGESTUTI R.; KIMA, S. Review – Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. **Carbohydr Polym**. v. 84, p. 14–21, 2011.

ZHANG, J.Y. Apoptosis-based anticancer drugs. **Nat. Rev. Drug Discov**. v. 1, p. 101-102, 2002.

ZHANG, Y.; LUO, M.; ZU, Y.; FU, Y.; GU, C.; WANG, W.; YAO, L.; Efferth, T. Dryofragin, aphloroglucinol derivative, induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through ROS-mediated mitochondrial pathway. **Chem. Biol. Interact.** v. 199, p. 129-136, 2012.

ZHOU, G.; SUN, Y. P; XIN, H.; ZHANG, Y. N; LI, Z.; XU, Z. H. In vivo antitumor and immunomodulation activities of different molecular weight lambda-carrageenans from *Chondrus ocellatus*. **Pharmacological Research**, v.50, p. 47-53, 2004.

ZVYAGINTSEVA, T. N.; SHEVCHENKO, N. M.; NAZAROVA, I. V.; SCOBUN, A. S.; LUKYANOV, P. A.; ELYAKOVA, L. A. Inhibition of complement activation by water- soluble polysaccharides of some far-eastern brown seaweeds. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**. v. 126, p. 209-215, 2000.