



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

**ESTUDO DAS ATIVIDADES ANTITUMORAL E INFLAMATÓRIA DO  
ALGINATO ISOLADO DA ALGA *Sargassum vulgare* C. AGARDH.**

KÉZIA OLIVEIRA ABRANTES DE LACERDA LINS

FORTALEZA – CE

2012

**KÉZIA OLIVEIRA ABRANTES DE LACERDA LINS**

**ESTUDO DAS ATIVIDADES ANTITUMORAL E INFLAMATÓRIA DO ALGINATO  
ISOLADO DA ALGA *Sargassum vulgare* C. AGARDH.**

**Tese submetida à Coordenação do programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Farmacologia.**

**Orientadora:**

**Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Leticia Veras Costa Lotufo**

**Fortaleza - CE**

**2012**

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

---

L731e Lins, Kézia Oliveira Abrantes de Lacerda.  
Estudo das atividades antitumoral e inflamatória do alginato isolado da alga Sargassum  
Vulgare C. Agardh. / Kézia Oliveira Abrantes de Lacerda Lins. – 2012.  
121 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará; Faculdade de Medicina; Departamento de  
Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, 2012.

Área de Concentração: Farmacologia.

Orientação: Profa. Dra. Leticia Veras Costa Lotufo.

1. Alginatos. 2. Sargassum Vulgare. 3. Ensaio de Seleção de Medicamentos Antitumorais  
4. Toxicidade I. Título.

---

CDD 615.32945

**KÉZIA OLIVEIRA ABRANTES DE LACERDA LINS**

**ESTUDO DAS ATIVIDADES ANTITUMORAL E INFLAMATÓRIA DO ALGINATO  
ISOLADO DA ALGA *Sargassum vulgare* C. AGARDH.**

Aprovada em 13 de janeiro de 2012

Tese submetida à coordenação do programa de Pós-graduação em Farmacologia como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Farmacologia outorgado pela Universidade Federal do Ceará.

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Profa. Dra. Leticia Veras Costa-Lotufo** (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará

---

**Profa. Dra. Mariana Lima do Vale** (Co-orientadora)

Universidade Federal do Ceará

---

**Profa. Dra. Ana Maria Sampaio Assreuy**

Universidade Estadual do Ceará

---

**Prof. Dr. Diego Veras Wilke**

Universidade Federal do Ceará

---

**Profa. Dra. Camila Indiani de Oliveira**

Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz

## AGRADECIMENTOS

À Profª Drª Leticia Veras Costa-Lotufo, pela orientação deste trabalho e por tudo o que ela me ensinou nestes 6 anos juntas;

À Profª. Drª. Mariana Lima do Vale, pela co-orientação deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Diego Veras Wilke, pela ajuda com os experimentos e pela participação na banca;

À Profª. Drª. Ana Maria Sampaio Assreuy, pela participação na banca;

À Profª. Drª. Camila Indiani de Oliveira, pela participação na banca;

À Profª Drª Claudia do Ó Pessoa, pelo apoio no laboratório;

Ao Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes, pela contribuição à pesquisa no Laboratório de Oncologia Experimental;

À Profª Drª Ana Paula Negreiros Nunes Alves, pelos esclarecimentos sobre patologia e as análises histopatológicas;

À Profª Drª Nylane Maria Nunes Alencar, pela ajuda com os testes bioquímicos;

Ao Prof. Dr. Ronaldo Ribeiro, pela disponibilização do Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer para a realização dos experimentos;

Aos colegas da graduação e pós-graduação do Laboratório de Oncologia Experimental e do Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer pela amizade e ajuda;

Aos colegas do LABOMAR, por me emprestarem o laboratório e toda a ajuda;

Aos técnicos do Laboratório de Oncologia Experimental e do Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer, por toda a colaboração nos experimentos;

Aos professores da Pós-graduação em Farmacologia pelos ensinamentos;

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia;

Aos meus pais, Gregório e Sandra, por me darem a vida, me ensinarem O caminho e por estarem ao meu lado sempre, aconteça o que acontecer;

Aos meus irmãos, Levi e Mateus, por fazerem parte da minha história;

Ao meu esposo Carlos Lins, meu eterno amor, melhor amigo e companheiro sempre;

A minha amada filha Chloe, que mudou radicalmente minha vida, pra muito melhor;

A todos que, diretamente ou indiretamente, contribuíram para a minha formação pessoal e acadêmica ou para a execução deste trabalho;

Aos órgãos financiadores dos projetos de pesquisa do Laboratório de Oncologia Experimental, CNPq, FINEP, FUNCAP e BNB;

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>20</b>
1.1 Câncer.....	20
1.2 Polissacarídeos como modificadores da resposta biológica.....	31
1.3 Algas como fonte de produtos bioativos.....	37
1.4 Alginatos.....	41
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>45</b>
2.1 Geral.....	45
2.2 Específicos.....	45
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>47</b>
3.1 Células.....	47
3.2 Coleta e limpeza do material biológico.....	47
3.3 Extração do alginato.....	48

3.4 Atividade citotóxica <i>in vitro</i> .....	50
3.4.1 Ensaio do MTT.....	50
3.4.1.1 Manutenção das células.....	50
3.4.1.2 Procedimento experimental.....	50
3.4.1.3 Análise dos dados.....	51
3.5 Estudo da atividade antitumoral <i>in vivo</i> .....	51
3.5.1 Obtenção e manutenção dos animais.....	51
3.5.2 Cultura celular.....	51
3.5.3 Modelo Melanoma.....	51
3.5.3.1 Procedimento experimental.....	51
3.5.3.2 Análise dos dados.....	52
3.5.4 Análise morfológica e histopatológica.....	52
3.5.4.1 Procedimento experimental.....	52
3.5.4.2 Análise dos dados.....	53
3.5.5 Determinação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos.....	53
3.5.5.1 Procedimento experimental.....	53
3.5.5.2 Análise dos dados.....	53
3.6 Atividade Imunoestimulatória.....	54
3.6.1 Ativação de macrófagos <i>in vitro</i> .....	54
3.6.2 Migração de neutrófilos.....	54
3.6.2.1 Procedimento experimental.....	54



3.6.2.2	Análise dos dados.....	55
3.6.3	Detecção de citocinas.....	55
3.6.3.1	Procedimento experimental.....	55
3.6.3.2	Análise dos dados.....	56
3.6.4	Atividade edematogênica.....	56
3.6.4.1	Obtenção e manutenção dos animais.....	56
3.6.4.2	Procedimento experimental.....	56
3.6.4.3	Análise dos dados.....	57
3.6.5	Atividade da mieloperoxidase (MPO).....	57
3.6.5.1	Procedimento experimental.....	57
3.6.5.2	Análise dos dados.....	58
3.6.6	Determinação de citocinas.....	58
3.6.6.1	Procedimento experimental.....	58
3.6.6.2	Análise dos dados.....	58
3.6.7	Efeitos de moduladores farmacológicos no edema de pata.....	59
3.6.7.1	Procedimento experimental.....	59
3.6.7.2	Análise dos dados.....	59
3.6.8	Efeito de SVHV na degranulação de mastócitos peritoneais.....	59
3.6.8.1	Procedimento experimental.....	59
3.6.8.2	Análise dos dados.....	60
3.6.9	Avaliação do papel dos mastócitos peritoneais na migração de neutrófilos induzida por SVHV.....	60

3.6.9.1 Procedimento experimental.....	60
3.6.9.2 Análise dos dados.....	60
3.6.10 Avaliação do papel dos macrófagos peritoneais na migração de neutrófilos induzida por SVHV.....	61
3.6.10.1 Procedimento experimental.....	61
3.6.10.2 Análise dos dados.....	61
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>63</b>
4.1 Atividade citotóxica <i>in vitro</i> .....	63
4.2 Estudo da atividade antitumoral <i>in vivo</i> .....	63
4.2.1 Inibição tumoral.....	63
4.2.2 Análise morfológica e histopatológica.....	65
4.2.3 Determinação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos.....	71
4.3 Atividade imunoestimulatória.....	74
4.3.1 Ativação de macrófagos <i>in vitro</i> .....	74
4.3.2 Atividade edematogênica.....	76
4.3.3 Atividade da Mieloperoxidase (MPO).....	77
4.3.4 Determinação de citocinas.....	78
4.3.5 Efeito de moduladores farmacológicos no edema de pata.....	80
4.3.6 Efeito de SVHV na degranulação de mastócitos peritoneais.....	82
4.3.7 Avaliação do papel dos mastócitos peritoneais na migração de neutrófilos induzida por SVHV.....	83
4.3.8 Avaliação do papel dos macrófagos peritoneais na migração de neutrófilos	

induzida por SVHV.....	84
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>86</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>99</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>101</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>123</b>

## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b>	Ilustração esquemática das capacidades adquiridas do câncer.....	22
<b>Figura 2</b>	Ilustração esquemática da relação entre os aspectos intrínsecos às células e o sistema imune na progressão tumoral.....	25
<b>Figura 3</b>	Ilustração esquemática da ativação da célula T.....	27
<b>Figura 4</b>	Ilustração esquemática do mecanismo proposto para ativação de células imunes por polissacarídeos modificadores da resposta biológica .....	37
<b>Figura 5</b>	Alginato composto por dois resíduos de ácido gulurônico e dois ácidos manurônicos através de ligações (1-4).....	42
<b>Figura 6</b>	Fotografia da alga <i>Sargassum vulgare</i> .....	48
<b>Figura 7</b>	Fluxograma de extração e purificação do alginato.....	49
<b>Figura 8</b>	Efeito do alginato isolado da alga <i>Sargassum vulgare</i> (SVHV) sobre o volume tumoral de camundongos <i>Mus musculus</i> C57BL/6 transplantados com Melanoma B-16.....	64
<b>Figura 9</b>	Efeito do alginato isolado da alga <i>Sargassum vulgare</i> (SVHV) sobre a massa tumoral de camundongos <i>Mus musculus</i> C57BL/6 transplantados com Melanoma B-16.....	64
<b>Figura 10</b>	Microfotografias de cortes histológicos (400X) de tumores de camundongos <i>Mus musculus</i> C57BL/6 transplantados com células tumorais de Melanoma B-16.....	67
<b>Figura 11</b>	Microfotografias de cortes histológicos (400X) de fígados de camundongos <i>Mus musculus</i> C57BL/6 transplantados com células tumorais de Melanoma B-16. A- grupo controle (salina); B- SVHV (25 mg/Kg/dia, i.p.); C- SVHV (25 mg/Kg/dia, v.o.).....	

<b>Figura 12</b>	Microfotografias de cortes histológicos (400X) de rins de camundongos <i>Mus musculus</i> C57BL/6 transplantados com células tumorais de Melanoma B-16. A- grupo controle (salina); B- SVHV (25 mg/Kg/dia, i.p.); C- SVHV (25 mg/Kg/dia, v.o.).....	69
<b>Figura 13</b>	Microfotografias de cortes histológicos (400X) de baços de camundongos <i>Mus musculus</i> C57BL/6 transplantados com células tumorais de Melanoma B-16. A- grupo controle (salina); B- SVHV (25 mg/Kg/dia, i.p.); C- SVHV (25 mg/Kg/dia, v.o.).....	70
<b>Figura 14</b>	Indução da migração de neutrófilos peritoneais com sobrenadante de macrófagos isolados de camundongos <i>Mus musculus</i> C57BL/6 e estimulados <i>in vitro</i> com Salina, LPS (10 µg/mL) ou com o alginato isolado de <i>Sargassum vulgare</i> (SVHV; 1, 10 e 100 µg/mL) após 3 e 24 horas de incubação.....	75
<b>Figura 15</b>	Dosagem de TNF- $\alpha$ em sobrenadante de macrófagos peritoneais de camundongos <i>Mus musculus</i> C57BL/6 estimulados <i>in vitro</i> com Salina, LPS (10 µg/mL) ou com o alginato isolado de <i>Sargassum vulgare</i> (SVHV; 1, 10 e 100 µg/mL) após 3 horas de incubação.....	75
<b>Figura 16</b>	Efeito do alginato isolado de <i>Sargassum vulgare</i> (SVHV) sobre a formação de edema de pata em ratos.....	76
<b>Figura 17</b>	Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em edema de pata causada por alginato isolado de <i>Sargassum vulgare</i> (SVHV) em ratos.....	79
<b>Figura 18</b>	Dosagem de citocinas em edema de pata causado por alginato isolado de <i>Sargassum vulgare</i> (SVHV) em ratos.....	79
<b>Figura 19</b>	Efeito de moduladores farmacológicos no edema de pata causado por alginato isolado de <i>Sargassum vulgare</i> (SVHV).....	81
<b>Figura 20</b>	Efeito do alginato isolado de <i>Sargassum vulgare</i> (SVHV) em degranulação	82

	de mastócitos peritoneais.....	
<b>Figura 21</b>	Papel de mastócitos na migração de neutrófilos induzida por alginato isolado de <i>Sargassum vulgare</i> (SVHV).....	83
<b>Figura 22</b>	Papel de macrófagos residentes na migração de neutrófilos induzida por alginato isolado de <i>Sargassum vulgare</i> (SVHV).....	84
<b>Figura 23</b>	Figura esquemática sobre os efeitos do alginato isolado da alga <i>Sargassum vulgare</i> (SVHV) sobre o sistema imune.....	97

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1</b>	Efeito do alginato isolado da alga <i>Sargassum vulgare</i> (SVHV) em camundongos <i>Mus musculus</i> C57BL/6 transplantados com Melanoma B-16.....	47
<b>Tabela 2</b>	Efeito do alginato isolado da alga <i>Sargassum vulgare</i> (SVHV) em camundongos <i>Mus musculus</i> C57BL/6 transplantados com Melanoma B-16.....	66
<b>Tabela 3</b>	Efeito do alginato isolado da alga <i>Sargassum vulgare</i> (SVHV) sobre os parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos <i>Mus musculus</i> C57BL/6 transplantados com Melanoma B-16.....	72
<b>Tabela 4</b>	Efeito do alginato isolado da alga <i>Sargassum vulgare</i> (SVHV) sobre as alterações hematológicas em sangue periférico de camundongos <i>Mus musculus</i> C57BL/6 transplantados com Melanoma B-16.....	73

## Lista de Símbolos e Abreviaturas

ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
CI <sub>50</sub>	Concentração inibitória média
DMSO	Dimetilsulfóxido
E.P.M.	Erro padrão da média
FGF	Fator de crescimento do fibroblasto
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IL1-12	Interleucina 12
IFN- $\gamma$	Interferon $\gamma$
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
PBS	Phosphate buffer saline (Tampão fosfato salino)
pRb	Proteína do retinoblastoma
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
DC	Célula dendrítica
CAM	Molécula de adesão intercelular
CD4 <sup>+</sup>	Linfócito T auxiliar
CD8 <sup>+</sup>	Linfócito T citotóxico
TLRs	Receptores <i>Toll like</i>
NK	Células <i>natural killer</i>



## RESUMO

### **ESTUDO DAS ATIVIDADES ANTITUMORAL E INFLAMATÓRIA DO ALGINATO ISOLADO DA ALGA *Sargassum vulgare* C. AGARDH.**

Kézia Oliveira Abrantes de Lacerda Lins. Orientadora: Letícia Veras Costa Lotufo. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFC, 2012.

O câncer é uma doença que afeta cada vez mais um número maior de pessoas em todo o mundo. As terapias atuais utilizadas para o tratamento do câncer são ainda insatisfatórias. Produtos naturais têm sido avaliados para seleção de compostos ativos, capazes de reduzir os tumores malignos de uma forma mais eficiente e com menos efeitos indesejáveis. O alginato extraído da alga *Sargassum vulgare* C. AGARDH (SVHV) foi testado para avaliação do seu potencial antitumoral e imunoestimulante. Além disso, foram feitos testes de toxicidade do fígado, rins e baço após o tratamento com SVHV. Os resultados demonstraram que SVHV não apresenta citotoxicidade *in vitro*, mas é capaz de reduzir o tumor Melanoma B-16 implantado em camundongos em 75,8% na dose de 25mg/kg/dia, quando administrado por via intraperitoneal ( $p < 0,05$ ), enquanto não houve inibição por via oral. As análises do fígado e rins revelaram que houve toxicidade no rim, com áreas de hemorragia glomerular e intersticial nos camundongos tratados com SVHV. Essas alterações são, entretanto, consideradas reversíveis. As análises bioquímicas, revelaram um aumento nos níveis séricos da alanina aminotransferase (ALT) nos grupos com tumor ou tratado com SVHV por via oral e os testes hematológicos revelaram um aumento na porcentagem de neutrófilos nestes grupos, enquanto que a porcentagem de monócitos foi reduzida nos grupos com tumor e nos tratados com SVHV por via intraperitoneal. Também foi demonstrado que SVHV age como agente imunoestimulante e imunomodulador, ativando macrófagos *in vitro*, assim como sendo capaz de causar inflamação através do teste do edema de pata e induzir a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal. Conclui-se então que SVHV apresenta atividade antitumoral e que esta atividade está relacionada com suas propriedades imunoestimulantes.

**Palavras-chave:** *Sargassum vulgare*, alginato, antitumoral, imunomodulatório, toxicidade.

## ABSTRACT

### ANTITUMOR AND INFLAMMATORY PROPERTIES OF AN ALGINATE ISOLATED FROM THE SEAWEED *Sargassum vulgare* C. AGARDH.

Kézia Oliveira Abrantes de Lacerda Lins. Advisor: Letícia Veras Costa Lotufo. Doctorate thesis. Postgraduate Program on Pharmacology. Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceara, UFC, 2012.

Cancer is a disease that occurs in a larger number of people each year. The therapies used to treat it are still not satisfactory. Natural products have been studied to select new compounds capable of reducing tumours and with fewer side effects. The alginate isolated from the seaweed *S. vulgare* (SVHV) was investigated for its antitumor and immunostimulating properties and also for the toxicological aspects related to SVHV treatment. The SVHV did not show any significant *in vitro* cytotoxic effect, but showed a strong *in vivo* antitumor effect. The inhibition rates of Melanoma B-16 tumor development was 75,8% at the dose of 25 mg/kg/day when treated by intraperitoneal route ( $p < 0,05$ ). The histopathological analysis of liver and kidney showed that the kidneys were affected by SVHV-treatment, presenting some hemorrhagic areas. The enzymatic activity of alanine aminotransferase, was augmented in mice with tumor or treated with SVHV by oral route. In hematological analyses, these groups showed a higher percentage of neutrophils, while the group with tumor or treated with SVHV by intraperitoneal route showed a reduction in the percentage of monocytes. It was also demonstrated that SVHV acts as an immunomodulatory agent, stimulating macrophages *in vitro*, causing paw edema in rats and neutrophil migration to the intraperitoneal cavity. In conclusion, SVHV has some interesting antitumour activity that is associated with its immunostimulanting properties.

**Keywords:** *Sargassum vulgare*, alginate, antitumor activity, immunomodulatory activity, toxicity.

# *Introdução*

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Câncer

O câncer é uma doença responsável pela morte de mais de sete milhões de pessoas por ano em todo o mundo. O seu impacto global mais que dobrou em 30 anos. O contínuo crescimento populacional, bem como seu envelhecimento, afetará de forma significativa o impacto do câncer no mundo. Esse impacto recairá principalmente sobre os países de médio e baixo desenvolvimento. No Brasil, estima-se que no ano de 2012 ocorrerão 518.510 novos casos de câncer, sendo os mais incidentes, com exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, os cânceres de próstata e de pulmão, no sexo masculino, e os cânceres de mama e de colo do útero, no sexo feminino (INCA, 2012).

Existem mais de 100 tipos diferentes de câncer. Observações em modelos de cânceres animais e humanos concluem que o desenvolvimento de tumores acontece através de um processo análogo à evolução Darwinista, onde há uma sucessão de mudanças genéticas, cada uma permitindo algum tipo de vantagem no crescimento celular, levando à conversão de células humanas normais a células cancerígenas (FOULDS, 1954; HANAHAN & WEINBERG, 2011; NOWELL, 1976).

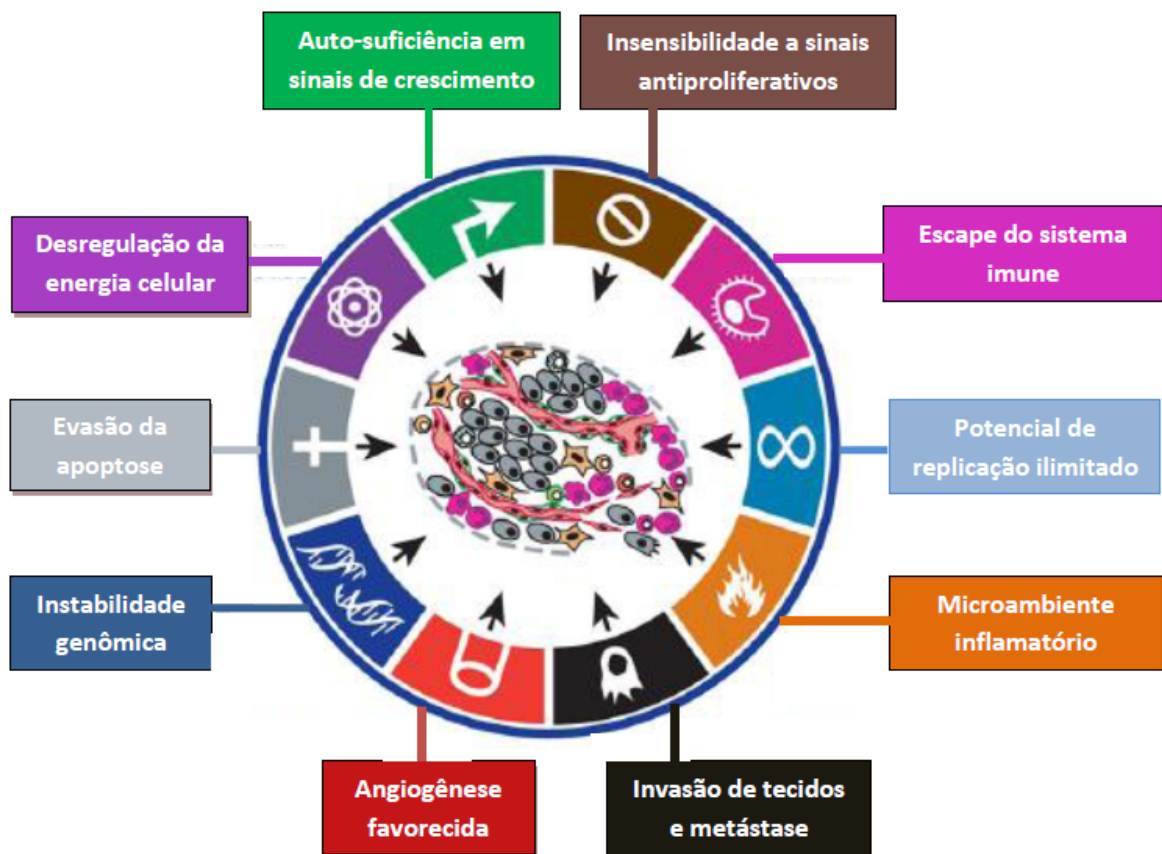
De acordo com Hanahan & Weinberg (2011), a maioria, ou talvez todos os tipos de tumores malignos, tenham adquirido um conjunto de alterações na fisiologia da célula durante o seu desenvolvimento, as quais coletivamente irão promover um crescimento de forma maligna (Figura 1). Uma das capacidades adquiridas pelas células cancerígenas é a auto-suficiência de sinais de crescimento. Estes são requeridos durante o processo de mitose pelas células normais na passagem de um estado quiescente para um estado proliferativo. As células tumorais são capazes de gerar seus próprios sinais de crescimento, diminuindo a dependência do microambiente ao redor. Para isso, agem a nível de receptores dos sinais de crescimento extracelulares, dos transdutores transcelulares e dos efetores que traduzem os sinais dentro da célula (FEDI *et al.*, 1997).

Para manter a homeostase nos tecidos, vários sinais antiproliferativos são usados a fim de forçar as células normais a passarem de um estado proliferativo para um estado quiescente até que haja uma mudança nos sinais extracelulares. Estas podem ainda serem induzidas a

entrar em um estado pós-mitótico, onde seu potencial proliferativo será permanentemente perdido. Para prosperarem, as células cancerígenas precisam tornar-se insensíveis a esses sinais. Isso ocorre, principalmente, através de uma ação, a nível molecular, no circuito de sinalização da proteína retinoblastoma (pRb). Quando em seu estado hipofosforilado, a pRb impede a proliferação ao seqüestrar e alterar funções do fator de transcrição E2F. Este controla a expressão de genes essenciais para a progressão da fase G1, onde há a síntese de proteínas, para a fase S, onde ocorre a replicação das moléculas de DNA (WEINBERG, 1995).

O mecanismo que a célula usa para impedir que erros sejam propagados durante a replicação celular é a morte celular programada ou, apoptose. Uma vez iniciada, após uma variedade de sinais de estresse intracelular, sinais de sobrevivência, assim como sinais de morte são gerados e convergem para um processo controlado pela mitocôndria. Quando os sinais de morte prevalecem, ocorre uma permeabilização da membrana externa da mitocôndria, liberando proteínas internas para o citosol celular. Estas proteínas ativam a cascata das caspases ou ainda induzem a fragmentação do DNA e quebra das proteínas do citoesqueleto (GALLUZZI *et al.*, 2011). Em mais de 50% dos cânceres em humanos, observa-se que há uma mutação no gene supressor *p53*, causando uma inativação do seu produto, a proteína p53, um dos componentes principais na detecção de danos ao DNA e conseqüente indução da cascata apoptótica (HARRIS, 1996).

Mesmo com todas essas características em relação aos sinais entre as células de um mesmo tecido, existem ainda os controles da própria célula, que são intrínsecos a ela, que limitam sua multiplicação. Isso acontece devido aos telômeros, porções de DNA no final dos cromossomos com seqüências de pares de bases repetidos. Estes vão diminuindo a cada ciclo celular, em função da incapacidade da enzima DNA polimerase de replicar completamente o final 3' do DNA, deixando-o, assim, desprotegido, e causando a morte da célula (COUNTER *et al.*, 1992). A grande maioria das células malignas adquire um potencial replicativo ilimitado, pois consegue manter os telômeros, através da supra-regulação da expressão da enzima telomerase, a qual adiciona nucleotídios no final do DNA (BRYAN & CECH, 1999).



**Figura 1** - Ilustração esquemática das capacidades adquiridas do câncer (modificado de HANAHAN & WEINBERG, 2011).

Assim como todas as outras células do corpo humano, as células cancerígenas necessitam do suprimento de oxigênio e nutrientes oferecidos pelos capilares ao seu redor. Inicialmente, elas não possuem a habilidade de induzir angiogênese, o que seria um fator limitante da sua expansão. Assim, para que haja um aumento de tamanho, as neoplasias incipientes precisam adquirir também esta capacidade (BOUCK *et al.*, 1996; FOLKMAN, 1997; HANAHAN & FOLKMAN, 1996). Para isso os tumores parecem mudar o equilíbrio que há entre os indutores e os inibidores da angiogênese, aumentando a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e do fator de crescimento do fibroblasto (FGF), ou ainda diminuindo a expressão dos inibidores endógenos como a trombospondina-1 ou o interferon- $\beta$  (SINGH *et al.*, 1995; VOLPERT *et al.*, 1997).

Durante o desenvolvimento da maioria dos cânceres humanos, algumas células saem do tumor inicial e invadem tecidos adjacentes também indo para locais distantes no corpo, onde não há limitação de espaço e nutrientes, para tentar formar novas colônias. Este processo é conhecido como metástase e é responsável por elevadas taxas de morbidade em pacientes com câncer (SHEVDE & WELCHE, 2003). Para aquisição desta habilidade é essencial a ativação de proteases extracelulares e alteração da especificidade de ligação de caderinas, de moléculas de adesão intercelular (CAMs) e de integrinas (APLIN *et al.*, 1998). Entretanto, os mecanismos moleculares que regulam essas alterações ainda estão pouco estabelecidos.

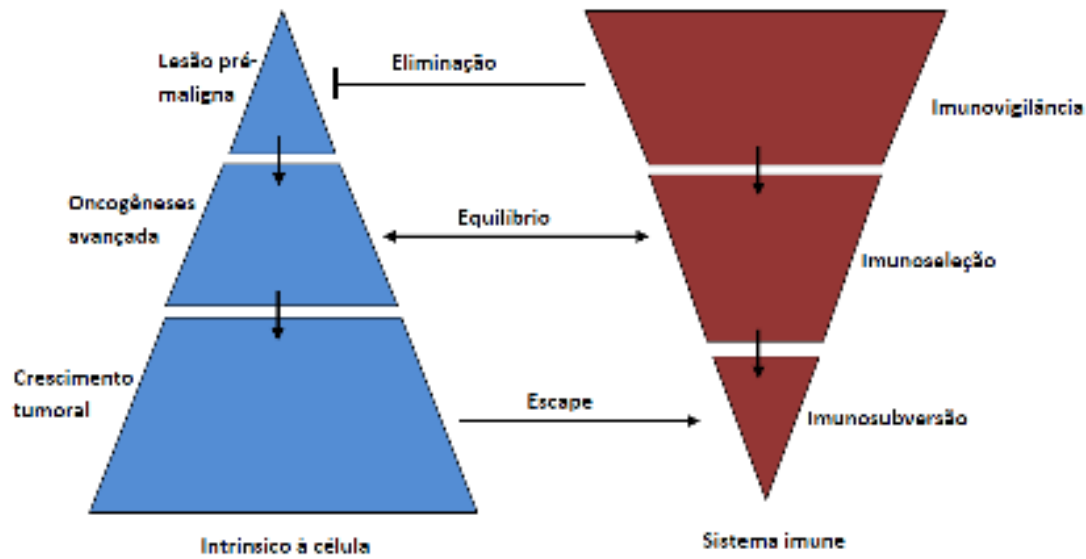
Colotta *et al.* (2009), discutiram a importância da inflamação no microambiente tumoral. Segundo ele, podem-se esquematizar duas vias onde a inflamação está relacionada ao câncer. Uma via intrínseca, onde eventos genéticos que causam a neoplasia podem iniciar a expressão de substâncias inflamatórias, construindo assim um microambiente inflamatório; e uma via extrínseca, onde condições inflamatórias podem facilitar o aparecimento do câncer. Uma inflamação crônica pode aumentar o risco ou a progressão do câncer, como no caso de infecções (*Helicobacter pylori* no câncer gástrico; *Papilloma vírus*, no carcinoma cervical), doenças auto-imunes (inflamação do intestino, no câncer de cólon) e inflamações de origem incerta (prostatite, no câncer de próstata). Além disso, uma forma em que a inflamação poderia contribuir para a iniciação e progressão tumoral é através da desestabilização genética das células cancerígenas.

Não se pode deixar de pensar também em todas as complexas interações que ocorrem entre um tumor em desenvolvimento e o sistema imune do hospedeiro. Inicialmente, acreditava-se que o sistema inato do hospedeiro possuía uma função de proteção nos estágios iniciais das transformações celulares que levam ao câncer. Isso era denominado de

imunovigilância. Entretanto, Dunn *et al.* (2004) propuseram que tanto o sistema inato quanto o adaptativo participam deste processo, servindo não só para proteger o hospedeiro de um desenvolvimento tumoral, mas também para esculpir, ou editar a imunogenicidade de tumores que eventualmente sejam formados (imunoeedição do câncer). Este processo possui três fases: Eliminação, Equilíbrio e Escape. Na eliminação, a imunovigilância acontece com sucesso, conseguindo erradicar o desenvolvimento do tumor, sem progredir para as outras fases da imunoeedição. Na fase do equilíbrio, o sistema imune do hospedeiro entra em equilíbrio dinâmico com as células tumorais que tenham sobrevivido à fase de eliminação, tendo estas células sofrido uma pressão de seleção pelos linfócitos e IFN- $\gamma$ . Esta é provavelmente a fase mais longa, e pode durar vários anos. Por último, o escape acontece quando as células selecionadas na fase de equilíbrio crescem em um ambiente imunológico intacto. Isto ocorre devido a mudanças genéticas nas células tumorais, que se tornam não-imunogênicas (imunossupressão), permitindo a expansão do tumor (Figura 2).

Apesar de acreditar-se que todos os tipos de cânceres possuam essas características principais, a ordem cronológica em que elas são adquiridas pode variar significativamente entre os diversos tipos de cânceres. O conhecimento das lesões sofridas pelas células durante o processo de transformação em células malignas permitirá uma análise a nível genético e bioquímico de cada câncer, além da sua relação com o sistema imune do paciente, permitirá também estudos para que surjam novos alvos terapêuticos que, combinados, levarão a melhores resultados.





**Figura 2** - Ilustração esquemática da relação entre os aspectos intrínsecos às células e o sistema imune na progressão tumoral (modificado de ZITVOGEL *et al.*, 2006).

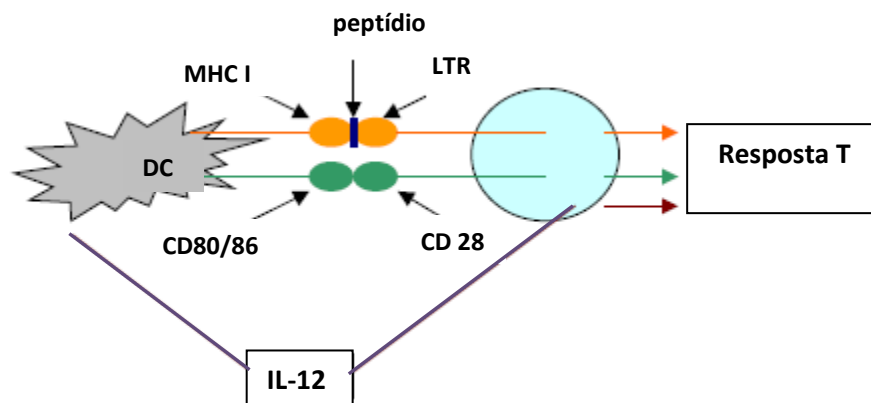
Os tratamentos tradicionais que são utilizados atualmente, como a cirurgia, hormônios, radiação e quimioterapia nem sempre alcançam resultados satisfatórios. Uma nova forma de tratamento que vem sendo amplamente estudada é a imunoterapia, que explora a própria imunidade antitumoral do corpo (SALGALLER, 2000).

Durante o desenvolvimento de tumores é produzida constantemente uma grande quantidade de antígenos, que podem ser detectados pelo sistema imune. Em seguida, o sistema imune inicia uma resposta para eliminar as células transformadas e inibir o desenvolvimento do tumor (BURNET, 1970; DUNN *et al.*, 2002). A resposta produzida pelo sistema imune pode ser do tipo inata ou adquirida. A imunidade adquirida tem a vantagem de apresentar especificidade por antígenos e gerar uma memória imunológica. Ela pode ser dividida em humoral ou mediada por célula. Enquanto a resposta humoral é direcionada contra antígenos na sua forma nativa, normalmente extracelulares, a resposta mediada por célula elimina patógenos intracelulares e células modificadas (QUATAN *et al.*, 2004).

O reconhecimento de uma célula tumoral pelo sistema imune se dá através da ligação entre os receptores dos linfócitos T (LTR) e pequenos peptídios que estão na superfície das moléculas do complexo de histocompatibilidade (MHC). No geral, as moléculas de MHC de

classe I apresentam peptídios antigênicos para as células T citotóxicas ( $CD8^+$ ), enquanto as células T auxiliares ( $CD4^+$ ) reconhecem os peptídios apresentados pelas moléculas MHC de classe II. Para que ocorra a ativação das células T, é necessário que se tenha uma ligação do seu receptor com os peptídios das moléculas MHC presentes nas células dendríticas (DC), que são células apresentadoras de antígenos derivadas da medula óssea. É necessário ainda uma co-estimulação através da interação entre CD80 e CD86 das células dendríticas e do CD28 da célula T, tudo isso na presença da IL-12 (Figura 3) (HEATH & CARBONE, 1999; 2001).

Com o conhecimento que se tem hoje sobre antígenos associados a tumores, estão sendo estudadas diferentes vacinas como uma forma de imunoterapia. Estudos sobre o potencial de vacinas para prevenção do câncer têm demonstrado que um sistema imune alerta pode bloquear eficientemente os processos carcinogênicos causados pela superexpressão de oncogenes específicos (IINUMA *et al.*, 2004; LOLLINI *et al.*, 2006; XIA *et al.*, 2003). Antígenos que estão diretamente envolvidos no desenvolvimento de processos neoplásicos são ideais para esse tipo de vacina, já que são essenciais para o crescimento do tumor e sua infra-regulação é improvável de ocorrer. Esses antígenos podem ser administrados nas mais diferentes formas: DNA, RNA, proteínas, peptídios, vírus ou lisado celular.



**Figura 3** - Ilustração esquemática da ativação da célula T (modificado de QUATAN *et al.*, 2004). DC- célula dendrítica; IL-12- Interleucina-12; LTR- receptores de linfócitos T; MHC I- moléculas do complexo de principal do tipo I. CD- receptores.

Estudos feitos com o antígeno tumoral da subunidade da enzima telomerase transcriptase reversa humana (hTERT), presente em quase todas as células tumorais e que aumenta durante o progresso do tumor de carcinoma *in situ* para tumor primário e para tumores metastáticos, mostram que eles são apresentados por moléculas MHC I para os linfócitos T (MINEV *et al.*, 2000; VONDERHEIDE *et al.*, 1999). Estes linfócitos *in vitro* são capazes de matar uma variedade de células tumorais hTERT-positivas (VONDERHEIDE *et al.*, 1999).

Microorganismos são a causa de 10-20% de todos os tumores humanos (*World Cancer Report*, 2003). Vacinas que previnam ou controlem infecções associadas a vírus envolvidos no desenvolvimento de câncer são consideradas uma importante estratégia (LOLLINI *et al.*, 2006). Já estão disponíveis duas vacinas para esses casos. A primeira é contra o vírus da Hepatite B, que reduz as chances de desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (KAO & CHEN, 2002), e a outra é para o Papiloma Vírus Humano (HPV) que protege contra o câncer de colo do útero (MAO *et al.*, 2006).

De acordo com Rescigno *et al.* (2007) as vacinas terapêuticas que estão direcionadas ao tratamento contra tumores já estabelecidos, podem ser distinguidas como imunoterapia passiva ou ativa. A imunoterapia passiva é baseada na transferência de células imunes ativadas *ex-vivo*, imunomoduladores (incluindo citocinas) ou anticorpos tumor-específicos, enquanto a imunoterapia ativa consiste na ativação do sistema imune do próprio paciente. Isso se dá através da administração de uma vacina terapêutica, a exemplo do uso de células dendríticas como adjuvantes.

A terapia com anticorpos monoclonais tem trazido bastante benefício à imunoterapia. Alguns deles podem agir diretamente bloqueando vias de transdução de sinais, como por exemplo, ao serem direcionados a receptores de sinais de crescimento, ou indiretamente via ativação de células *natural killer*. Atualmente estão sendo utilizados anticorpos direcionados ao receptor HER2/neu para tratamento de câncer de mama (NAHTA & ESTEVA, 2006; GIANNI *et al.*, 2010), anticorpos para moléculas CD20 no tratamento de linfoma não-Hodgkin (MALONEY, 2005) e anticorpos direcionados ao fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) ou ao receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) para o tratamento de câncer coloretal (GIUSTI *et al.*, 2007; PANARES & GARCIA, 2007).

A fim de otimizar a imunoterapia, estão sendo utilizadas substâncias que ajudam a acionar e manter a resposta a agentes específicos. Essas substâncias são conhecidas como

imunoadjuvantes, e foram originariamente descritas como substâncias usadas em combinação com um antígeno específico e que produz mais imunidade do que o antígeno isolado (RAMON *et al.*, 1952). O objetivo do uso de adjuvantes é melhorar a resposta imune para os antígenos presentes nas vacinas. Eles podem aumentar a imunogenicidade de antígenos fracos, elevar a velocidade e duração da resposta imune, e modular a atividade de anticorpos. Podem ainda estimular células T CD4<sup>+</sup>, promover indução da imunidade em mucosas e aumentar a resposta imune em indivíduos imaturos imunologicamente (SINGH & O'HAGAN, 1999).

Alguns adjuvantes comumente usados são o adjuvante de Freund (em testes pré-clínicos), um óleo mineral que contém micobactéria. Também a vacina contra a tuberculose, Bacillus-Calmette-Guérin (BCG), tem uma ótima atividade adjuvante e suscita tanto a resposta humoral como a mediada por célula. Por causa da sua segurança, tem sido amplamente utilizada como adjuvante em testes clínicos (ALEXANDROFF *et al.*, 1999; COPPIN *et al.*, 2005; UDAGAWA *et al.*, 2006). A hemocianina, uma proteína derivada de moluscos, tem sido usada como adjuvante imunológico e como antígeno marcador substituto na avaliação de respostas mediadas por célula a vacinas (MOLTO *et al.*, 1991; SHIMIZU *et al.*, 2001). Também as saponinas, glicosídeos triterpenóides isolados da planta *Quillaja saponaria*, como a QS21 possuem um forte poder adjuvante para indução de células T citotóxicas, citocinas Th1, como IL-2 e INF- $\gamma$ , e anticorpos IgG2a. Além disso, DNA bacterino tem efeitos imunoestimulatórios em células imunes *in vitro*, devido à presença de dinucleotídeos CG não metilados. Isso induz as células do sistema imune, como macrófagos e células dendríticas, a aumentar a expressão de moléculas MHC II e de moléculas co-estimulatórias, além de promover a transcrição de mRNA de citocinas e secretar citocinas inflamatórias (DAVIS *et al.*, 1998; JAKOB *et al.*, 1998).

Outra abordagem da imunoterapia é o uso de células dendríticas para apresentar antígenos associados a tumores aos linfócitos T. Células dendríticas podem ser adicionadas aos antígenos *ex vivo* e depois serem reincorporadas ao paciente, ou podem ser usadas para ativar linfócitos *ex-vivo* que serão administrados ao paciente posteriormente (FONG & ENGLEMAN, 2000; SCHULER *et al.*, 2003). Também estão sendo testadas formas de levar os antígenos até as células dendríticas *in vivo*, sem necessitar de todo o trabalho e custo das manipulações *ex vivo*, através da recombinação com nanopartículas (REDDY *et al.*, 2006; UTO *et al.*, 2007).

Estudos clínicos em pacientes com linfoma e pacientes com câncer de próstata demonstraram que o uso de células dendríticas como adjuvantes pode levar a resultados promissores na imunoterapia do câncer (FONG *et al.*, 2001; TIMMERMAN *et al.*, 2002). Porém, à medida que os estudos foram avançando percebeu-se que, quando os antígenos eram direcionados especificamente para células dendríticas imaturas *in vivo*, a apresentação dos antígenos para as células T CD8<sup>+</sup> produzia uma tolerância periférica profunda (STEINMAN *et al.*, 2002). A partir desses estudos, concluiu-se que uma ativação eficiente das células T CD8<sup>+</sup> *in vivo* necessita da captação do antígeno pela célula dendrítica, seguida de uma apresentação ótima dos peptídeos derivados do antígeno por moléculas de MHC classe I (apresentação cruzada), pelas células dendríticas já maturadas.

De fato, vários grupos demonstraram que, quando acoplado ao antígeno, diversos vetores não-replicativos que se ligam preferencialmente à moléculas expressas nas células dendríticas (como por exemplo, DEC 205 ou CD11b), são capazes de induzirem respostas T CD8<sup>+</sup> em camundongos (BONIFAZ *et al.*, 2004; VAN BROCKHOVEN *et al.*, 2004; SCHIAVO *et al.*, 2006; MORON *et al.*, 2004). Essas respostas estão, algumas vezes, associadas também à uma resposta das células T CD4<sup>+</sup> Th1, assim como à imunidade humoral (MASCARELL *et al.*, 2005; TACKEN *et al.*, 2005; BOSCARDIN *et al.*, 2006; TRUMPFHELLER *et al.*, 2006).

A administração de células dendríticas associadas com citocinas, prostaglandinas e ligantes do receptor *Toll-like* (TLR), são capazes de aumentar a capacidade imunostimulatória dessas células (WECK *et al.*, 2007). Diversos compostos naturais ou sintéticos podem agir como ligantes para os receptores *Toll-like*, como lipopolissacarídeos, RNAs e DNAs bacterianos. O imiquimode, atualmente utilizado para o tratamento de carcinomas, é possivelmente um imunomodulador e funciona como um ligante de TLR, aumentando a imunogenicidade e sobrevivência das células dendríticas (PRINS *et al.*, 2006). Na maioria dos casos, a adição de adjuvantes que promovam a maturação das células dendríticas foi necessária para a observação de respostas imunológicas, apesar de que alguns vetores possuem a habilidade de tanto acionar as células dendríticas como de maturá-las (JEANNIN *et al.*, 2000; BINDER *et al.*, 2005).

Atualmente, apenas dois adjuvantes são aprovados para o uso em vacinas administradas aos humanos, os sais de alumínio e MF59 (KENNEY *et al.*, 2003). Esses adjuvantes estimulam primariamente as respostas imunes humorais (PHASHINE *et al.*, 2005). Entretanto, estudos pré-clínicos sugerem que vacinas eficientes contra patógenos

intracelulares e contra o câncer devem ativar tanto as respostas humorais quanto as respostas mediadas por células (AUTRAN *et al.*, 2004; CURCIO *et al.*, 2003; KNUTSON *et al.*, 2005; LETVIN *et al.*, 2002; PARDOLL, 2002). A ineficiência desses adjuvantes de estimularem respostas mediadas por células impulsionaram o estudo de novos adjuvantes.

A  $\alpha$ -galactosilceramida, um glicosfingolípido, também conhecido como KRN7000, foi originalmente extraído de esponjas marinhas com base nas suas propriedades antitumorais (KOBAYASHI *et al.*, 1995). Diferente de outros adjuvantes microbiais, os quais agem nos TLRs, a  $\alpha$ -galactosilceramida funciona como um antígeno apresentado pelo CD1d às células TNK expressando um TCR conservado semi-invariante (KAWANO *et al.*, 1997). A ativação das células TNK pela  $\alpha$ -galactosilceramida resulta em uma rápida secreção de citocinas, seguida de estimulação de células NK e maturação de células dendríticas (CARNAUD *et al.*, 1999; HERMANS *et al.*, 2003; FUJII *et al.*, 2003). Estudos demonstraram que a co-administração de  $\alpha$ -galactosilceramida com diversos antígenos aumenta o número de células T CD8+ específicas ao antígeno (GONZALEZ-ASEGUINOLAZA *et al.*, 2002; KO *et al.*, 2005; SILK *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2005).

## 1.2. Polissacarídeos como Modificadores da Resposta Biológica

Os carboidratos são biomoléculas encontradas em toda a Terra. Certos carboidratos, como o açúcar comum e o amido, são a base da alimentação humana na maioria das partes do mundo e a oxidação de carboidratos é a principal via metabólica que libera energia em muitas células não-fotossintetizantes. São considerados carboidratos poliidroxi aldeídos e poliidroxicetonas ou substâncias que liberam esses compostos por hidrólise. Polissacarídeos consistem de longas cadeias contendo centenas ou milhares de unidades de monossacarídeos (açúcar simples), formado por uma unidade de poliidroxi aldeído ou poliidroxicetona (LEHNINGER *et al.*, 2002). Alguns deles podem conter também nitrogênio, fósforo ou enxofre. Quando comparado com outras macromoléculas como proteínas e ácidos nucleicos, os polissacarídeos oferecem a maior capacidade de carregar informações biológicas, devido ao seu grande potencial de variabilidade estrutural, podendo se conectar em vários pontos e formar diferentes estruturas lineares ou ramificadas (SHARON & LIS, 1993).

Modificadores da resposta biológica são substâncias que têm a capacidade de melhorar o sistema imune. Estas podem ser citocinas que são produzidas de forma endógena no corpo por células imunes ou derivados de outros organismos. Estes modificadores da resposta

biológica exógenos podem ser ácidos nucleicos, lipídios, proteínas ou polissacarídeos. Dentre eles, os polissacarídeos são os que estão presentes em maior abundância na natureza. Sua origem pode ser bacteriana, fúngica, ou vegetal. A nível celular, sua fonte pode ser a partir de reservas de polissacarídeos do citoplasma, ou polissacarídeos estruturais presentes nas membranas ou paredes celulares dos organismos. Os métodos de extração e purificação estão diretamente relacionados com a forma como as moléculas de polissacarídeos se encontram arranjadas (LEUNG *et al.*, 2006).

As propriedades terapêuticas que foram encontradas nos diversos polissacarídeos modificadores da resposta biológica incluem atividade antiviral (JUNG *et al.*, 2004; NISHINO *et al.*, 1994; SASAKI *et al.*, 2001), antibacteriana (LI *et al.*, 2004; RUIZ-BRAVO *et al.*, 2001), antifúngica (SAKURAI *et al.*, 1995; STUART *et al.*, 1997), antiparasitária (HRCKOVA & VELEBNY, 2001; YUN *et al.*, 1997) e antitumoral (CHEN *et al.*, 2010; HAYASHI *et al.*, 2000; LINS *et al.*, 2009; NISHINO *et al.*, 1994; OHNISHI *et al.*, 1994; SILVA *et al.*, 2012; YALIN *et al.*, 2005).

A possibilidade de utilizar esses polissacarídeos como agentes antitumorais tem atraído muita atenção nas áreas da bioquímica e medicina. Isso é consequência de uma profunda insatisfação com os atuais tratamentos disponíveis para o câncer, como a quimioterapia e a radioterapia. Muitos dos compostos que foram descobertos como agentes citotóxicos contra células cancerígenas também apresentam toxicidade para as células normais do hospedeiro. Além disso, muitos fármacos com potencial anticâncer também apresentam consideráveis efeitos colaterais, sendo assim pouco utilizadas na clínica. Atualmente, a descoberta e identificação de novas substâncias que sejam realmente efetivas contra tumores malignos tem se tornado uma importante meta nas pesquisas biomédicas. O aumento ou potencialização dos mecanismos de defesa do hospedeiro surge como uma possível alternativa para inibir o crescimento tumoral sem prejudicar o hospedeiro (OOI & LIU, 2000). Isso é muito importante, já que a formação e desenvolvimento do tumor estão relacionados com o estado imune do hospedeiro. A função imune decresce progressivamente com o crescimento persistente do tumor, ficando clara a imunodeficiência de pacientes com tumores no seu estágio final (HADDEN, 2003).

Nas últimas décadas, vários polissacarídeos foram isolados de fungos, algas, líquens e plantas superiores, e têm atraído elevada atenção devido ao seu amplo espectro de propriedades terapêuticas e uma toxicidade relativamente baixa (PAULSEN, 2001; TZIANABOS, 2000; WASSER, 2002). Mais de 35 espécies de plantas pertencentes a 22

famílias diferentes apresentam atividade antitumoral e imunostimulantes, como *Panax ginseng* (SONG *et al.*, 2002), *Morinda citrifolia* (HIRAZUMI & FARUSAWA, 1999), *Pinus parviflora* (SAKAGAMI *et al.*, 1987), *Glycine max* (LIAO *et al.*, 2001), *Curcuma zedoaria* (KIM *et al.*, 2000), *Angelica sinensis* (CHOY *et al.*, 1994), *Aloe vera* L. var. *chinensis* (LIU *et al.*, 2006), entre outras.

Polissacarídeos contendo arabinogalactanos extraídos de *Juniperus scopolorum* apresentam potentes propriedades imunostimulatórias em macrófagos humanos, demonstrado pela expressão de iNOS, produção de NO e aumento da produção tanto de citocinas inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-12, e TNF- $\alpha$ ) como anti-inflamatórias (IL-10) (SCHEPETKIN *et al.*, 2005). Polissacarídeos isolados também de pólen de plantas têm apresentado atividade antitumoral e imunostimulante (GAO *et al.*, 2003; LOTHAR *et al.*, 2005). Yang *et al.* (2007) isolaram um polissacarídeo do pólen de *Brassica napus* L. que apresentou atividade antitumoral *in vivo* contra sarcoma-180 e melanoma B-16, através da imunomodulação, ação leucogênica e antianêmica. Liu *et al.*, 2007, baseado na medicina tradicional chinesa, que utiliza ouriços na alimentação como forma de melhorar o sistema imune, verificaram a presença de atividade antitumoral de polissacarídeos isolados dos ovos de *Strongylocentrotus nudus* em camundongos implantados com sarcoma-180.

A maioria dos estudos está ainda em fase pré-clínica, utilizando animais. Estudos clínicos têm sido realizados principalmente na China e Japão, onde alguns polissacarídeos já estão sendo comercializados. A lentinana, produzida pelo fungo *Lentinus edodes*, é um  $\beta$ -D-glucano puro, inicialmente estudado por Chihara *et al.* (1970), que demonstraram seu elevado potencial antitumoral relacionado aos outros polissacarídeos de fungos. Ela é capaz de elevar os níveis de expressão gênica da IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , citocinas que agem em diversos alvos, como células B e T e monócitos, além de induzir a produção de outras citocinas como o TNF- $\alpha$  (LIU *et al.*, 1999). A lentinana obteve sucesso na sobrevida de pacientes com câncer, especialmente os portadores de câncer de estômago e colorretal (FURUE & KITO, 1981; KIMURA *et al.*, 2003; TAGUCHI, 1985). Em um estudo aleatório em pacientes tratados com um quimioterápico (tegafur) isolado, ou uma combinação do quimioterápico com o polissacarídeo lentinana, observou-se que houve um aumento significativo nas taxas de sobrevida no grupo de pacientes tratados com a combinação do quimioterápico e a lentinana: 19,5% sobreviveram mais de um ano, 10,4% mais de dois anos e 6,5% sobreviveram mais de três anos. Foram observados apenas raros efeitos adversos. A lentinana, quando usada em conjunto com agentes quimioterápicos, tem a capacidade de reduzir drasticamente os efeitos



indesejáveis da quimioterapia, como náuseas, dores, perda de cabelo e imunodepressão (DABA & EZERONYE, 2003).

A schizophyllana é também um  $\beta$ -glucano, produzida pelo fungo *Schizophyllum commune* e tem demonstrado ação citostática em tumor sólido Sarcoma 180, quando injetada via intraperitoneal ou intravenosa. Tem-se observado um aumento da sobrevida em pacientes com câncer na cabeça e no pescoço (KIMURA *et al.*, 1994). Em testes clínicos envolvendo 312 pacientes tratados com cirurgia, radioterapia, quimioterapia (Fluorouracil) e schizophyllana em várias combinações, foi verificado que pacientes tratados com o polissacarídeo apresentaram uma melhor taxa de sobrevida do que os pacientes que não receberam o polissacarídeo (MIYAZAKI *et al.*, 1995).

Um polissacarídeo ligado a proteínas (PSK) isolado a partir do fungo *Coriolus versicolor* no Japão exibe um marcante efeito antitumoral contra tumores alo gênicos como Sarcoma 180 e carcinoma de Ehrlich em animais experimentais, quando administrado tanto por via oral ou intraperitoneal (KOBAYASHI *et al.*, 1993). Ele age estimulando a ativação de células T e induzindo a expressão gênica de algumas citocinas como IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-8 e IL-6 *in vitro* e *in vivo* (KATO *et al.*, 1995). O PSK, ao ser injetado durante 14 dias em pacientes com câncer de bexiga na massa de um tumor gástrico anteriormente à cirurgia, torna as células T ao redor do local capazes de se infiltrar no tumor e desenvolver uma elevada capacidade citotóxica contra ele (MIZUTANI & YOSHIDA, 1991). Em outro estudo, a longo termo, o PSK aumentou a sobrevivência de pacientes com câncer de cólon (ITO *et al.*, 2004).

Na China, um polissacarídeo ligado a peptídeos (PSP), similar ao PSK, também isolado de *Coriolus versicolor*, apresentou semelhante atividade antitumoral, inibindo tumores de Ehrlich, leucemia PS33 e leucemia monocítica (YANG *et al.*, 1992). Ele é capaz de agir seletivamente em células leucêmicas HL-60 *in vitro*, parando o ciclo celular na fase G1 e induzindo apoptose sem, entretanto, causar nenhum dano aos leucócitos (HSIEH *et al.*, 2002). Ele também age como um modificador da resposta biológica, estimulando a ativação de células T e induzindo a produção de IFN- $\gamma$  e IL-2 (YANG & YUN, 1999).

Outros polissacarídeos  $\beta$ -glucanos com propriedades antitumorais foram isolados dos fungos *Grifola frondosa* (OKAZAKI *et al.*, 1995), *Isaria farinosa* (JIANG *et al.*, 2006), *Pleurotus tuberregium* (TAO *et al.*, 2006) e *Sclerotinia sclerotiorum* (BORCHERS *et al.*, 1999), assim como dos líquens *Cetraria islandica* (INGOLFSDOTTIR *et al.*, 1994) e *Thamnolia subuliformis* (OLAFSDOTTIR *et al.*, 1999). Também polissacarídeos  $\alpha$ -glucanos

sulfatados isolados de *Lentinus edodes* (ZHANG & CHEUNG, 2002) e de *Poria cocos* (HUANG *et al.*, 2006) também têm sido estudados por suas atividade antitumoral.

Os estudos clínicos têm demonstrado que os polissacarídeos modificadores da resposta biológica são capazes de melhorar a qualidade de vida e prolongar a sobrevida dos pacientes. Os parâmetros normalmente utilizados para avaliar a qualidade de vida são o apetite, sono, náuseas, vômitos, dores abdominais ou diarreias (KIMURA *et al.*, 2003; NAKANO *et al.*, 1999). São utilizados ainda placebos aleatórios para o controle e as vias de administração do polissacarídeo são a via intravenosa, ou a via oral. Nesses estudos não foram observados nenhum efeito adverso causado pelos polissacarídeos, mesmo na maior dose utilizada (OHWADA *et al.*, 2003).

Essas respostas biológicas promovidas pelos polissacarídeos estão relacionadas com o padrão de expressão e os eventos moleculares que são acionados pelos seus respectivos receptores e proteínas às quais eles se ligam. Esses receptores e proteínas são pertencentes ao sistema imune inato. Os polissacarídeos se ligam aos receptores de reconhecimento de padrão (PRRs), como os receptores *Toll-like* (TLRs), receptores *scavenger* (SRs), receptores  $\beta$ -glucanos, receptor do complemento do tipo 3 (CR3), receptor de manose e proteínas do plasma das vias do complemento.

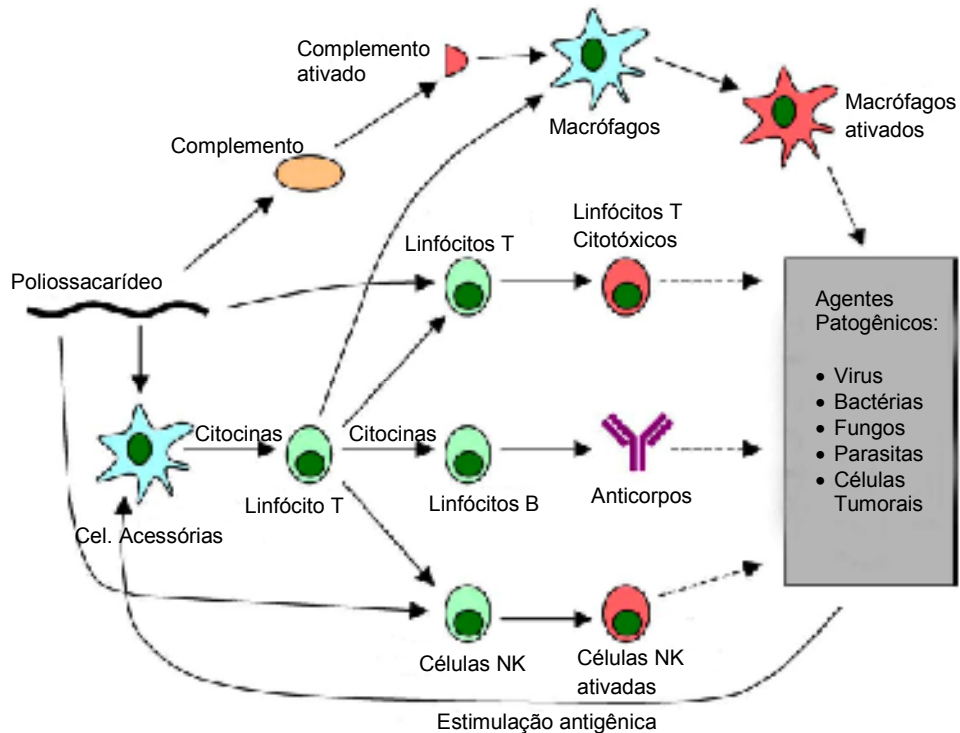
TLRs são expressos nas células mielóides (monócitos, macrófagos e células dendríticas), além das células epiteliais, mastócitos e neutrófilos (IWASAKI & MEDZHITOV, 2004). Dos onze tipos de TLRs identificados, sabe-se que o TLR-2 e TLR-4 reconhecem polissacarídeos modificadores da resposta biológica (BROWN *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2004). SRs são expressos em macrófagos, células dendríticas, células endoteliais e do músculo liso (PEISER *et al.*, 2002). Sabe-se que os SRs são responsáveis pelo reconhecimento do fucana, um polissacarídeo sulfatado isolado de alga parda (KIM *et al.*, 2003). O receptor  $\beta$ -glucano é amplamente expresso em monócitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, eosinófilos e linfócitos T e B (WILLMENT *et al.*, 2005). O receptor de manose é expresso em macrófagos, células dendríticas, células endoteliais hepáticas, células mesangiais e células do músculo liso traqueal (SHEPHERD *et al.*, 1991; LINEHAN *et al.*, 1999). Nele se ligam os polissacarídeos do tipo manano. Os receptores CR3 são principalmente expressos em macrófagos e neutrófilos, e também em alguns subtipos de células B e T e células *natural killer* (NK) (ROSS & VETVICKA, 1993).

As células mielóides, que têm um importante papel tanto no sistema imune inato quanto no adquirido, são o principal alvo dos polissacarídeos modificadores da resposta

biológica (ESTRADA *et al.*, 1997; LEE *et al.*, 2001). Os efeitos estimulatórios dos polissacarídeos sobre os macrófagos (uma das principais células mielóides) são o aumento da fagocitose (STUART *et al.*, 1997), da produção de espécies reativas de oxigênio (LIM *et al.*, 2004), da expressão de marcadores da ativação, como o receptor Fc (MATSUMOTO & YAMADA, 1995), e da secreção de citocinas (ESTRADA *et al.*, 1997; KODAMA *et al.*, 2004). Polissacarídeos modificadores da resposta biológica têm então a capacidade de melhorar a função efetora dos macrófagos, a capacidade de processar antígenos e de modular a imunidade adquirida através da secreção de citocinas, apresentação de antígenos e expressão de moléculas de adesão celular. A ativação direta de outras células imunes como as células *natural killer* (NK) e linfócitos são consideradas como um evento secundário (LEUNG *et al.*, 2006).

Polissacarídeos modificadores da resposta biológica são geralmente fortes mitogênicos. Macrófagos, linfócitos T e B e células NK proliferam em resposta à estimulação com esses polissacarídeos, que é mediada através da ligação do polissacarídeo ao seu receptor correspondente. Essa ativação mitogênica é caracterizada pelo uso de proteínas quinases (MAPKs) nos eventos de sinalização intracelular (GARCIA-LORA *et al.*, 2003; HAN *et al.*, 2003). Este pode ser um fenômeno comum a todas as células imunes que podem ser estimuladas por polissacarídeos.

Outro mecanismo imunomodulatório dos polissacarídeos é o de ser anti-apoptótico. Hwang *et al.* (2003) demonstrou que polissacarídeos isolados de *Artemisia iwayomogi* têm a capacidade de suprimir a apoptose em esplenócitos de camundongos *in vitro* e *in vivo*. Além da ativação celular, os polissacarídeos acionam vias do complemento do sistema imune. Estudos demonstram que polissacarídeos que contêm manano, pectina ou  $\beta$ -glucanos agem através das vias do complemento (GLOVSKY *et al.*, 1983; MICHAELSEN *et al.*, 2000). Eles podem ainda auxiliar na defesa contra patógenos de forma direta ou indiretamente através da ativação de macrófagos. Os mecanismos pelos quais os polissacarídeos agem estão resumidos na Figura 4.



**Figura 4** – Ilustração esquemática do mecanismo proposto para ativação de células imunes por polissacarídeos modificadores da resposta biológica (modificado de LEUNG *et al.*, 2006).

### 1.3. Algas como fonte de produtos bioativos

As algas são organismos eucariotas e autótrofos, que realizam fotossíntese para elaborar o alimento de que precisam. Fazem parte de um grupo que apresenta uma grande diversidade de formas, abrangendo desde células microscópicas, com apenas alguns micrômetros de diâmetro (microalgas) às algas da Antártica (macroalgas) que chegam a medir vários metros de comprimento e possuir o peso de uma árvore (ROUND, 1973). Elas podem ser diferenciadas de acordo com seus pigmentos, suas substâncias de reserva, componentes da parede celular, habitat e número, posição e comprimento dos flagelos (BOLD, 1998). As três divisões encontradas das macroalgas são: Chlorophyta, grupo formado pelas algas verdes, sendo esta divisão a mais abundante; Phaeophyta, composta pelas algas pardas, e Rhodophyta, que compreende as algas vermelhas.

A utilização das algas no comércio global é uma indústria que movimenta um mercado de cerca de US\$ 7,4 bilhões de dólares, com a produção e coleta de 16,8 milhões de toneladas ao ano (FAO, 2011). O maior uso delas é através de cultura de espécies em cativeiro para obtenção de agar, carragenanas e alginatos. Dentre estes, os hidrocolóides têm maior significância comercial, devido às suas propriedades de formar gel, reter água e emulsificar (RENN, 1997). Nos anos 50, as propriedades medicinais das algas eram restritas à medicina tradicional e popular (LINCOLN *et al.*, 1991). Mais recentemente, os organismos marinhos passaram a ser sistematicamente pesquisados pelas suas propriedades farmacológicas. Uma análise quantitativa dos produtos de origem marinha na literatura mostra que mais de 20.000 compostos já foram isolados, sendo que a vasta maioria corresponde a terpenos e alcalóides de invertebrados marinhos (Hu *et al.*, 2011; Blunt *et al.*, 2011). Destes, cerca de 10% correspondem a produtos isolados de macroalgas marinhas, principalmente de algas vermelhas (RODOPHYTA) e pardas (PHAEOPHYTA), onde os compostos halogenados têm recebido expressiva atenção, uma vez que possuem potente atividade biológica (HU *et al.*, 2011).

A parede celular das algas marinhas contém polissacarídeos sulfatados que não são encontrados em plantas terrestres e que possuem funções específicas na regulação iônica (KLOAREG & QUATRANO, 1988). Nos últimos anos, polissacarídeos de algas têm sido bastante estudados por apresentarem diversas atividades biológicas e fisiológicas.

Alguns polissacarídeos de algas possuem atividades contra viroses responsáveis por doenças humanas infecciosas. Polissacarídeos sulfatados isolados de *Aghardhiella tenera* (WITVROUW *et al.*, 1994) e de *Nothogenia. fastigiata* (DAMONTE *et al.*, 1994; KOLENDER *et al.*, 1995) foram testados contra o vírus HIV, vírus da Herpes do tipo 1 e 2 e vírus sincicial respiratório. Estes apresentaram atividade durante o primeiro estágio de replicação do RNA viral, quando o vírus entra na superfície da célula (DE CLERCQ, 1996). Um requerimento importante para a utilização de uma substância como composto farmacológico em humanos é que ela tenha baixa toxicidade em células de mamíferos e a maioria dos polissacarídeos de algas, inclusive destas duas espécies possuem essa característica. Galactanas sulfatas isoladas das algas *Grateloupia filicina* e *Grateloupia longifolia* apresentaram potente atividade anti-HIV-1 em testes *in vitro* (WANG *et al.*, 2007). O polissacarídeo sulfatado SPMG de algas pardas tem um potencial tanto preventivo quanto terapêutico contra o vírus HIV (MEIYU *et al.*, 2003). Polissacarídeos sulfatados isolados das algas *Dictyota mertensii*, *Lobophora variegata*, *Spatoglossum schroederi* e *Fucus vesiculosus*

(Queiroz *et al.*, 2008) foram capazes de inibir a enzima transcriptase reversa do vírus HIV, enquanto os de *Gracilaria corticata* agem em vírus da Herpes do tipo 1 e 2 (MAZUMDER *et al.*, 2002). Frações de galactofucanas isolados de *Adenocystis utricularis* também apresentaram atividade anti-HIV *in vitro*, inclusive contra aqueles que eram resistentes ao tratamento com outras drogas (TRINCHERO *et al.*, 2009). Baseado nestes resultados, alguns polissacarídeos isolados de algas são bons candidatos para o desenvolvimento de novas drogas para a prevenção do HIV.

Fucanas são polissacarídeos contendo grande porcentagem de L-fucose e grupos de éster sulfato, encontrados abundantemente no espaço extracelular e na matriz mucilaginosa de algas pardas. Os fucanas possuem diversas atividades, mas sua ação anticoagulante é a mais estudada de todas. Cumashi *et al.* (2007) estudaram nove espécies de algas e verificaram que oito delas apresentavam atividade anticoagulante, enquanto cinco delas apresentaram atividade anti-trombina em um teste de agregação de plaquetas. Esta ação anticoagulante pode ser aumentada com o aumento dos grupos sulfatos nos fucanas (QIU *et al.*, 2006). Mourão (2004) mostrou que essa atividade não está apenas relacionada com a densidade das cargas de cada polissacarídeo, mas depende principalmente da distribuição dos grupos sulfatos e da composição de monossacarídeos. Um galactofucana isolado de *Spatoglossum schroederi* foi testado em modelos *in vivo* e também apresentou atividade anti-trombótica (MOURÃO, 2004).

Fucanas isolados das algas *Undaria pinnatifida* (HEMMINGSON *et al.*, 2006), *Cystoseira indica* (MANDAL *et al.*, 2007) e *Undaria pinnatifida* (HAYASHI *et al.*, 2008) apresentaram atividade contra os vírus causadores da Herpes, HSV-1 e HSV-2. Eles ainda são capazes de inibir diversos outros vírus, como o da imunodeficiência humana e citomegalovírus (PONCE *et al.*, 2003). Não há correlação entre as atividades anticoagulantes e antivirais dos fucanas. Alguns podem apresentar apenas uma das atividades, enquanto outros podem apresentar as duas (MANDAL *et al.*, 2007; OOI *et al.*, 2007).

Muitos polissacarídeos sulfatados de algas apresentam propriedades citotóxicas. Fucanas isolado de *Eisenia bicyclis* e *L. japonica* possuem atividade antitumoral contra o tumor sarcoma 180 (SONG *et al.*, 2000). Os fucanas possuem ainda atividade antiproliferativa (CUMASHI *et al.*, 2007), inibem a adesão celular e impedem a metástase (ALEKSEYENKO *et al.*, 2007; CUMASHI *et al.*, 2007).

Fucanas isolados da alga parda *Sargassum thunbergii* apresentaram atividade antitumoral e antimetastática provavelmente devido sua ação imunoestimulante e

imunomoduladora (ITOH *et al.*, 1995). Os fucanas são agentes imunomoduladores, capazes de induzir a produção de IL-1 e IFN- $\gamma$  *in vitro*, melhorar a função de células T, B, macrófagos e células NK e ainda promover a resposta humoral *in vivo* (YANG *et al.*, 1995). Fucanas isolados de *Cladosiphon okamuranus* aumentam a proporção de células T citotóxicas (SHIMIZU *et al.*, 2005) e fucanas de *F. vesiculosus* possui ação imunoestimulante e de maturação das células dendríticas, através da via do NF- $\kappa$ B (KIMA *et al.*, 2008).

Carragenana é um termo coletivo para um grupo de polissacarídeos sulfatados, compostos por galactanos, extraídos de algas vermelhas. Dependendo do número e posição dos grupos sulfatos, pode ser dividido em diferentes tipos, como as  $\kappa$ -carragenanas,  $\iota$ -carragenanas, ou  $\lambda$ -carragenanas (JI, 1997). Estudos com  $\lambda$ -carragenanas de diferentes pesos moleculares isoladas de *Chondrus ocellatus* demonstraram que elas apresentavam atividade antitumoral e imunoestimulante e que os polissacarídeos que tinham menor peso molecular eram os que apresentavam uma maior taxa inibitória do tumor (ZHOU *et al.*, 2004). Yuan *et al.* (2005) verificou que  $\kappa$ -carragenanas de *Kappaphycus striatum* também possuem atividade antitumoral em animais implantados com o tumor sarcoma-180 e que essa ação se deve provavelmente à sua atividade imunomoduladora. Ogata *et al.* (1999) verificaram que as carragenanas são altamente inflamatórias em camundongos, induzindo a produção de TNF- $\alpha$  por leucócitos em resposta ao lipopolissacarídeo bacteriano.

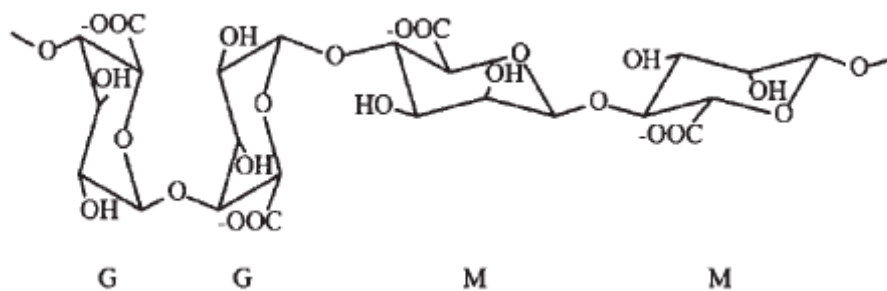
A partir de *Omphalia lapidescens*, pode-se produzir 1 $\rightarrow$ 3:1 $\rightarrow$ 6- $\beta$ -D-glucanos com propriedades antitumorais (SAITO *et al.*, 1992). Estudos realizados por Kaeffer *et al.* (1999) demonstraram que polissacarídeos sulfatados de algas verdes possuem propriedades citotóxicas ou citostáticas contra células cancerígenas do epitélio do cólon. Um polissacarídeo sulfatado isolado de *Ulva rigida*, o ulvana, composto principalmente por um dissacarídeo de ácido glucurônico e ramnose, é capaz de modular a ação de macrófagos, tendo ação inflamatória (LEIRO *et al.*, 2007).

Além destes, outros polissacarídeos que apresentaram atividade antitumoral e imunoestimulante foram isolados das algas *Chondrus ocellatus* (ZHOU *et al.*, 2004), *Porphyra yezoensis* (YOSHIZAWA *et al.*, 1993), *Fucus evanescens* (ALEKSEYENKO *et al.*, 2007), *Gracilaria verrucosa* (YOSHIZAWA *et al.*, 1996), *Marginisporum crassissimum* (HIROISHI *et al.*, 2001), *Hijikia fusiforme* (OKAI *et al.*, 1997) e *Champia feldmannii* (LINS *et al.*, 2009).

#### 1.4. Alginatos

Alginatos são polissacarídeos de algas que são solúveis em água, consistindo em blocos alternados de ácido  $\alpha$ -L-gulurônico (G) e ácido  $\beta$ -D-manurônico (M) com ligações 1  $\rightarrow$  4, como mostra a Figura 5 (DRAGET *et al.*, 1990). A proporção e distribuição destes blocos, juntamente com a sua sequência é que determina as propriedades físicas e químicas de cada alginato (BATCHELOR *et al.*, 2002). Eles possuem uma afinidade para cátions multivalentes, como  $\text{Ca}^{2+}$  e pode se ligar a eles seletivamente e cooperativamente, formando um gel. Essa afinidade com os íons depende da composição química dos alginatos e, mais especificamente, do número e comprimento dos blocos de ácido gulurônico (DRAGET *et al.*, 1997).

Os alginatos têm numerosas aplicações na indústria alimentícia, farmacêutica, têxtil, de cosméticos, papel, borracha etc. Na área farmacêutica são usados como sistemas de liberação de drogas, sistemas de bioadesão, agentes emulsificantes, curativos, material para impressão dental e implantes (AUGST, 2006). Eles não possuem nenhum valor nutricional, mas são bastante usados como aditivos para melhorar, modificar e estabilizar a textura de certos alimentos, como por exemplo, no preparo de sorvetes, por impedirem a formação de cristais macroscópicos de gelo, o que dá ao produto uma característica cremosa (MOE *et al.*, 1995).



**Figura 5** - Alginato composto por dois resíduos de ácido gulurônico e dois ácidos manurônicos através de ligações (1-4) (AUGST *et al.*, 2006).



Na área médica, os alginatos têm sido usados na imobilização das ilhotas de Langerhans para tratamento da diabetes mellitus em ratos (SOON-SHIONG *et al.*, 1994) e no tratamento de úlceras pépticas e esofagites (DAIGO *et al.*, 1981). Um alginato de sódio isolado de *Laminaria angustata* diminuiu os níveis de colesterol e glicose no sangue, através da inibição da absorção no intestino delgado, sugerindo o seu uso para a prevenção de obesidade, hipercolesterolemia e diabetes (KIMURA *et al.*, 1996). Os alginatos também apresentam atividade anticoagulante (RONGHUA, YUMIN & JIANHONG, 2003).

Atualmente, um alginato modificado quimicamente está sendo usado como um sistema de liberação de proteínas que promovem a regeneração de tecidos mineralizados (BRATTHALL *et al.*, 2001) e como carregador para células transplantadas (BENT *et al.*, 2001).

Alginatos isolados de *Sargassum sp.* possuem atividade antitumoral contra diversos tumores murinos, como sarcoma-180, carcinoma de Ehrlich e carcinoma IMC (FUJIIHARA, *et al.*, 1984; FUJIIHARA & NAGUMO, 1992, 1993). Sua atividade antitumoral está ligada à composição do alginato, onde os que possuem uma maior quantidade de blocos M-M seriam os mais ativos (FUJIIHARA & NAGUMO, 1992, 1993). Outro alginato, isolado da alga *Sargassum stenophyllum*, no Sul do Brasil, apresentou ação antiangiogênica em experimentos realizados *in vitro* e *in vivo* (DIAS *et al.*, 2008).

Foi também demonstrado que blocos poliméricos M (ácido manurônico) e MG (ácidos manurônicos e gulurônicos) possuem a capacidade de estimular a produção de IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  por monócitos ativados (OTTERLEI *et al.*, 1991), bem como aumentarem a taxa de sobrevivência de animais transplantados com sarcoma-180 (LIZIMA-MIZUI *et al.*, 1985), efeito este que pode ser relacionado com as suas propriedades imunomodulatórias.

Sousa *et al.*, 2007 investigaram o potencial antitumoral de dois alginatos isolados de *Sargassum vulgare* C Agardh. Trata-se de uma alga marrom comumente presente na costa brasileira em abundância (SZECHY & PAULA, 2000). Estes alginatos diferiam na sua viscosidade, sendo um de baixa viscosidade (SVLV) e outro de alta viscosidade (SVHV). Ambos alginatos não demonstraram nenhuma toxicidade *in vitro* contra as linhagens tumorais testadas, porém foram capazes de inibir o crescimento de tumor sarcoma-180 em camundongos, sendo essa inibição maior quando administrados por via oral. O alginato SVHV apresentou uma maior inibição que SVLV, além de uma toxicidade menor. Além disso, eles causaram um aumento na polpa branca dos baços dos animais tratados, sugerindo que essa ação antitumoral pode ter sido relacionada a uma propriedade imunoestimulatória.

O presente trabalho buscou estudar um pouco mais sobre as propriedades biológicas do alginato SVHV isolado da alga *S. vulgare*, com ênfase na sua atividade antitumoral e os seus efeitos no sistema imune.

# *Objetivos*

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Geral

Verificar o potencial antitumoral, efeitos tóxicos e atividade inflamatória do alginato de alta viscosidade isolado da alga *Sargassum vulgare* (SVHV).

### 2.2. Específicos

- Avaliar o potencial do alginato SVHV em células tumorais.
- Avaliar o potencial antitumoral do alginato SVHV em camundongos transplantados com melanoma B-16.
- Determinar a toxicidade do alginato SVHV sobre o fígado, rins e baço de camundongos.
- Avaliar parâmetros hematológicos e bioquímicos após tratamento dos animais com SVHV.
- Avaliar a atividade de SVHV sobre macrófagos peritoneais.
- Avaliar a atividade da injeção local de SVHV em modelos de edema de pata e migração de neutrófilos.

# ***Materiais e Métodos***

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Células

As células utilizadas no ensaio de citotoxicidade estão listadas quanto ao tipo histológico e origem na tabela 1. A linhagem é pertencente ao Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará e foi doada pelo Instituto Nacional do Câncer - USA.

**Tabela 1** - Linhagem tumoral utilizada no ensaio de citotoxicidade *in vitro*.

<b>Linhagem</b>	<b>Tipo Histológico</b>	<b>Origem</b>
B-16	Melanoma	murina

#### 3.2. Coleta e limpeza do material biológico

A alga marinha *Sargassum vulgare* (Figura 6) foi coletada na Praia de Flexeiras (3°16'40''S, 39°16'8''O), Município de Trairi - Ceará, no mesolitoral, à beira-mar das marés de sizígia. Em seguida, transportada em saco plástico até o laboratório, sendo cuidadosamente separada de outras espécies e lavada com água destilada para a retirada de impurezas. Após a limpeza, a alga foi desidratada em estufa à 60°C e cortada em pequenos pedaços para, posteriormente, ser submetida ao processo de extração.



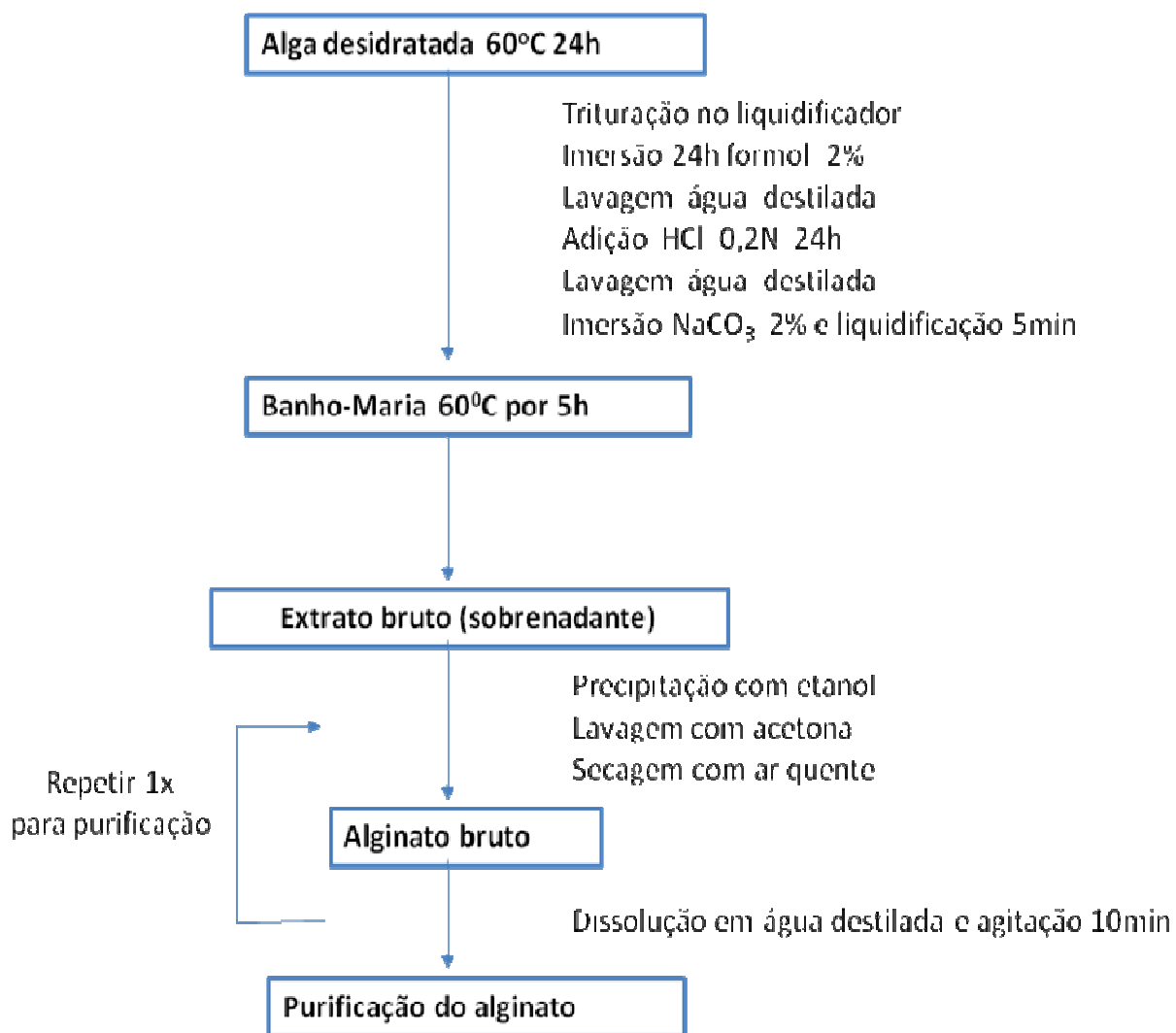
**Figura 6** – Fotografia da alga *Sargassum vulgare*.

### **3.3. Extração do alginato**

Este procedimento seguiu a metodologia descrita por Torres *et al.* (2007) para obtenção do alginato de alta viscosidade de *Sargassum vulgare* (SVHV). A extração foi realizada a partir do tecido seco, previamente cortado e hidratado com formol a 2%. Em seguida, lavou-se a alga com água destilada e adicionou-se HCl 0,2N por 24h e, depois de lavar, NaCO<sub>3</sub> a 2%, triturando o material.

Após esse período, a mistura foi colocada em banho-maria à 60°C durante 5 horas, filtrada e centrifugada (6.000 rpm; 30 min; 4°C), separando-se o resíduo do sobrenadante. Ao sobrenadante, foram adicionados 300 mL de etanol para precipitar o alginato. Após a precipitação, o alginato bruto foi lavado com acetona e seco.

Para a purificação, o alginato foi lavado em água destilada por 10 minutos e repetido o processo de precipitação e lavagem (Figura 7).



**Figura 7** - Fluxograma de extração e purificação do alginato.



### **3.4. Estudo da atividade antitumoral *in vivo***

#### **3.4.1. Obtenção e manutenção dos animais**

Os testes foram realizados utilizando camundongos *Mus musculus* C57BL/6 fêmeas pesando entre 25-30g com 22 semanas, oriundos do biotério central da Universidade Federal do Ceará, mantidos no biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, com água e alimento *ad libitum*, em estantes ventiladas (Alesco), com ciclo claro/escuro de 12 horas. O manejo deles procurou seguir todos os princípios éticos, de forma a amenizar ao máximo o sofrimento dos animais, tendo o aceite do Comitê de Ética.

#### **3.4.2. Cultura celular**

A linhagem murina melanoma B-16 (cedida pelo NCI-USA, *Bethesda*, MD, USA) foi cultivada segundo o item 3.4.1.1. No dia do experimento, as células foram lavadas 2 vezes com PBS, depois colocado 1 mL de tripsina (0,05% contendo 0,01% de EDTA) e as células foram mantidas por 5 minutos na estufa (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>) a fim de favorecer a soltura das células do plástico do fundo da garrafa. Quando verificado ao microscópio ótico que todas as células estavam soltas, foi adicionado 5 mL de meio completo para inativar a tripsina e maximizar o número de células viáveis. As células foram então contadas, centrifugadas (1500rpm/ 5 min) e ressuspensas em PBS na concentração final de 4 x 10<sup>6</sup> células/mL.

#### **3.4.3. Modelo de Melanoma**

Foram injetados por via subcutânea 2 x 10<sup>6</sup> células/0,5 mL do melanoma B-16 na axila esquerda dos animais receptores. O tratamento foi iniciado 24 horas após a inoculação do tumor por 10 dias consecutivos, utilizando solução salina como controle (200 µL) ou SVHV (25 mg/Kg/animal/dia), pelas vias intraperitoneal ou oral.

O volume do tumor foi medido 11 e 15 dias após o transplante, sendo os animais sacrificados no último dia para retirada do tumor, rins, fígado e baço para pesagem e análise macroscópica e histopatológica. O percentual de inibição do crescimento tumoral (IT) foi calculado pela seguinte fórmula:  $IT (\%) = [(A-B)/A] \times 100$ , sendo A a média dos pesos dos tumores do grupo controle negativo e B a média dos pesos dos tumores nos animais tratados.

#### **3.4.4. Análise morfológica e histopatológica**

A coloração por hematoxilina e eosina (H/E), que permite diferenciar o citoplasma do núcleo foi utilizada para analisar as estruturas celulares e identificar possíveis alterações. Essa análise morfológica e histopatológica pode fornecer dados para sugerir os efeitos tóxicos causados pela droga. Além disso foi feito uma prévia análise macroscópica dos órgãos.

##### **3.4.4.1. Procedimento experimental**

Após o sacrifício dos animais, foram retirados e pesados o fígado, baço, rins e tumor, os quais foram armazenados em formol 10% e em seguida seccionados em pedaços pequenos para posterior preparação das lâminas. O material foi fixado em formol 10% por um período de 24 horas, em seguida desparafinado em xilol por 15 minutos, e desidratado em concentrações crescentes de álcool até 70%, através da rápida imersão das lâminas, sendo posteriormente lavadas em água destilada até ser removido todo o álcool. Em seguida, as lâminas foram coradas com hematoxilina 0,1% e eosina.

#### **3.4.5. Determinação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos**

A determinação dos parâmetros hematológicos avalia possíveis mudanças na concentração de leucócitos totais e na contagem diferencial de leucócitos (linfócitos, monócitos, neutrófilos e eosinófilos). Os testes bioquímicos avaliaram a função renal através dos parâmetros séricos de dois marcadores da integridade renal, a uréia e a creatinina. Para investigação de dano no hepatócito é determinada, no soro dos animais, a atividade da alanina amino transaminase (ALT), enzima de elevada atividade no hepatócito, sendo importante marcador de dano neste órgão.

##### **3.4.5.1. Procedimento experimental**

O sangue foi coletado do plexo orbital, imediatamente antes do sacrifício dos animais. Em seguida, foram colocados 20 $\mu$ L de sangue em 380 $\mu$ L de solução de Turk para contagem total de leucócitos em câmara de Neubauer em microscópio ótico. Para a contagem

diferencial de leucócitos foram feitas lâminas do sangue, que foram submetidas à contagem em microscópio ótico.

Para análise bioquímica foram utilizados kits da LABTEST® sistemas para diagnóstico, seguindo-se o método descrito por este fabricante.

### **3.5. Atividade citotóxica *in vitro***

#### **3.5.1. Ensaio do MTT**

Este ensaio pode ser utilizado para determinar citotoxicidade, proliferação e ativação celular. É uma análise colorimétrica que quantifica indiretamente as células viáveis, baseada na redução do sal 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazolium bromida (MTT), um composto de cor amarela, a formazan, de coloração púrpura, pelos substratos celulares NADH, NADPH e succinato (MOSMMAN, 1983). No presente trabalho, este ensaio foi utilizado para avaliação da atividade de SVHV em B-16 (melnoma murino).

##### **3.5.1.1. Manutenção das Células**

As células foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (75cm<sup>2</sup>, volume de 250mL); o meio de cultura utilizado (RPMI 1640) foi complementando com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos. As células foram incubadas em estufa incubadora a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, sendo observado o crescimento celular com ajuda de microscópio de inversão a cada 24 horas. Quando necessário, as células eram repicadas em meio de cultura novo, em uma concentração de 0,5-1,0 x 10<sup>6</sup> células/mL.

##### **3.5.1.2. Procedimento Experimental**

As células em suspensão foram plaqueadas em placas de 96 cavidades numa densidade de 3 x 10<sup>5</sup> células/mL. A substância teste foi incubada durante 72 horas juntamente com a suspensão de células em concentrações que variam de 0,5 a 100 µg/mL. Após o período de incubação, o material foi centrifugado (1500 rpm/15 min), e o sobrenadante descartado. Cada cavidade recebeu 200µL da solução de MTT a 0,5 mg/mL, sendo reincubado por mais 3 horas, em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Após esse período, as placas foram novamente

centrifugadas (3000 rpm/10min), o sobrenadante desprezado e o precipitado ressuspendido em 150µL de DMSO. Para a quantificação do sal reduzido nas células vivas, as absorbâncias foram lidas com o auxílio do espectrofotômetro, no comprimento de onda de 595nm.

### **3.6. Atividade Imunoestimulatória**

#### **3.6.1. Ativação de macrófagos *in vitro***

Foi feita uma cultura primária a partir de macrófagos retirados da cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6 fêmeas (*Mus musculus*). Os animais foram mantidos com ração apropriada e água *ad libitum*.

Para a obtenção dos macrófagos, os camundongos foram inoculados com 2 mL de tioglicolato 3% envelhecido a fim de estimular os macrófagos periféricos. Três dias depois, os animais foram sacrificados por asfixia, com éter etílico em câmara de vidro. Em seguida foi feita assepsia com álcool 70% e a cavidade peritoneal foi lavada com 5 mL de meio de cultura RPMI completo. Após uma leve massagem foi feita uma incisão com bisturi para coleta do líquido com seringas de 3 mL. Posteriormente, as células foram centrifugadas a 1.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o “pellet” de células foi ressuspensão em meio RPMI completo. A contagem de células foi realizada em câmara de Neubauer, e a seguir, as células foram plaqueadas em placa de cultura estéril com 1 mL por poço e colocadas para aderir durante uma hora a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período SVHV foi incubado nas concentrações de 1, 10 e 100 µg/mL durante 1h. Como controle negativo, foi utilizado salina e como controle positivo, o LPS 10 µg/mL. Em seguida a placa foi lavada, para retirada do alginato, e adicionado mais 2 mL de meio RPMI completo para uma última incubação de 3h e 24h, onde depois foi retirado o sobrenadante utilizado nos testes seguintes. Todo o procedimento foi cuidadosamente elaborado de forma apirogênica.

#### **3.6.2. Migração de neutrófilos**

Este teste busca avaliar a capacidade da substância teste de ativar o macrófago e induzir uma elevação na migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal do animal, mostrando assim uma ação imunoestimulante.

### 3.6.2.1. Procedimento experimental

Foram injetados intraperitonealmente, em camundongos C57BL/6 fêmeas, 100 µL do sobrenadante dos macrófagos previamente estimulados com salina, LPS (10 µg/mL) ou SVHV nas concentrações de 1, 10 e 100 µg/mL. Após quatro horas, os animais foram sacrificados com éter etílico e tiveram a cavidade peritoneal lavada com 2 mL da solução de PBS heparinizado. Após uma leve massagem foi feita uma incisão com bisturi para coleta do líquido com pipeta Pasteur. As contagens total e diferencial foram feitas de acordo com o método descrito por Souza & Ferreira em 1985.

Do líquido colhido, 20µL foram diluídos em 380 µL de solução de Turk (1:20 v/v) e utilizados para contagem total de células em câmara de Neubauer. Para contagem diferencial de células, 80 µL do exsudato foram colocados em citocentrífuga (2800 rpm/ 10 min). Em seguida, as lâminas foram coradas com HE. A contagem foi realizada em microscópio óptico, com objetiva de imersão (aumento de 100x). Foram contadas 100 células por lâmina e o número total de neutrófilos foi estimado calculando-se as percentagens com relação ao número total de leucócitos encontrados.

### 3.6.3. Detecção de citocinas liberadas no sobrenadante da cultura de macrófagos

O teste ELISA (do inglês *Enzyme linked Immunoabsorbant Assay*) permite detectar eficientemente diversas moléculas como anticorpos e citocinas usando anticorpos específicos e quantificá-los colorimetricamente devido à reação da avidina-peroxidase revelada com tetrametilbenzidina.

#### 3.6.3.1. Procedimento experimental

Os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções do kit do fabricante (BD OpTEIA™). Cada placa foi sensibilizada com 100µL do anticorpo de captura anti-TNF- $\alpha$  *overnight* (2-4°C) e então lavada 3 vezes com uma solução de Tween 20 0,05% diluída em tampão fosfato pH7,4. Posteriormente as placas foram bloqueadas com 200 µL de SFB a 10% em tampão fosfato por 1h à temperatura ambiente e lavadas 3 vezes. Aliquotas dos sobrenadantes obtidos dos macrófagos e os padrões das citocinas (para obtenção de uma curva

padrão) foram descongelados e 100 µL/poço incubados por 2h. As placas foram então lavadas 5 vezes e incubadas com anticorpo biotinizado contra a citocina de interesse, juntamente com avidina-peroxidase por 1h e em seguida, lavadas mais 7 vezes para serem reveladas com tetrametilbenzidina como substrato e peróxido de hidrogênio por 30 minutos. A reação foi parada com 50 µL/poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de placas com filtro de 450nm.

#### **3.6.4. Atividade edematogênica**

O teste do edema de pata em ratos é realizado a fim de avaliar uma possível atividade inflamatória da substância teste, através da medição do volume do edema formado na pata injetada.

##### **3.6.4.1. Obtenção e manutenção dos animais**

Os testes foram realizados utilizando ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) pesando entre 150-180g oriundos do biotério central da Universidade Federal do Ceará, mantidos no biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, com água e alimento *ad libitum*, em estantes ventiladas (Alesco), com ciclo claro/escuro de 12 horas. O manejo deles procurou seguir todos os princípios éticos, de forma a amenizar ao máximo o sofrimento dos animais.

##### **3.6.4.2. Procedimento experimental**

O volume da pata traseira esquerda de cada animal foi medido usando um pletismômetro antes da injeção do estímulo inflamatório (tempo zero). Em seguida, foi injetado 0,1 ml do estímulo por via sub-plantar nessa mesma pata. O grupo controle negativo recebeu salina estéril, como controle positivo foram utilizados a carragenana (300µg/pata) e o dextran (300µg/pata) e os grupos do SVHV receberam 10, 300 e 1000µg/pata (n=6). O volume da pata foi avaliado após 30 minutos, 1, 2, 3 e 4 horas da injeção do alginato. Foram utilizados esses tempos de medição já que o pico do edema induzido pela carragenana ocorre na 3<sup>a</sup> hora após a injeção desse estímulo e ela também é um polissacarídeo obtido de alga. O edema foi calculado como a variação de volume, isto é, a diferença entre o volume em um determinado tempo após o estímulo e o volume da pata antes do estímulo inflamatório (tempo zero). Após

o teste e o sacrifício dos animais, a pele da pata foi retirada para avaliação da enzima mieloperoxidase (MPO) e detecção de citocinas.

### **3.6.5. Atividade da mieloperoxidase (MPO)**

A atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) é uma forma indireta de se avaliar a infiltração de neutrófilos após o edema de pata causado pela substância teste, descrito por Bradley *et al.*, 1982.

#### **3.6.5.1. Procedimento experimental**

A pele da pata traseira dos animais foi retirada e colocada em tampão fosfato potássio 50 mM, pH 6,0, contendo 0,5% de bromido hexadecil-trimetil-amônia (1 mL/ 50 mg de tecido) e homogeneizado. Em seguida foi centrifugado durante 5 minutos, 2500 rpm. Um volume de 10 µL do sobrenadante foi colocado em placas de 96 poços, em triplicata. Foram adicionados ainda 200 µL de tampão contendo O-dianisidina dihidroclorídrico (16,7 mg), água destilada (90 µL), tampão fosfato de potássio (10 µL) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1% (50 µL). A atividade da enzima foi determinada medindo a absorbância (460 nm em um espectrofotômetro de placas e gravada em intervalos de 15 segundos por 2 minutos.

### **3.6.6. Detecção de citocinas da pele de pata de ratos**

Após o edema de pata, pode-se ainda avaliar quais citocinas estavam presentes na pele da pata traseira tratada com a substância teste durante o teste do edema de pata, sabendo assim quais citocinas participam deste processo.

#### **3.6.6.1. Procedimento experimental**

Foram dosadas as citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10 no sobrenadante dos tecidos da pata traseira retiradas após o edema de pata. A pele foi retirada e feito um homogenato em tampão fosfato e o sobrenadante utilizado para a dosagem das citocinas através do teste ELISA. O procedimento foi realizado de acordo com as orientações do kit do fabricante (R&D Systems).

### **3.6.7. Efeito de moduladores farmacológicos no edema de pata**

Em um segundo momento, moduladores farmacológicos foram utilizados a fim de avaliar quais mediadores inflamatórios estão envolvidos no edema de pata causado por SVHV.

#### **3.6.7.1. Procedimento experimental**

Ratos Wistar foram pré-tratados com salina (grupo controle), indometacina (2 mg/Kg, s.c.); dexametasona (2 mg/Kg, s.c.); talidomida (45 mg/Kg, s.c.); difenidramina (10 mg/Kg, i.p.); pentoxifilina (45 mg/Kg, i.p.) e L-NAME (10 mg/Kg, i.p.) 1h antes da administração subcutânea de SVHV (1 mg/0,1 mL) na pata traseira. O edema de pata foi avaliado nos intervalos de 1, 2, 3 e 4 horas e comparado com os controles correspondentes.

### **3.6.8. Efeito de SVHV na degranulação de mastócitos peritoneais**

Este teste avalia a capacidade da substância teste de degranular mastócitos presentes na cavidade peritoneal, caso ele aja como uma substância inflamatória.

#### **3.6.8.1. Procedimento experimental**

Ratos Wistar foram tratados intraperitonealmente com salina, carragenana (500 µg), composto 48/80 (0,6 mg/Kg) ou com SVHV (1 mg). O mesentério foi retirado após 30 minutos e fixado com albumina em lâminas, sendo corado com uma solução de azul de toluidina 0,1% (em salina 0,9%) por 60 segundos. Em seguida foi lavado em água destilada. Todo o procedimento experimental foi realizado segundo descrito por Zhong *et al.*, 2001. A porcentagem de mastócitos degranulados foi determinada contando 100 células marcadas por cada seção de tecido.

### **3.6.9. Avaliação do papel dos mastócitos peritoneais na migração de neutrófilos induzida por SVHV.**

Este experimento buscou verificar uma possível interferência dos mastócitos peritoneais na migração de neutrófilos causada por SVHV.



#### 3.6.9.1. Procedimento experimental

A população de mastócitos presentes no peritônio foi depletada através de um tratamento crônico dos animais com o composto 48/80, de acordo com Di Rosa *et al.*, 1971. Ratos Wistar foram tratados com o composto 48/80, i.p., por 4 dias (0,6 mg/Kg, duas vezes ao dia, durante 3 dias e 1,2 mg/Kg duas vezes no 4<sup>o</sup> dia). No quinto dia, parte dos animais foi utilizada para a contagem do número de mastócitos com o azul de toluidina e outra parte recebeu injeções i.p. de salina, carragenana (0,3 mg) ou SVHV (1 mg) a fim de induzir a migração de neutrófilos. Após 4 horas, a migração de neutrófilos foi avaliada como descrito acima.

#### **3.6.10. Avaliação do papel dos macrófagos peritoneais na migração de neutrófilos induzida por SVHV.**

Este experimento buscou verificar uma possível interferência dos macrófagos peritoneais na migração de neutrófilos causada por SVHV.

##### 3.6.10.1. Procedimento experimental

Para a avaliação do papel dos macrófagos residentes, os ratos foram anestesiados e tiveram 3 agulhas hipodérmicas inseridas na sua cavidade abdominal (1 agulha localizada abaixo do esterno e 2 agulhas na região inguinal). Em seguida, foi injetado salina estéril contendo heparina (5 UI/mL) pela seringa localizada próximo ao esterno. A cavidade abdominal foi gentilmente massageada por 1 minuto e o fluido peritoneal coletado através das duas outras agulhas localizadas na região inguinal. Esse procedimento foi repetido três vezes, eliminando assim mais de 80% dos macrófagos residentes na cavidade peritoneal. Mais de 90% da salina injetada foi recuperada. Como controle, animais passaram pelo mesmo procedimento, entretanto, nenhum fluido foi injetado ou recuperado. Se houvesse sangue no líquido recolhido, o animal era descartado, segundo método descrito inicialmente por Faccioli *et al.*, 1990 e modificado por Ribeiro *et al.*, 1997.

Quatro grupos foram formados. Dois grupos controles, onde o primeiro grupo teve a lavagem peritoneal e o outro não, e dois grupos que foram tratados com SVHV (1 mg, i.p.). Após 4 horas, a migração de neutrófilos foi avaliada como descrito anteriormente.

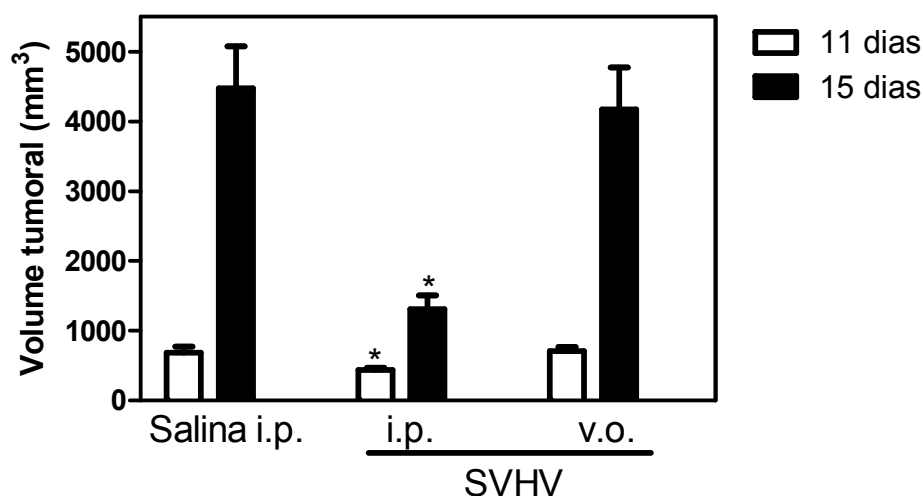
# *Resultados*

## 4. RESULTADOS

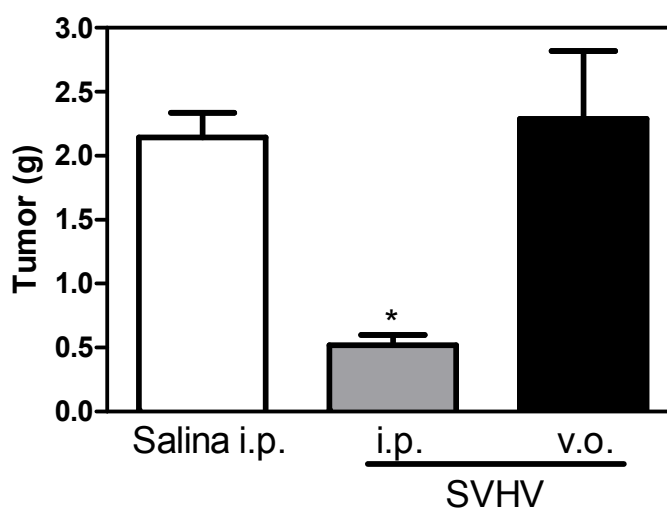
### 4.1. Estudo da atividade antitumoral *in vivo*

#### 4.1.1. Inibição tumoral

A atividade antitumoral *in vivo* foi determinada utilizando-se o modelo experimental melanoma B-16 em camundongos C57BL/6. O volume tumoral foi medido nos dias 11 e 15. O grupo tratado com SVHV na dose de 25 mg/Kg/dia por via intraperitoneal apresentou uma redução no volume tumoral nos dias 11 ( $436 \pm 33,5 \text{ mm}^3$ ) e 15 ( $1307 \pm 200 \text{ mm}^3$ ) quando comparado com o grupo salina nos dias 11 ( $686,1 \pm 84 \text{ mm}^3$ ) e 15 ( $4477 \pm 600 \text{ mm}^3$ ) respectivamente ( $p < 0,05$ ). O grupo tratado por via oral não apresentou redução significativa no volume tumoral ( $p > 0,05$ ) (Figura 8). Com relação à massa úmida dos tumores, os animais controle (salina) apresentaram tumores pesando em média  $2,14 \pm 0,19\text{g}$ . Nos animais tratados com SVHV na dose de 25 mg/Kg/dia, as massas foram de  $0,51 \pm 0,08\text{g}$  para o tratamento intraperitoneal e de  $2,22 \pm 0,48\text{g}$  para os animais tratados por via oral. No tratamento com SVHV por via intraperitoneal, a inibição tumoral foi de 75,8% ( $p < 0,05$ ), enquanto que não houve inibição tumoral no tratamento por via oral ( $p > 0,05$ ). (Figura 9).



**Figura 8** - Efeito do alginato isolado da alga *Sargassum vulgare* (SVHV) sobre o volume tumoral de camundongos *Mus musculus* C57BL/6 transplantados com melanoma B-16. Os animais foram tratados após 24 horas da inoculação do tumor com solução salina ou 25 mg/kg de SVHV por via intraperitoneal (ip) ou por via oral (vo) por 10 dias consecutivos e sacrificados no 15º dia. O volume do tumor de cada animal foi medido 11 e 15 dias após a inoculação do tumor. Os dados apresentam a média ± E.P.M. \* ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo salina por ANOVA seguido por Newman-Keuls ( $n = 8$ ).



**Figura 9** - Efeito do alginato isolado da alga *Sargassum vulgare* (SVHV) sobre a massa tumoral de camundongos *Mus musculus* C57BL/6 transplantados com Melanoma B-16. Os animais foram tratados após 24 horas da inoculação do tumor com solução salina ou 25 mg/kg de SVHV por via intraperitoneal (ip) ou por via oral (vo) por 10 dias consecutivos e sacrificados no 15º dia, quando foi medida a massa do tumor de cada animal. Os dados apresentam a média ± E.P.M. \* ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo salina por ANOVA seguido por Newman-Keuls ( $n = 8$ ).

#### 4.1.2. Análise morfológica e histopatológica

A análise macroscópica mostrou que não havia lesões nos órgãos retirados dos animais de todos os grupos. Após o tratamento com SVHV, os pesos dos fígados e baços não mostraram diferenças significantes em nenhuma das vias utilizadas quando comparados com o grupo controle, porém o peso dos baços nos animais com tumor foi maior do que o peso dos baços dos animais saudáveis ( $p < 0,05$ ). Os pesos dos rins dos animais transplantados com o tumor e tratados com salina ou com SVHV por via oral apresentaram uma redução significativa com relação aos animais saudáveis ( $p < 0,05$ ) (Tabela 2).

As análises histopatológicas dos tumores retirados de camundongos tanto do grupo dos animais com o tumor tratados com salina, como dos outros grupos tratados com SVHV mostraram neoplasia maligna mesenquimal composta por células poligonais com escasso citoplasma, pleomorfismo celular e nuclear, anisocariose, alta frequência de figuras mitóticas, incontínência pigmentar, área de necrose de coagulação e escasso estroma. Há áreas de necrose de coagulação também nos grupos tratados com SVHV (Figura 10).

As análises histopatológicas dos fígados revelaram alterações passíveis de reversão nos grupos tratados com SVHV, representadas por tumefação dos hepatócitos, hiperplasia das células de Kupffer, focos inflamatórios e algumas raras áreas de hemorragias. Entretanto, essas alterações foram similares ao do grupo controle e são consideradas reversíveis (Figura 11).

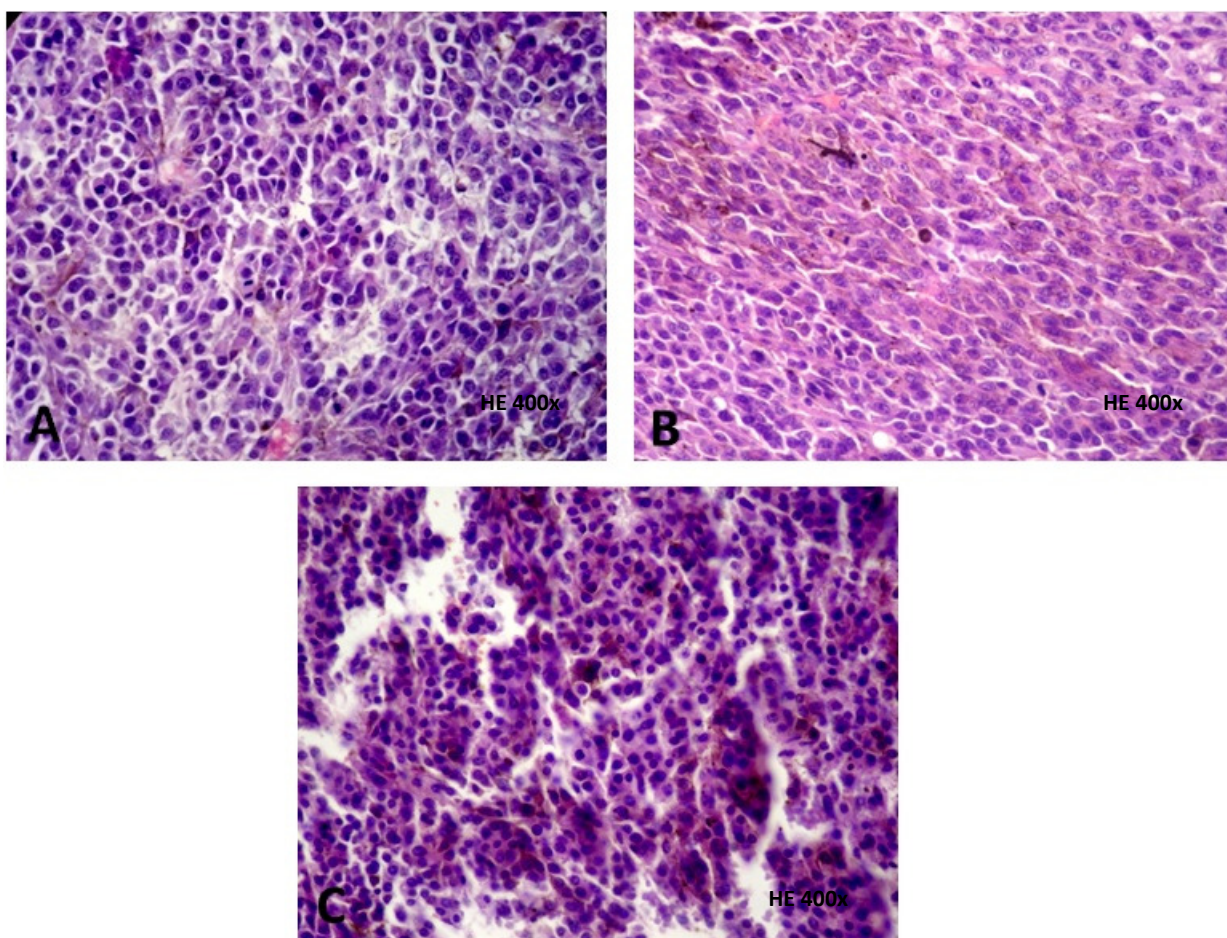
Com relação aos rins, as análises demonstraram moderada tumefação do epitélio tubular, glomérulos preservados e evidenciação dos capilares dos glomérulos no grupo controle. Já nos grupos tratados com SVHV, houve hemorragia glomerular e intersticial, presença cilindrohialinos e intensa tumefação celular do epitélio dos túbulos proximais. Essas alterações, entretanto, são passíveis de reversão (Figura 12).

Nas análises dos baços, os folículos linfóides estavam atrofícos e havia a presença de uma discreta polpa vermelha ao longo das amostras de todos os grupos (Figura 13).

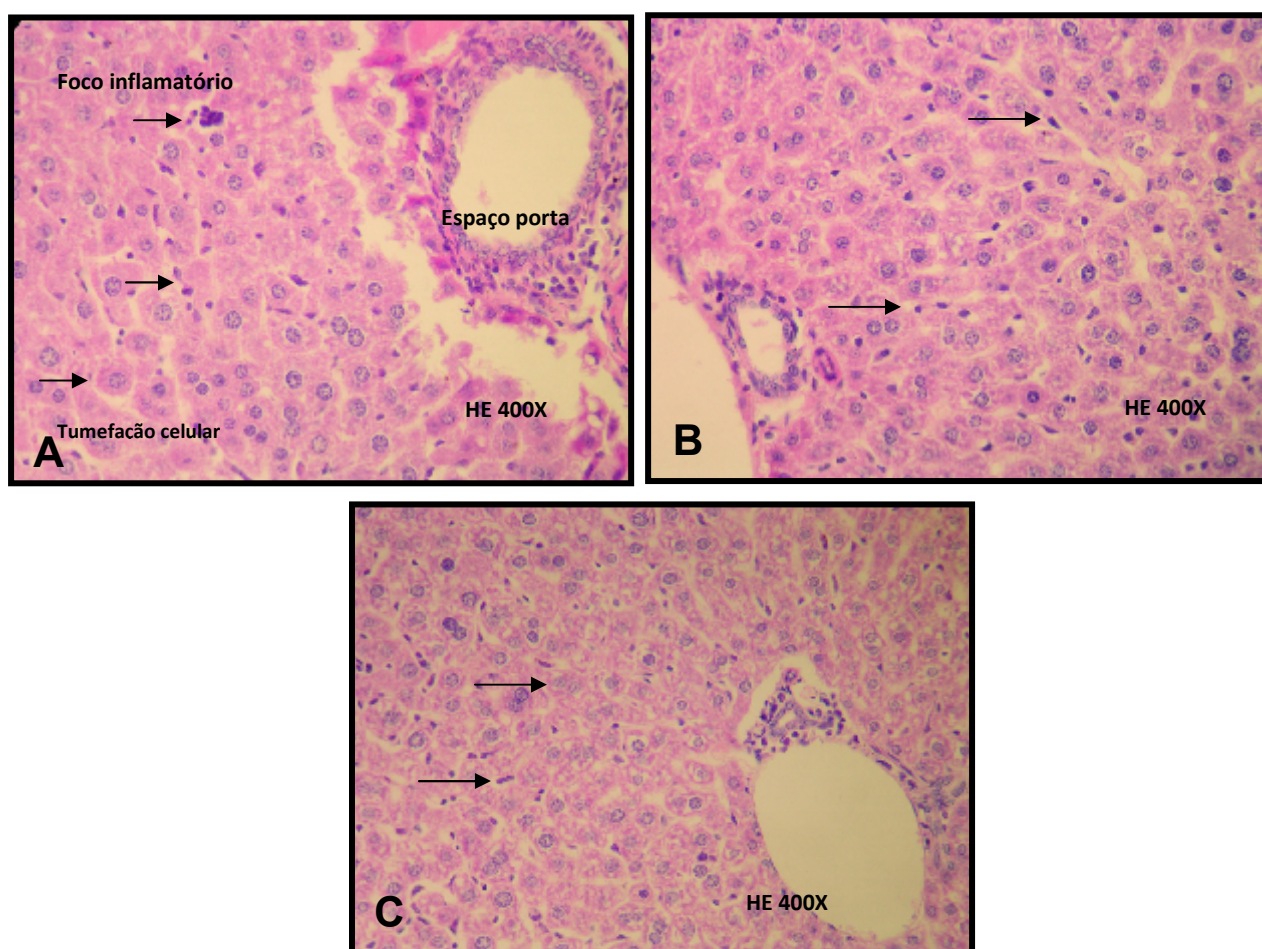
**Tabela 2** - Efeito do alginato isolado da alga *Sargassum vulgare* (SVHV) em camundongos *Mus musculus* C57BL/6 transplantados com melanoma B-16.

	<b>Droga</b>	<b>Dose (mg/kg/dia)</b>	<b>Fígado (g/100g peso corpóreo)</b>	<b>Baço (g/100g peso corpóreo)</b>	<b>Rins (g/100g peso corpóreo)</b>
<b>Animais saudáveis</b>	Salina	-	4,59 ± 0,19	0,35 ± 0,03	1,46 ± 0,05
<b>Animais transplantados com Melanoma B-16</b>	Salina	-	5,42 ± 0,39	0,52 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,10 ± 0,05 <sup>a</sup>
	SVHV ip	25	5,57 ± 0,10	0,47 ± 0,06	1,33 ± 0,14
	SVHV vo	25	4,52 ± 0,64	0,61 ± 0,04	0,98 ± 0,05

Dados apresentam a média ± E.P.M. a, ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo de animais saudáveis por ANOVA seguido por Newman-Keuls ( $n = 8$ ).

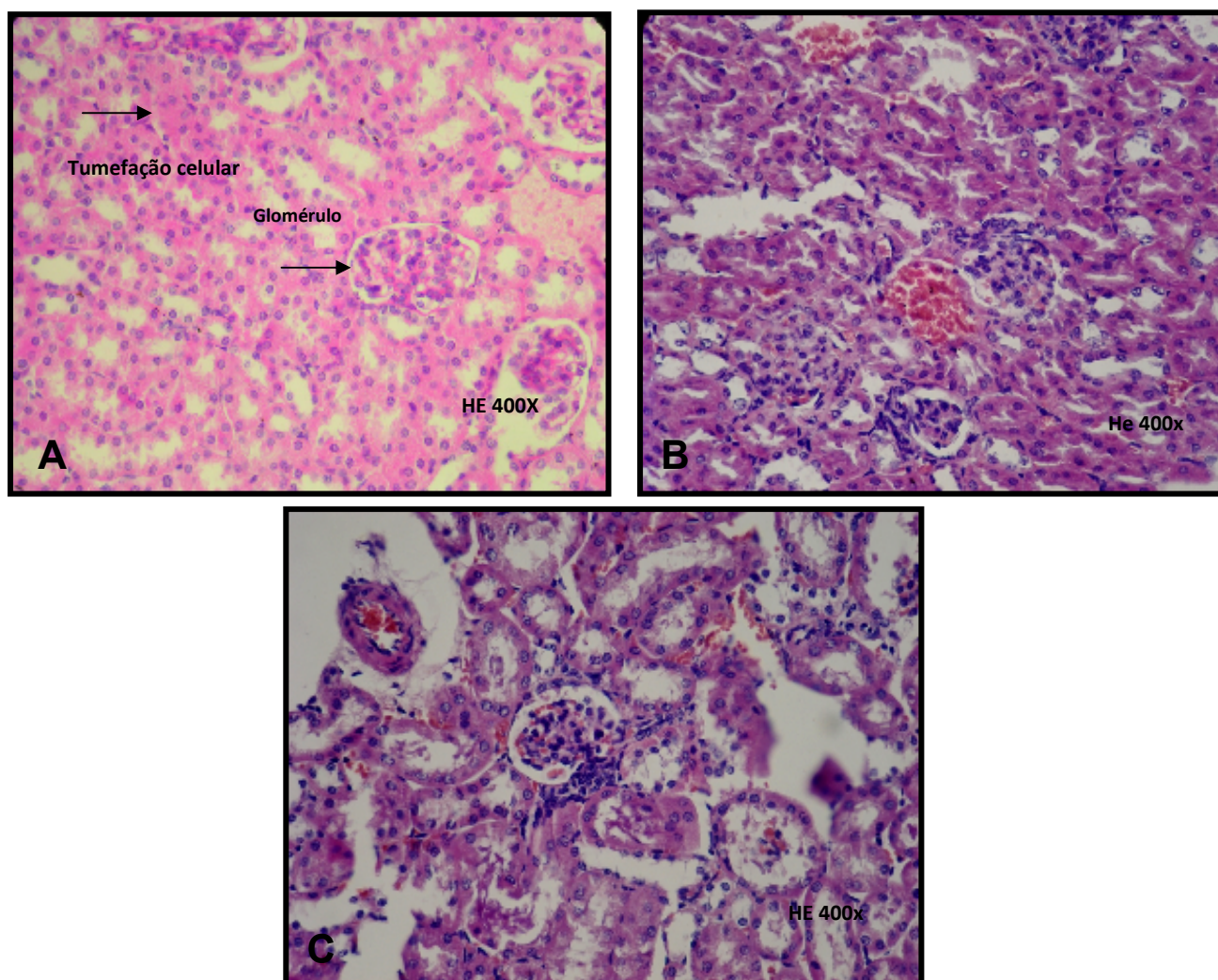


**Figura 10** - Microfotografias de cortes histológicos (400X) de tumores de camundongos *Mus musculus* C57BL/6 transplantedos com células tumorais de Melanoma B-16. A-grupo controle (salina); B- SVHV (25 mg/Kg/dia, i.p.); C- SVHV (25 mg/Kg/dia, v.o.).

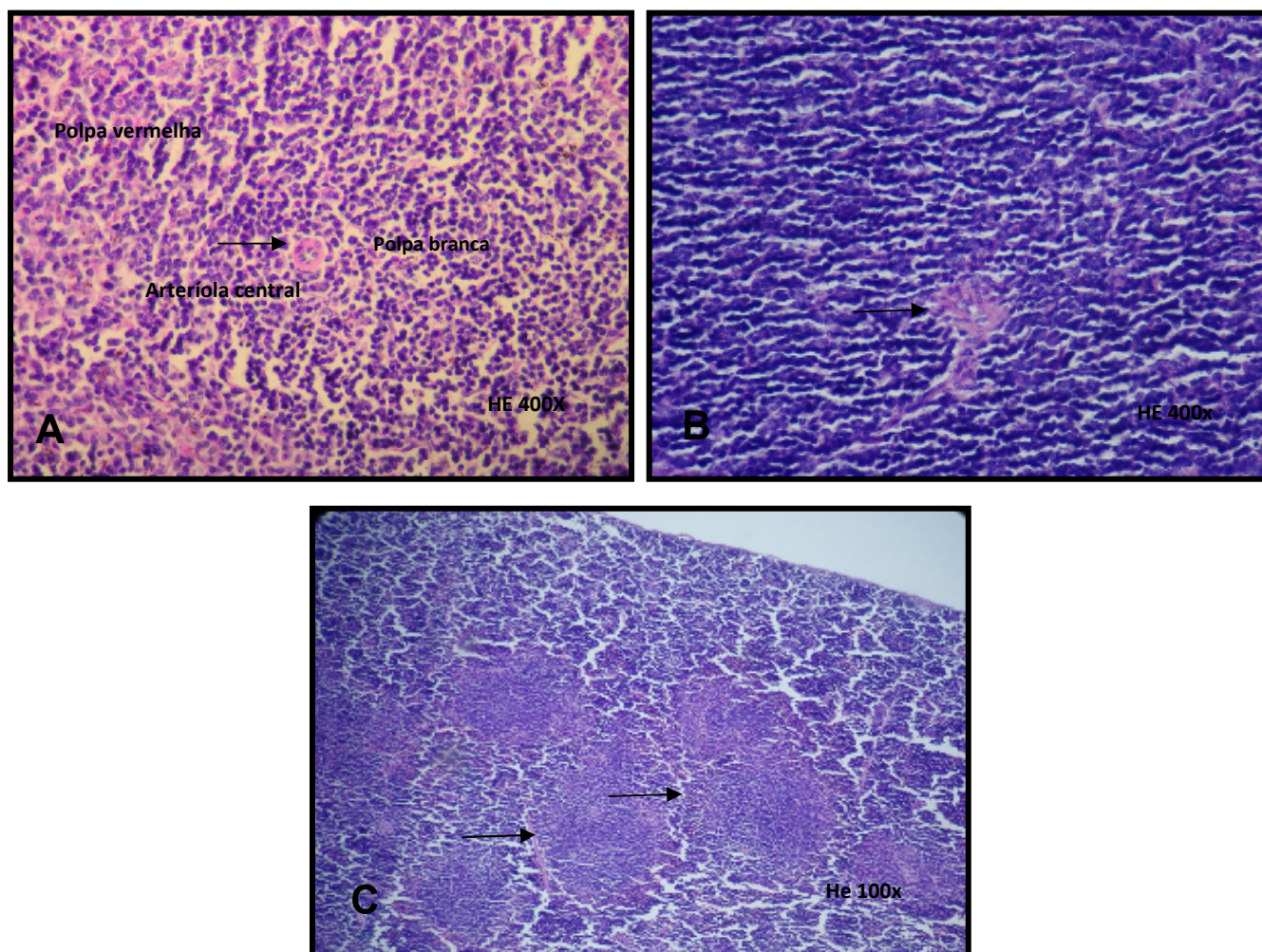


**Figura 11** - Microfotografias de cortes histológicos (400X) de fígados de camundongos *Mus musculus* C57BL/6 transplantedos com células tumorais de Melanoma B-16. A- grupo controle (salina); B- SVHV (25 mg/Kg/dia, i.p.); C- SVHV (25 mg/Kg/dia, v.o.).





**Figura 12** - Microfotografias de cortes histológicos (400X) de rins de camundongos *Mus musculus* C57BL/6 transplantados com células tumorais de Melanoma B-16. A- grupo controle (salina); B- SVHV (25 mg/Kg/dia, i.p.); C- SVHV (25 mg/Kg/dia, v.o.).



**Figura 13** - Microfotografias de cortes histológicos (400X) de baços de camundongos *Mus musculus* C57BL/6 transplantados com células tumorais de Melanoma B-16. A- grupo controle (salina); B- SVHV (25 mg/Kg/dia, i.p.); C- SVHV (25 mg/Kg/dia, v.o.).

#### 4.1.3. Determinação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos

Foi realizada a análise bioquímica do sangue dos camundongos transplantados com o tumor melanoma B-16 e observou-se que os animais tratados tanto pela via intraperitoneal como pela via oral com SVHV na dose de 25 mg/Kg/dia não apresentaram alterações nos níveis séricos do indicador de função renal analisado, a uréia, em relação ao grupo controle. Com relação à enzima hepática alanina aminotransferase (ALT), o grupo com tumor tratado com salina ( $268,3 \pm 20,4$  UI/L) e o grupo tratado com SVHV por via oral ( $263,0 \pm 37,8$  UI/L) apresentaram um aumento nos níveis séricos desta enzima ( $p < 0,05$ ), quando comparado com o grupo dos animais saudáveis ( $105,2 \pm 17,4$  UI/L), o que representa uma toxicidade hepática, e que não foi encontrado no grupo tratado com SVHV por via intraperitoneal. Não houve nenhuma alteração significativa em nenhum dos grupos analisados com relação à enzima aspartato transaminase (AST), como pode ser visto na Tabela 3.

A partir da análise hematológica (Tabela 4), observou-se que o número de plaquetas e de leucócitos totais não foi alterado em nenhum dos grupos ( $p > 0,05$ ). Na contagem diferencial, a porcentagem de neutrófilos foi aumentada no grupo com tumor tratado com salina e no grupo tratado com SVHV por via oral ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo dos animais saudáveis e a porcentagem de monócitos foi reduzida no grupo com tumor tratado com salina e no grupo tratado com SVHV pela via intraperitoneal ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 3-** Efeito do alginato isolado da alga *Sargassum vulgare* (SVHV) sobre os parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos *Mus musculus* C57BL/6 transplantados com Melanoma B-16. ALT = Alanina aminotransferase. AST = aspartato transaminase.

	Substância	Dose (mg/kg/dia)	Uréia (mg/dL)	ALT (UI/L)	AST (UI/L)
Animais saudáveis	Salina	-	47,7 ± 4,5	105,2 ± 17,4	33,2 ± 3,4
Animais transplantados com Melanoma B-16	Salina	-	44,5 ± 2,8	268,3 ± 20,4 <sup>a</sup>	32,0 ± 2,6
	SVHV i.p.	25	48,4 ± 1,0	210,0 ± 47,0	25,0 ± 4,5
	SVHV v.o.	25	46,0 ± 2,3	263,0 ± 37,8	35,2 ± 4,2

Os dados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni e correspondem à média ± E.P.M. de cinco animais. a,  $p < 0,05$  quando comparado com o grupo de animais saudáveis.

**Tabela 4** - Efeito do alginato isolado da alga *Sargassum vulgare* (SVHV) sobre as alterações hematológicas em sangue periférico de camundongos *Mus musculus* C57BL/6 transplantados com Melanoma B-16.

	Substância	Dose (mg/kg/dia)	Plaquetas (10 <sup>5</sup> cel./μL)	Leucócitos totais (10 <sup>3</sup> cel./μL)	Contagem diferencial (%)			
					Linfócitos	Neutrófilo	Monócito	Eosinófilo
Animais saudáveis	Salina	-	8,3 ± 0,6	8,0 ± 0,6	67,7	19,5	12,7	0,1
	Salina	-	6,4 ± 1,0	9,0 ± 0,6	60,3	32,0 <sup>a</sup>	7,2 <sup>a</sup>	0,5
	SVHV i.p.	25	6,6 ± 0,9	8,6 ± 0,9	67,0	27,2	5,2	0,6
Animais transplantados com Melanoma B-16	SVHV v.o.	25	6,9 ± 1,0	8,4 ± 0,7	60,4	31,6	7,8	0,2

Os dados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni e correspondem à média ± E.P.M. de cinco animais. a, p < 0,05 quando comparado com o grupo de animais saudáveis.

#### 4.2. Atividade citotóxica *in vitro*

O alginato SVHV isolado de *Sargassum vulgare* não apresentou atividade citotóxica *in vitro* contra as células da linhagem tumoral B-16 através do método do MTT até a maior concentração testada (50 µg/mL).

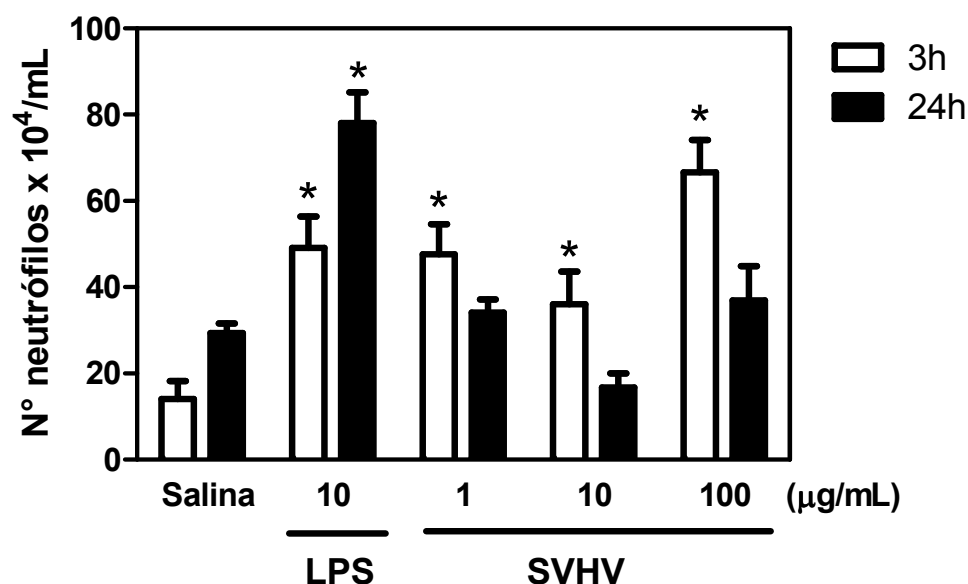
#### 4.3. Atividade imunoestimulatória

##### 4.3.1. Ativação de macrófagos *in vitro*

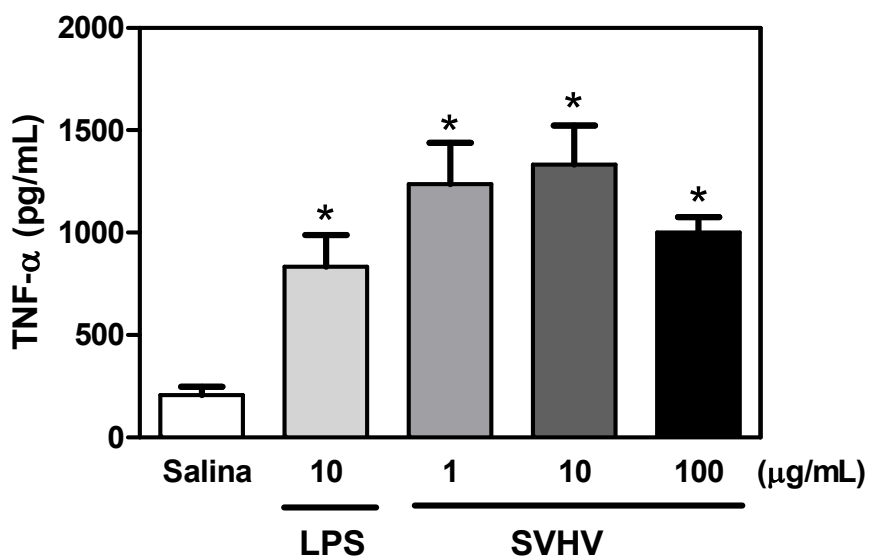
Macrófagos peritoneais foram retirados de camundongos *Mus musculus* C57BL/6 e incubados juntamente com salina, SVHV (1, 10 e 100 µg/mL) ou LPS (10 µg/mL) por um período de 3 e 24h. Após esse período o sobrenadante foi utilizado para o teste da indução de neutrófilos e detecção de citocinas.

O alginato SVHV foi capaz de ativar os macrófagos para induzirem a migração de neutrófilos ( $p < 0,05$ ) com 3 horas de incubação tanto na concentração de 1 µg/mL ( $47,59 \times 10^4$  células/mL), como na concentração de 10 µg/mL ( $36,05 \times 10^4$  células/mL) e de 100 µg/mL ( $66,62 \times 10^4$  células/mL), quando comparado com o grupo salina ( $14,0 \times 10^4$  células/mL). O controle positivo utilizado, LPS apresentou  $49,09 \times 10^4$  células/mL. Não houve migração de neutrófilos significativa pelo sobrenadante dos macrófagos incubados por 24h com SVHV em nenhuma das concentrações ( $p > 0,05$ ) (Figura 14).

Com relação à produção de citocinas, foi encontrada uma grande quantidade de TNF- $\alpha$  ( $p < 0,05$ ) no sobrenadante de macrófagos estimulados por SVHV nas concentrações de 1, 10 e 100 µg/mL (1237,0; 1332,0 e 1000,0 pg/mL, respectivamente) após 3 horas de incubação (Figura 15), mas não houve alterações nos níveis de TNF- $\alpha$  após o período de incubação dos macrófagos com o alginato durante 24 horas.



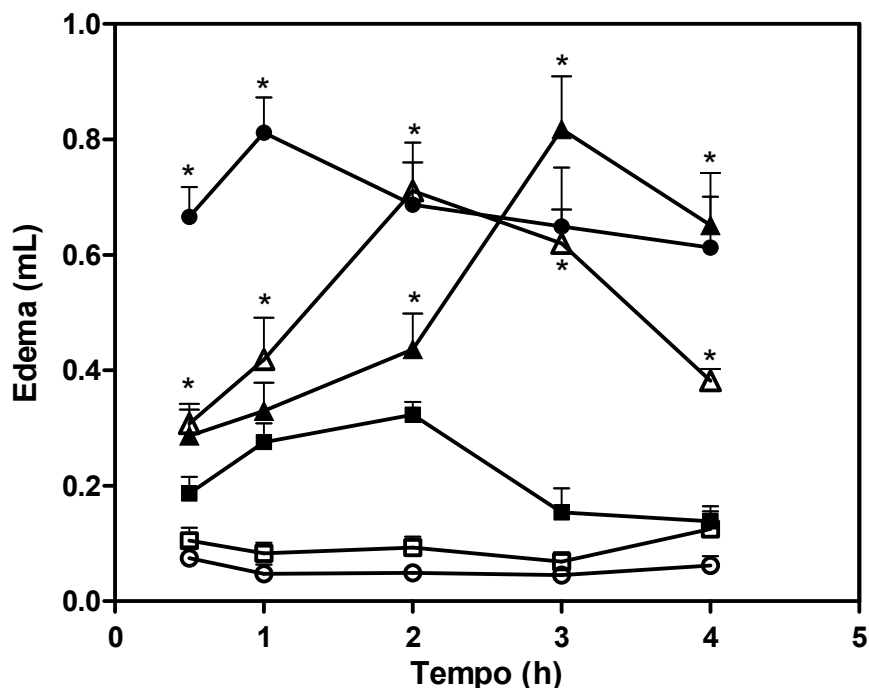
**Figura 14** – Indução da migração de neutrófilos peritoneais com sobrenadante de macrófagos isolados de camundongos *Mus musculus* C57BL/6 e estimulados *in vitro* com Salina, LPS (10 µg/mL) ou com o alginato isolado de *Sargassum vulgare* (SVHV; 1, 10 e 100 µg/mL) após 3 e 24 horas de incubação. Os dados apresentam a média ± E.P.M. \* ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo salina por ANOVA seguido por Newman-Keuls ( $n = 6$ ).



**Figura 15** – Dosagem de TNF- $\alpha$  em sobrenadante de macrófagos peritoneais de camundongos *Mus musculus* C57BL/6 estimulados *in vitro* com Salina, LPS (10 µg/mL) ou com o alginato isolado de *Sargassum vulgare* (SVHV; 1, 10 e 100 µg/mL) após 3 horas de incubação. Os dados apresentam a média ± E.P.M. \* ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo salina por ANOVA seguido por Newman-Keuls ( $n = 6$ ).

### 4.3.2. Atividade edematogênica

O teste do edema de pata foi realizado para avaliar a capacidade do alginato de induzir aumento de volume na pata traseira do animal, através da formação de edema. Os resultados revelaram que a administração de SVHV é capaz de causar formação de edema em ratos na dose de 1000  $\mu\text{g/pata}$  ( $p < 0,05$ ). O seu pico de ação acontece na 2ª hora ( $0,71 \pm 0,04 \text{ mL}$ ) e começa a diminuir a partir da 3ª hora após a sua administração. Os controles positivos utilizados, o dextran e a carragenana, têm seus picos de ação a partir da 1ª e 3ª hora respectivamente (Figura 16).

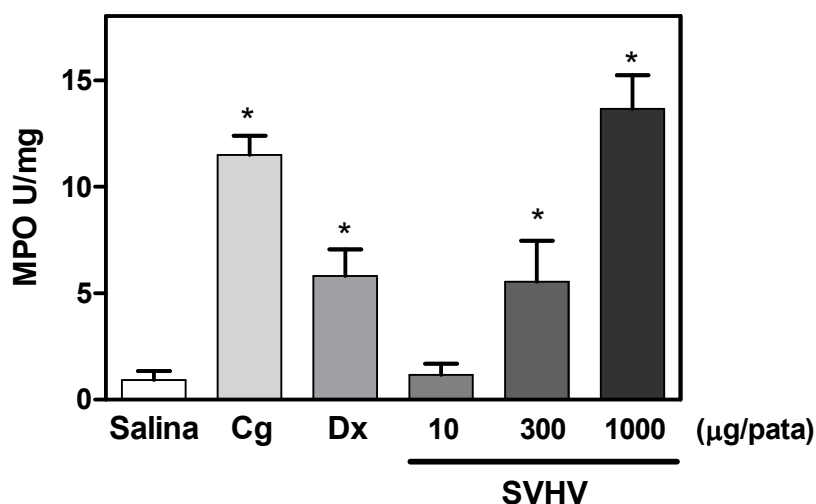


**Figura 16** - Efeito do alginato isolado de *Sargassum vulgare* (SVHV) sobre a formação de edema de pata em ratos. O controle negativo foi tratado com salina estéril (○), enquanto a carragenana (▲) e o dextran (●) foram usados como controle positivo na dose de 300  $\mu\text{g/pata}$ . SVHV foi administrado nas doses de 10  $\mu\text{g/pata}$  (□), 300  $\mu\text{g/pata}$  (■) e 1000  $\mu\text{g/pata}$  (△). Em seguida foi avaliado o volume do edema nos tempos de 30min, 1, 2, 3 e 4 horas. Os dados apresentam a média  $\pm$  E.P.M. \* ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo salina por ANOVA seguido por Newman-Keuls ( $n = 6$ ).



### 4.3.3. Atividade da Mieloperoxidase (MPO)

Após a realização do teste do edema de pata, foi dosada a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) como um indicativo indireto da infiltração de neutrófilos causado por SVHV (Figura 17). O alginato SVHV aumentou ( $p < 0,05$ ) a atividade da mieloperoxidase nas doses de 300  $\mu\text{g/pata}$  ( $5,5 \pm 1,9$  U/mg) e 1000  $\mu\text{g/pata}$  ( $13,7 \pm 1,5$  U/mg) com relação ao grupo salina ( $0,9 \pm 0,4$  U/mg), de forma dose-dependente. A carragenana e o dextran aumentaram para  $11,50 \pm 0,9$  e  $5,8 \pm 1,2$  U/mg, respectivamente ( $p < 0,05$ ).



**Figura 17** – Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em edema de pata causada por alginato isolado de *Sargassum vulgare* (SVHV) em ratos. O controle negativo foi tratado com salina estéril, enquanto a carragenana (Cg) foi usada como controle positivo na dose de 300  $\mu\text{g/pata}$  e o dextran (Dx) também na dose de 300  $\mu\text{g/pata}$ . SVHV foi administrado nas doses de 10, 300 e 1000  $\mu\text{g/pata}$ . Após a medição do volume do edema (4ª hora), os animais foram sacrificados e tiveram a pele da pata retirada para dosagem da atividade da enzima mieloperoxidase. Os dados apresentam a média  $\pm$  E.P.M. \* ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo salina por ANOVA seguido por Newman-Keuls ( $n = 6$ ).

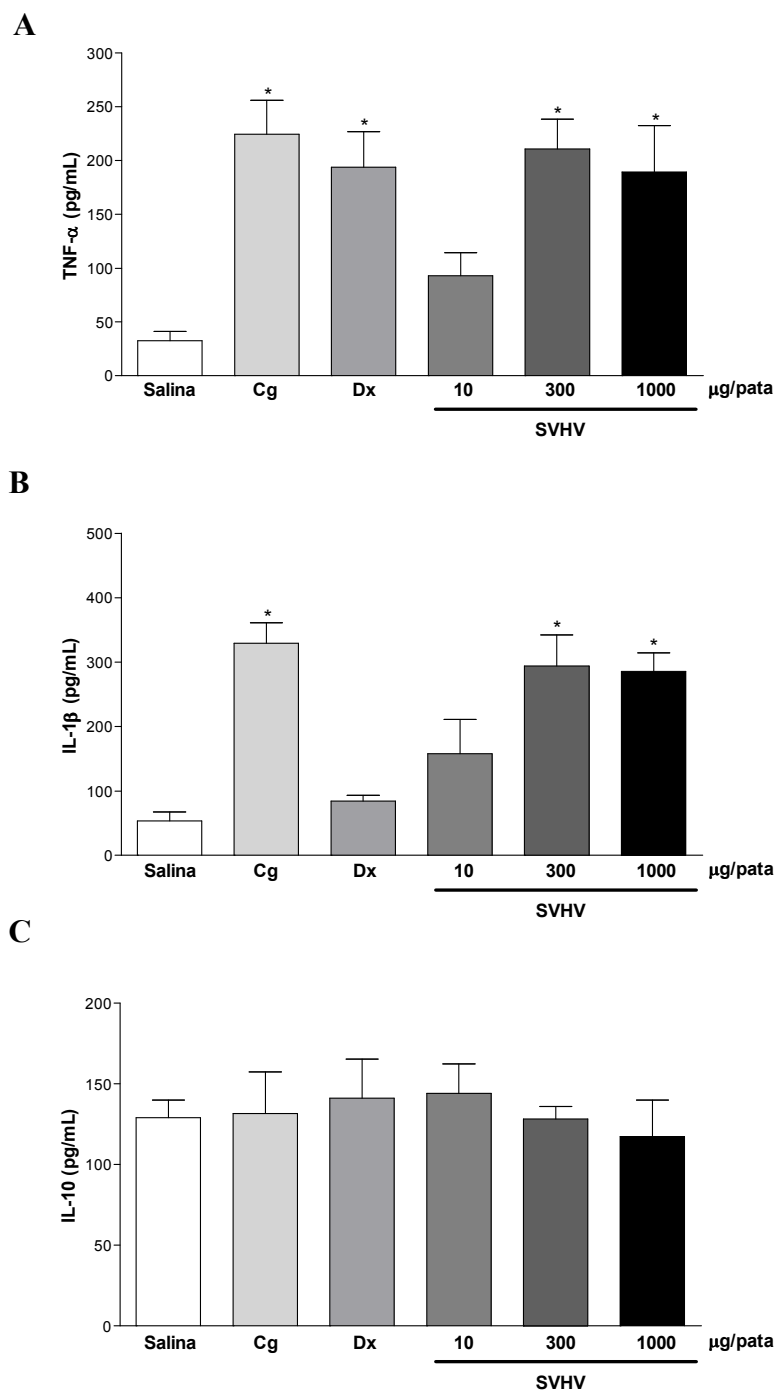
#### 4.3.4. Determinação de citocinas

Após a realização do teste do edema de pata, e sacrifício dos animais, uma parte da pele da pata foi retirada para a dosagem de citocinas presentes no edema.

Os níveis de TNF- $\alpha$  (Figura 18-A) no sobrenadante da pata dos animais aumentaram ( $p < 0,05$ ) após a injeção da carragenana ( $224,5 \pm 31,5$  pg/mL), do dextran ( $193,7 \pm 33,0$  pg/mL) e do SVHV nas doses de 300  $\mu$ g/pata ( $210,8 \pm 27,6$  pg/mL) e 1000  $\mu$ g/pata ( $189,5 \pm 42,8$  pg/mL) quando comparado com o grupo salina ( $32,5 \pm 8,7$  pg/mL).

Os níveis de IL-1 $\beta$  (Figura 18-B) no sobrenadante da pata dos animais também aumentaram ( $p < 0,05$ ) após a injeção de carragenana ( $329,5 \pm 31,7$  pg/mL) e de SVHV nas doses de 300  $\mu$ g/pata ( $294,1 \pm 47,8$  pg/mL) e 1000  $\mu$ g/pata ( $285,3 \pm 29,2$  pg/mL) quando comparado com o grupo salina ( $53,2 \pm 14,0$  pg/mL). Não houve aumento ( $p > 0,05$ ) nos níveis de IL-1 $\beta$  após a administração de dextran ( $84,5 \pm 8,3$  pg/mL).

Com relação aos níveis de IL-10 (Figura 18-C) no sobrenadante da pata dos animais não houve nenhuma diferença estatística entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

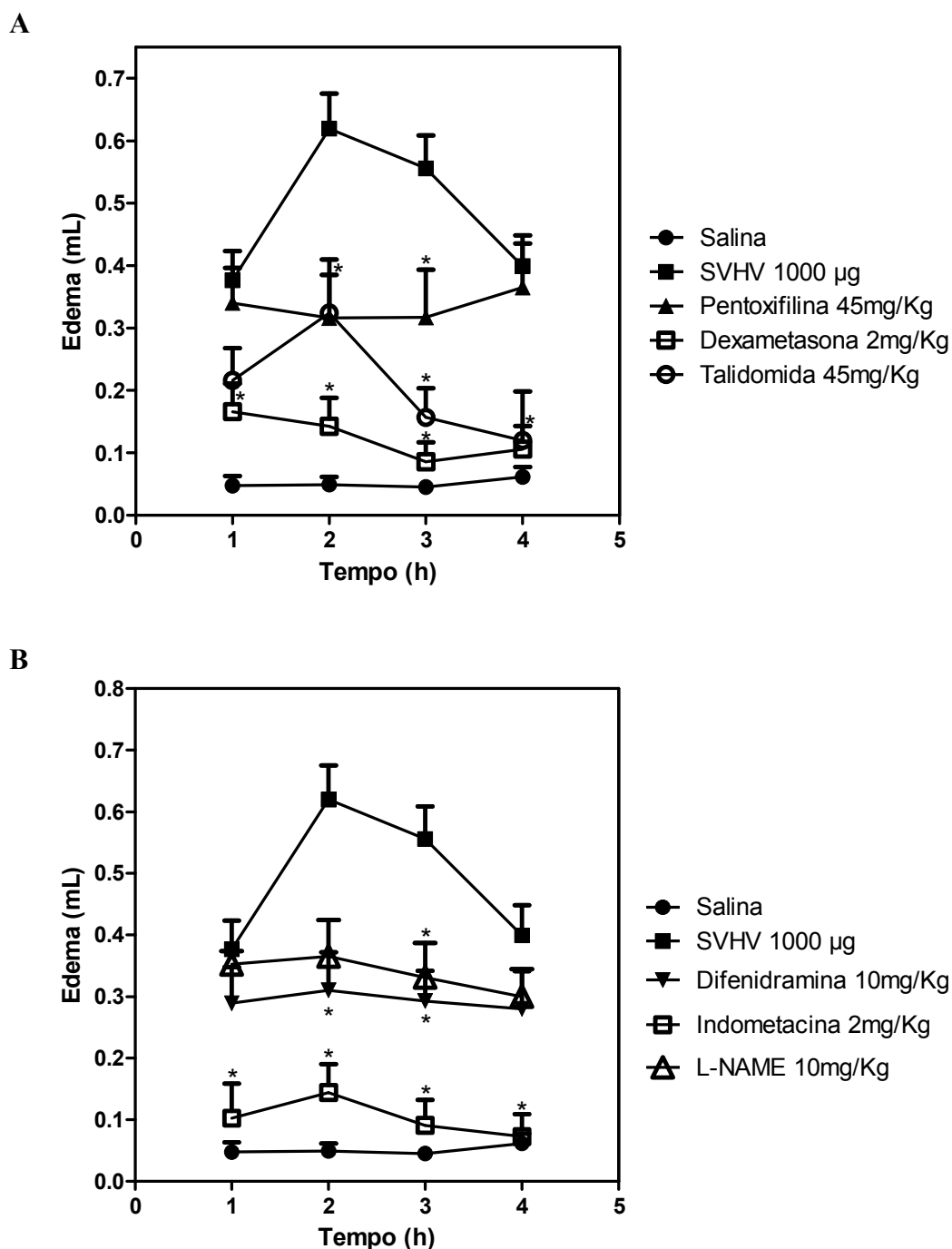


**Figura 18** – Dosagem de citocinas em edema de pata causado por alginato isolado de *Sargassum vulgare* (SVHV) em ratos. O controle negativo foi tratado com salina estéril, enquanto a carragenana (Cg) foi usada como controle positivo na dose de 300  $\mu\text{g/pata}$  e o dextran (Dx) também na dose de 300  $\mu\text{g/pata}$ . SVHV foi administrado nas doses de 10, 300 e 1000  $\mu\text{g/pata}$ . Após a medição do volume do edema, os animais foram sacrificados e tiveram a pele da pata retirada para dosagem de TNF- $\alpha$  (A), IL-1 $\beta$  (B) e IL-10 (C). Os dados apresentam a média  $\pm$  E.P.M. \* ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo salina por ANOVA seguido por Newman-Keuls ( $n = 6$ ).

#### **4.3.5. Efeito de moduladores farmacológicos no edema de pata**

Em outro grupo de experimentos, foram utilizados moduladores farmacológicos para avaliar quais mediadores inflamatórios estavam envolvidos no edema de pata causado por SVHV.

Como mostra a Figura 19, todos os moduladores foram capazes de inibir o edema causado por SVHV em alguma extensão. Porém, a Dexametasona (2 mg/Kg) e a Indometacina (2 mg/Kg), foram as substâncias mais eficientes, inibindo a atividade do SVHV no seu pico de 2h em 86% e 78%, respectivamente ( $p < 0,05$ ).

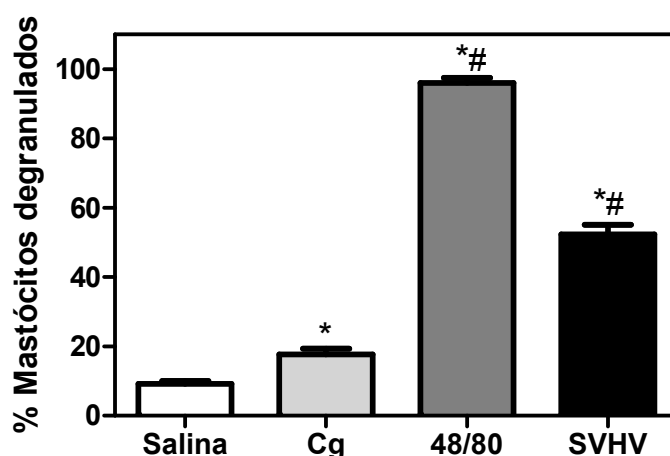


**Figura 19** – Efeito de moduladores farmacológicos no edema de pata causado por alginato isolado de *Sargassum vulgare* (SVHV). Ratos foram pré-tratados com salina, indometacina (2 mg/kg, s.c.); dexametasona (2 mg/kg, s.c.), talidomida (45 mg/kg, s.c.), difenidramina (10 mg/kg, i.p.), pentoxifilina (45 mg/kg, i.p.) e L-NAME (10 mg/kg, i.p.) antes da administração subcutânea de SVHV (1000 µg/pata). Os dados apresentam a média ± E.P.M. \* ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo SVHV por ANOVA seguido por Newman-Keuls ( $n = 6$ ).

#### 4.3.6. Efeito de SVHV na degranulação de mastócitos peritoneais

Após a observação da inibição do edema causado por SVHV em ratos através do uso da Difenidramina, foi avaliada a capacidade de SVHV degranular mastócitos peritoneais.

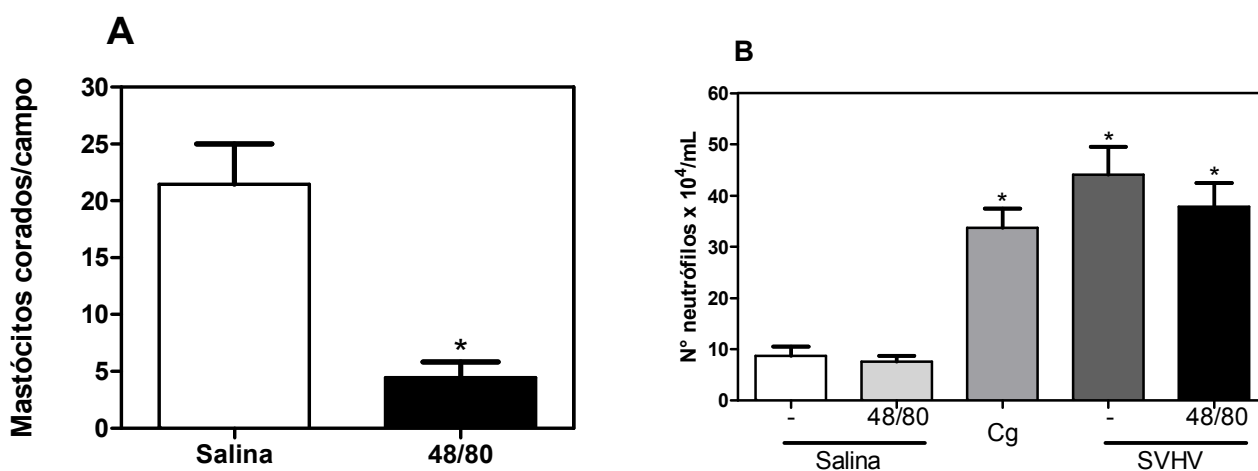
O alginato SVHV degranulou de forma significativa ( $p < 0,05$ ) a população de mastócitos presentes na cavidade peritoneal dos ratos ( $52,3 \pm 2,8\%$ ) quando comparado com os animais controles ( $9,2 \pm 0,8\%$ ) e os animais tratados com carragenana ( $17,7 \pm 1,7\%$ ). O controle positivo, o composto 48/80, foi capaz de degranular  $96,0 \pm 1,5\%$  dos mastócitos (Figura 20).



**Figura 20** – Efeito do alginato isolado de *Sargassum vulgare* (SVHV) em degranulação de mastócitos peritoneais. Os ratos foram tratados i.p. com salina, carragenana (Cg, 500  $\mu$ g), composto 48/80 (0,6 mg/kg), ou SVHV (1 mg). A população de mastócitos no mesentério foi estimada após 30 min, através da contagem das células degranuladas e coradas com azul de toluidina. Os dados apresentam a média  $\pm$  E.P.M. \* ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo salina e # ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo carragenana por ANOVA seguido por Newman-Keuls ( $n = 6$ ).

#### 4.3.7. Avaliação do papel dos mastócitos peritoneais na migração de neutrófilos induzida por SVHV.

O papel dos mastócitos na migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por SVHV foi investigado através da depleção da população de mastócitos com o composto 48/80. De acordo com a Figura 21-A, o tratamento com o composto 48/80 reduziu em 80% a população de mastócitos, quando comparada com o grupo salina ( $p < 0,05$ ). A injeção intraperitoneal de SVHV (1000  $\mu\text{g}$ ) induziu uma forte migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal dos ratos, independentemente do pré- tratamento com o composto 48/80 (Figura 21-B). Quando comparado com o grupo não-tratado ( $44,1 \times 10^4$  neutrófilos/mL), a migração de neutrófilos induzida por SVHV foi apenas levemente reduzida no grupo com os mastócitos depletados ( $38,8 \times 10^4$  neutrófilos/mL), mas sem significância estatística ( $p > 0,05$ ).

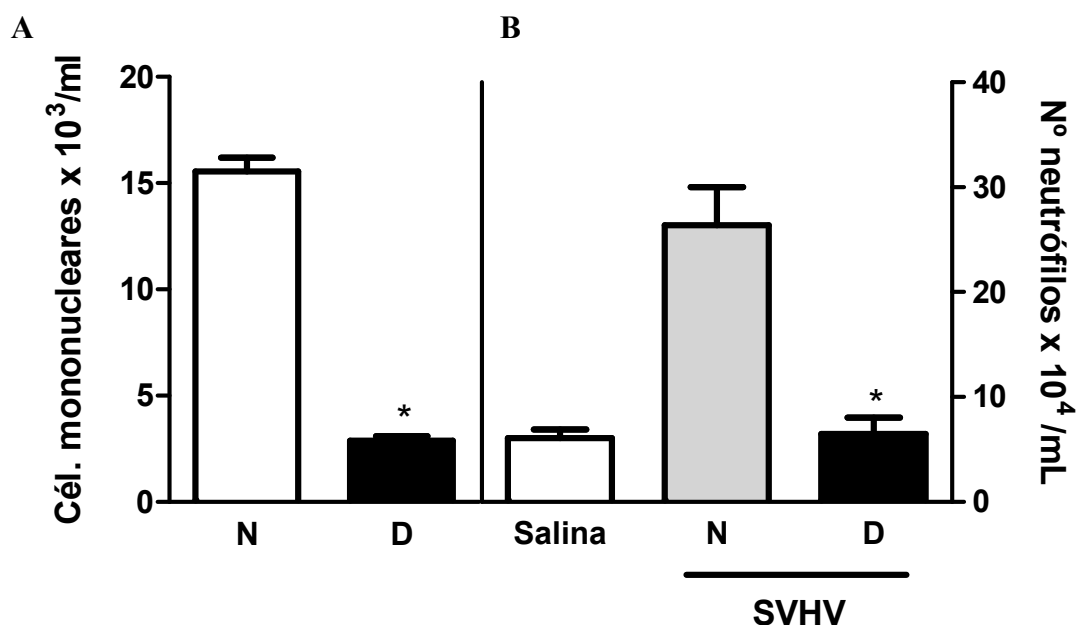


**Figura 21** – Papel de mastócitos na migração de neutrófilos induzida por alginato isolado de *Sargassum vulgare* (SVHV). Os ratos tiveram a população de mastócitos depletada através de um tratamento sub-crônico com o composto 48/80 durante quatro dias (0,6 mg/kg, duas vezes por dia durante 3 dias e 1,2 mg/kg duas vezes no quarto dia). A- população de mastócitos peritoneais em animais tratados com salina ou composto 48/80. B- migração de neutrófilos induzida por salina, carragenana (Cg, 300  $\mu\text{g}$ ) ou SVHV (1000  $\mu\text{g}$ ). Os dados apresentam a média  $\pm$  E.P.M. \* ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo salina por ANOVA seguido por Newman-Keuls ( $n = 6$ ).

#### 4.3.8. Avaliação do papel dos macrófagos peritoneais na migração de neutrófilos induzida por SVHV.

O papel dos macrófagos peritoneais na migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por SVHV foi investigado através da depleção da população de macrófagos após lavagem do peritônio.

De acordo com a Figura 22-A, a lavagem peritoneal reduziu a população de macrófagos residentes em 81,5% quando comparado com o grupo não-depletado ( $p < 0,05$ ). Esta depleção de macrófagos foi capaz de reduzir a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por SVHV em 75,4% ( $p < 0,05$ ), quando comparada com o grupo que não foi depletado (Figura 22-B).



**Figura 22** – Papel de macrófagos residentes na migração de neutrófilos induzida por alginato isolado de *Sargassum vulgare* (SVHV). Os ratos tiveram a população de macrófagos peritoneais depletada através de uma lavagem peritoneal. Para a confirmação, o número de macrófagos foi estimado 30 min após a lavagem, através da contagem das células mononucleadas retiradas da cavidade peritoneal dos animais depletados (D) ou que não passaram pela depleção (N), Figura 22-A. A migração de neutrófilos foi então induzida por SVHV (1 mg) tanto nos animais depletados como nos animais não-depletados (Figura 22-B). Os dados apresentam a média  $\pm$  E.P.M. \* ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo não-depletado por ANOVA seguido por Newman-Keuls ( $n = 6$ ).



*Discussão*

## 5. DISCUSSÃO

O potencial de algas marinhas como fonte de substâncias bioativas é um campo ainda pouco explorado. Apenas a partir da década de 80 é que se tem começado a estudar as algas em busca de compostos com atividades biológicas e propriedades farmacológicas (SMIT, 2004). Os polissacarídeos isolados de algas têm atraído uma grande atenção na área biomédica devido à ampla variedade de propriedades terapêuticas apresentadas aliadas à relativa baixa toxicidade (TZIANABOS, 2000). Neste trabalho foi estudado o alginato isolado da alga *Sargassum vulgare* C. Agardth (SVHV), uma alga ainda pouco estudada, porém presente em boa parte do litoral brasileiro.

Uma forma de buscar novas substâncias com propriedades antitumorais é através de *screening* com modelos *in vitro*. Neles são determinados a citotoxicidade das substâncias de forma rápida e eficaz (CRAGG & NEWMANN, 2000). Neste contexto, os testes em linhagens celulares humanas substituíram os ensaios com células leucêmicas *in vivo*, mostrando mais rapidez, economia e reprodutibilidade (FORNELLI *et al.*, 2004; SHOEMAKER *et al.*, 1984; VENDITI, 1983). Entretanto, aqueles compostos com mecanismos de ação dependente do hospedeiro ou que sofrem processos de metabolização não são detectados nesses testes.

As análises *in vitro* foram realizadas para avaliar o efeito antiproliferativo de SVHV sobre a linhagem tumoral B-16. No teste *in vitro*, os resultados demonstraram que o alginato não apresentou atividade citotóxica direta sobre as células tumorais nas concentrações testadas, obtendo um  $CI_{50}$  maior do que 50 $\mu$ g/mL.

A ausência de citotoxicidade em modelos *in vitro* nos estudos com macromoléculas, incluindo os polissacarídeos, é comum na literatura. Entretanto, estudos têm demonstrado que, quando administrados no animal, muitos deles são capazes de inibir o crescimento tumoral (OOI & LIU, 2000; ZHOU *et al.*, 2004). Pode-se citar como exemplo, um polissacarídeo isolado do fungo *Ganoderma lucidum*, que não foi capaz de impedir a proliferação do tumor *in vitro*, mas quando administrado no animal com Sarcoma 180, foi capaz de inibir até 61,88% na maior dose utilizada, de 200 mg/kg (CAO & LIN, 2004). Já foi demonstrado que ambos os alginatos isolados da alga *Sargassum vulgare* (SVLV e SVHV) apresentam potente atividade antitumoral em modelo murino de sarcoma 180, tanto quando administrados por via intraperitoneal, como por via oral, a qual apresentou uma inibição pelo

alginate SVHV de 66,2% para a dose de 50 mg/m<sup>2</sup>/dia e de 88,8% na dose de 100 mg/m<sup>2</sup>/dia (SOUSA *et al.*, 2007).

No presente estudo foram feitas análises antitumoral *in vivo* utilizando-se o modelo experimental do Melanoma B-16. Os melanomas são tumores bastante agressivos e apresentam elevado potencial metastático (FANG *et al.*, 2008). A linhagem de células murino B-16 é pouco imunogênica e os melanomas de uma forma geral apresentam baixos índices de resposta às imunoterapias utilizadas atualmente (BUHTOJAROV *et al.*, 2006; FANG *et al.*, 2008).

O tratamento com SVHV na dose de 25 mg/Kg/dia por via intraperitoneal inibiu significativamente o tumor Melanoma B-16 transplantado nos camundongos, reduzindo o volume tumoral já a partir do 11º dia e causando uma inibição de 75,8% na massa úmida do tumor. Sousa *et al.* (2007) estudando o mesmo alginato em modelo tumoral de Sarcoma 180 verificou uma ação também por via oral para este modelo, sendo a atividade ainda maior do que quando o alginato era administrado por via intraperitoneal.

Muitos polissacarídeos isolados de algas marinhas têm apresentado atividade antitumoral em modelos experimentais (COOMBE *et al.*, 1987; KAEFFER *et al.*, 1999; MARUYAMA *et al.*, 1987; SAITO *et al.*, 1992). Zhou *et al.* (2004) fizeram experimentos com uma galactana sulfatada isolada da alga vermelha *Condrus ocellatus*, a  $\lambda$ -carragenana, e observaram que amostras com diferentes pesos moleculares apresentavam atividade antitumoral em tumor Sarcoma 180. Esta era baixa quando a carragenana estava isolada (32% de inibição do tumor), mesmo que em altas doses (100mg/Kg/dia), porém aumentava quando em associação com o 5-FU, chegando a ter uma inibição de 63,8% na dose de 100mg/Kg/dia de carragenana associada a 25mg/Kg/dia de 5-FU. Esta galactana também foi capaz de melhorar a imunocompetência de animais tratados com o 5-FU. Esta capacidade foi avaliada através do aumento no peso do baço e nos níveis de TNF- $\alpha$  nos camundongos transplantados com o tumor.

Outro estudo demonstrou que um polissacarídeo sulfatado, fucana, isolado de *Sargassum thunbergii*, também foi capaz de inibir de forma significativa o número de metástases de pulmão em camundongos transplantados com carcinoma de Lewis, através dos seus efeitos imunomodulatórios (ITOH *et al.*, 1995).

Alguns trabalhos apontam para o uso de polissacarídeos capazes de inibir o tumor Melanoma em modelos *in vivo*. Polissacarídeos isolados de *Cordyceps militaris* suprimiram o

crescimento de melanoma transplantado em camundongos C57BL/6, além de ativar macrófagos peritoneais e da linhagem RAW264.7, provavelmente pela via NF- $\kappa$ B. Da mesma forma que neste trabalho, o polissacarídeo isolado de *Cordyceps militaris* não apresentou nenhuma toxicidade nos testes *in vitro* contra as células tumorais (LEE & HONG, 2011).

Polissacarídeos isolados de *Inonotus obliquus* foram administrados por via oral em camundongos com o tumor Melanoma e foi observado que o tratamento com o polissacarídeo 3 dias antes da inoculação do tumor foi eficiente em reduzi-lo, mas o tratamento após a inoculação do tumor não tinha o mesmo efeito. Estes polissacarídeos foram capazes de ativar macrófagos, sugerindo o potencial imunomodulador destes agentes na prevenção do tumor (WON *et al.*, 2011). Isto pode explicar o motivo pelo qual o SVHV não foi capaz de inibir o tumor Melanoma quando administrado por via oral no presente trabalho, já que o tratamento foi iniciado após a inoculação do tumor nos animais.

Dias *et al.*, em 2005, descreveram a atividade antitumoral de um polissacarídeo isolado da alga marrom *Sargassum stenophyllum*, que possui a capacidade de diminuir em até 80% os tumores Melanoma injetados em camundongos, assim como apresentar atividade antiangiogênica em modelos experimentais, porém sem nenhum sinal evidente de toxicidade.

Um dos grandes problemas enfrentados pela indústria farmacêutica que dificultam o desenvolvimento de novos fármacos é a toxicidade da molécula. Há uma busca constante por compostos químicos com potencial citotóxico específico para células tumorais e que não apresentem toxicidade também para células não neoplásicas. Muitas drogas contra o câncer possuem consideráveis efeitos colaterais e, portanto, um uso clínico limitado (OOI & LIU, 2000).

A fim de avaliar a toxicidade de SVHV em camundongos, foi realizado estudo macroscópico e microscópico dos fígados, rins e baços dos animais inoculados com Melanoma B-16 e tratados com SVHV, além de análises bioquímicas e hematológicas. As análises histopatológicas dos fígados revelaram a presença de alterações nos grupos tratados com SVHV, representadas por tumefação dos hepatócitos, hiperplasia das células de Kupffer, focos inflamatórios e algumas raras áreas de hemorragias. O mesmo foi encontrado no grupo controle.

A análise bioquímica da enzima hepática alanina aminotransferase (ALT), revelou que os grupos dos animais saudáveis e dos animais tratados com SVHV por via intraperitoneal apresentavam níveis normais, enquanto que os animais inoculados com o tumor sem o tratamento ou que foram tratados com SVHV por via oral apresentaram um aumento nos

níveis desta enzima. Esta enzima está localizada no citoplasma, e a enzima aspartato transaminase (AST), que está localizada no núcleo celular apresentou níveis normais, o que caracteriza uma toxicidade hepática leve nestes animais. Um grande número de compostos químicos de diferentes classes e com variadas atividades farmacológicas levam a importantes lesões hepáticas (SCHEUER & LEFKOWITCH, 2000). Apesar disso, o fígado possui uma grande capacidade adaptativa e regenerativa. As modificações observadas nos animais tratados com o SVHV são consideradas reversíveis, já que o tecido intersticial estava preservado.

Com relação ao rim, um nível elevado de imunoglobulinas no plasma pode estar relacionado com uma deposição de agregados de imunoglobulinas no rim e assim, com uma nefrotoxicidade caracterizada por glomerulonefrite e alterações morfológicas compatíveis com nefrose osmótica (DEMEULE *et al.*, 2006; LEVY & PUSEY, 2000; ORBACH *et al.*, 2004). De acordo com a literatura, estes níveis só são atingidos em alguns pacientes que receberam infusões de imunoglobulinas. Nesses casos, o glomérulo parece ser o alvo principal dos danos renais (LEVY & PUSEY, 2000; ORBACH *et al.*, 2004).

No presente estudo, a análise histopatológica dos rins demonstrou moderada tumefação do epitélio tubular, glomérulos preservados e evidenciação dos capilares dos glomérulos no grupo controle. Já nos grupos tratados com SVHV, houve hemorragia glomerular e intersticial, presença cilindrohialinos e intensa tumefação celular do epitélio dos túbulos proximais. Entretanto, a estrutura dos glomérulos estava preservada. Além disso, as alterações morfológicas encontradas foram diferentes das que estão associadas com a nefrotoxicidade causada por agregados de imunoglobulinas.

De acordo com Olsen & Solez (1994), pode ocorrer necrose do epitélio tubular renal como consequência da administração de diversas classes químicas, mas mesmo se houver um grande dano celular, a regeneração depende da integridade dos tecidos intersticiais. Sousa *et al.* (2007) demonstrou que alginatos isolados de *S. vulgare* também induziram necrose do epitélio tubular renal em animais experimentais, porém como observou-se uma preservação do tecido intersticial, com ausência de edema ou infiltração de linfócitos, há uma possibilidade de regeneração do dano, sendo então essas alterações também consideradas passíveis de reversão (CURRAN, 1990; OLSEN & SOLEZ, 1994).

No presente estudo, os níveis de creatinina e uréia, índices que podem indicar uma possível insuficiência renal não foram alterados após o tratamento com SVHV. Todavia, os

níveis de uréia no sangue só são alterados após um longo período de danos renais, o que pode explicar o porquê do tratamento com SVHV não ter causado nenhuma alteração nos níveis de uréia.

Em 2008, Sousa *et al.*, estudou mais profundamente os efeitos de SVHV em um sistema de perfusão renal. O alginato causou um aumento na pressão de perfusão e na resistência vascular renal, o que estaria relacionado a um efeito vascular direto. Isto foi confirmado pelo efeito vasoconstrictor induzido pelos alginatos no leito vascular mesentérico.

Martins *et al.* (2003) demonstraram que os componentes do sobrenadante de macrófagos ativados pelo veneno da *Crotalus durissus cascavella* possuem efeitos nefrotóxicos *in vitro*, tais como aumento da pressão de perfusão, da taxa de filtração glomerular, fluxo urinário e diminuição do transporte tubular e proximal de sódio. Dentre os componentes com atividade nefrotóxica liberado a partir de macrófagos destaca-se os efeitos promovidos pela fosfolipase A2 e ciclooxigenase. Estas sintetizam mediadores inflamatórios originados do ácido araquidônico, bem como a liberação de citocinas, principalmente o TNF- $\alpha$ .

Os resultados obtidos no teste da perfusão renal poderiam ser devido à liberação de mediadores inflamatórios vasoativos por células mesangiais do endotélio. Estudos comprovam que citocinas, prostanglandinas, frações de complemento e fator ativador de plaquetas podem ser liberados por células renais (HAVT *et al.*, 2001). Os dados aqui apresentados mostram que o SVHV, de fato, estimula macrófagos isolados da cavidade peritoneal, o que leva à possibilidade deste mecanismo estar associado às alterações da função renal observadas.

A inoculação do tumor causa por si só uma reação leucemóide em animais experimentais, a qual é caracterizada por granulocitose e esplenomegalia (KODAMA *et al.*, 1974; OKAWA *et al.*, 1992; SATO *et al.*, 2005). No presente trabalho, os animais que foram inoculados com o tumor Melanoma B-16 apresentaram um aumento do peso do baço, acompanhado por um aumento do número de granulócitos e redução no número de monócitos. De acordo com Okawa *et al.* (1992), pode-se observar um aumento da resistência do hospedeiro a infecções por fungos em animais transplantados com tumor, e o tratamento do câncer com a quimioterapia é que causa a supressão da resposta imune observada nos pacientes. Nas análises histopatológicas dos baços, os folículos linfóides estavam atróficos e havia a presença de uma discreta polpa vermelha ao longo das amostras de todos os grupos.

Muitas propriedades dos polissacarídeos modificadores da resposta biológica ainda não têm um mecanismo completamente conhecido, porém acredita-se que os mecanismos pelos quais os polissacarídeos vegetais exerçam seus efeitos terapêuticos benéficos sejam através da potenciação da defesa do hospedeiro, induzindo uma melhora na sua imunidade (SCHEPETKIN & QUINN, 2006). Tem sido sugerido que os polissacarídeos isolados de algas também atuam dessa maneira, agindo como modificadores da resposta biológica. Eles estariam envolvidos na ativação de várias células, como macrófagos, neutrófilos, células T e células NK (LEUNG *et al.*, 2006). Além disso, muitos quimioterápicos utilizados atualmente na clínica, inclusive o 5-FU são imunossupressores (TAKAGUCHI *et al.*, 2001).

Como os resultados dos testes *in vitro* foram negativos, demonstrando que este polissacarídeo não possui uma atividade citotóxica direta, é provável que a atividade antitumoral deste polissacarídeo não esteja relacionada com um efeito antiproliferativo diretamente nas células tumorais, mas que seja mediada pelo hospedeiro.

A fim de avaliar os efeitos imunoestimulantes de SVHV, foram feitos experimentos *in vitro* e *in vivo*. Inicialmente, macrófagos isolados da cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6 foram incubados com SVHV e o sobrenadante destes macrófagos, após 3 horas de incubação, foi capaz de induzir a migração de neutrófilos em camundongos. Também foi encontrada uma elevada quantidade de TNF- $\alpha$  presente neste sobrenadante, o que poderia ser o responsável pela migração de neutrófilos induzida. Diversos estudos mostram que esta potente citocina possui múltiplos efeitos, incluindo a ativação de células inflamatórias, indução de diversas proteínas inflamatórias, citotoxicidade, etc. Ela é capaz de causar a migração de neutrófilos, através de mecanismos indiretos, como a indução da liberação de fatores quimiotáticos pelos macrófagos que atraem os neutrófilos (FELDMANN & SAKLATVALA, 2001; HADDAD, 2002; HOPKINS, 2003).

Em vários estudos utilizando animais experimentais, foi demonstrado que extratos de algas marinhas apresentam compostos biologicamente ativos envolvidos com a resposta imune através do aumento da atividade fagocítica e secretória de macrófagos e indução da produção de ROS, NO e citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6) (OKAI *et al.*, 1997; YOSHIZAWA *et al.*, 1996). Entretanto, não se sabe muito sobre os mecanismos moleculares desta ativação por polissacarídeos.

Os mecanismos de ação de cada polissacarídeo e os seus sítios de ligação podem variar. Assim, os efeitos destes compostos podem estar envolvidos com diferentes tipos de

células, como as células hematopoiéticas, o sistema imune inato ou adquirido ou também as diversas vias de sinalização ou de liberação de citocinas.

Em 1999, Shan *et al.* demonstraram que extratos de algas marinhas estimulam a proliferação *in vitro* de linfócitos T do sangue periférico, aumentam a atividade dos linfócitos T citotóxicos contra células tumorais e a produção de imunoglobulinas pelas células B, bem como estimulam a liberação de TNF a partir de monócitos humanos e murinos. O fracionamento realizado posteriormente demonstrou que os compostos bioativos não eram de natureza protéica, mas que polissacarídeos estavam relacionados com a potencialização da resposta imunológica.

Pugh & Pasco, em 2001, isolaram polissacarídeos da alga *Aphanizomenon flos-aquae* e verificaram que eles ativavam o fator de transcrição nuclear (NF- $\kappa$ B) e aumentavam a afinidade deste fator de transcrição para se ligar ao seu sítio no DNA.

Estudos realizados por Itoh *et al.*, 1995 demonstraram que fucanas isolados da alga parda *Sargassum vulgare* agem na via C3, aumentando a ligação dos produtos da clivagem da via C3 (C3b) nos seus respectivos receptores.

Outra forma que um composto pode agir causando inflamação é através da ativação de macrófagos, induzindo a liberação de um fator quimiotático de neutrófilos, que vai atrair os neutrófilos para o local da inflamação. Alencar *et al.*, 2007, verificaram que uma lectina isolada de *Vatairea macrocarpa* induz a liberação de um fator quimiotático de neutrófilos por macrófagos de forma tempo e dose-dependente. Acredita-se que esse mediador inflamatório seja provavelmente uma citocina, como o TNF- $\alpha$ .

Em busca de conhecer melhor a ação inflamatória de SVHV no sistema inato, foi realizado o modelo do edema de pata, um dos modelos mais utilizados para o estudo da resposta inflamatória e de inibidores, que utiliza a carragenana como controle positivo (MORRIS, 2003).

No presente trabalho, foi verificado que SVHV induz um forte edema de pata em ratos, semelhante ao edema causado pela carragenana e pelo dextran, porém com um pico diferente, acontecendo com 2 horas após a injeção do alginato. O pico do edema causado pela carragenana ocorre geralmente entre 3 e 5 horas e os efeitos do dextran podem ser observados já a partir de 15 minutos após a injeção, com o pico ocorrendo entre 30 minutos e 1 hora. (DI ROSA *et al.*, 1971; JORI *et al.*, 1961; METCALFE, 2008; MORRIS, 2003; WINTER *et al.*, 1962).



O tempo da resposta inflamatória está relacionado aos mediadores que são liberados durante o processo e depende do estímulo inflamatório. A carragenana, um grupo complexo de polissacarídeos formado de monômeros de galactose isolado de alga, é muito utilizado como estímulo inflamatório e possui um edema caracterizado por possuir duas fases (VINEGAR *et al.*, 1969). A fase inicial é o resultado do aumento da concentração de histamina e de serotonina no espaço extracelular (VINEGAR *et al.*, 1982), enquanto a fase final do edema é dependente da produção de citocinas pelas células residentes e pela infiltração de neutrófilos (DI ROSA *et al.*, 1971; KULKARNI *et al.*, 1986; VINEGAR *et al.*, 1969). Já o edema causado por dextran é mediado apenas pelo aumento da permeabilidade vascular, através do acúmulo de fluidos e da degranulação de mastócitos (METCALFE, 2008).

A atividade edematogênica de SVHV parece ter o envolvimento de neutrófilos, devido ao aumento da atividade da enzima mieloperoxidase na pele da pata dos animais com o edema, e também está dependente da produção de citocinas inflamatórias, já que o alginato aumentou a produção de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , duas citocinas com conhecidas atividades inflamatórias (FELDMANN & SAKLATVALA, 2001; HADDAD, 2002; HOPKINS, 2003). A produção de IL-10, uma citocina antiinflamatória, que possui a capacidade de inibir a produção de outras citocinas inflamatórias e de mediadores como a prostaglandina e o óxido nítrico (HADDAD, 2002), não foi modificada pelo tratamento com SVHV, assim como também não aumentou após o tratamento com o dextran ou com a carragenana.

A resposta inflamatória causada por estímulos exógenos, como a carragenana, zimosan ou lipopolissacarídeo (LPS) envolve macrófagos residentes e mastócitos como as principais células controlando a migração de neutrófilos. Estas células respondem ao estímulo inflamatório, produzindo citocinas inflamatórias, como o TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , com atividade quimiotática para neutrófilos (SOUZA *et al.*, 1985; FACCIOLI *et al.*, 1990; RIBEIRO *et al.*, 1997). O TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  também medeiam a liberação de eicosanóides e aminas (CUNHA *et al.*, 1992).

Os efeitos de moduladores farmacológicos como a talidomida e a pentoxifilina (inibidores da produção de citocinas), a indometacina (inibidor da ciclooxigenase), a dexametasona (um glicocorticóide), a difenidramina (antagonista do receptor de histamina H1) e o L-NAME (inibidor da síntese do óxido nítrico) (MOREIRA *et al.*, 1993; SAMPAIO *et al.*, 1991, 1998; AARESTRUP *et al.*, 1995; DOHERTY *et al.*, 1991), foram utilizados para avaliar, *in vivo*, os mecanismos envolvidos na atividade edematogênica de SVHV.

Todos os moduladores farmacológicos foram capazes de inibir em certo grau o edema de pata induzido por SVHV. Entretanto, a dexametasona, a indometacina e a talidomida foram os mais eficientes na inibição do edema, enquanto que L-NAME e a difenidramina foram os que possuíram menor efeito. Pode-se sugerir então que o edema causado por SVHV é dependente da produção de diversos mediadores inflamatórios, como citocinas, quimiocinas, histamina, óxido nítrico e prostaglandinas. Neste complexo processo, a histamina, liberada após a degranulação dos mastócitos, deve contribuir para o edema na primeira hora, o que pode explicar a diferença entre a cinética das curvas do edema causado pela carragenana e pelo SVHV.

Polissacarídeos sulfatados isolados da alga *Ulva rígida* agem em diversas vias da inflamação, aumentando a expressão gênica de várias citocinas, seus receptores, de óxido nítrico, prostaglandinas, e algumas enzimas, como a ciclooxigenase-2 e a óxido nítrico sintase-2 (LEIRO *et al.*, 2007).

Assreuy *et al.* (2008) avaliaram os efeitos inflamatórios de Cf-PLS, um polissacarídeo isolado de alga vermelha, demonstrando que ele é capaz de potencializar o edema causado por carragenana, dextran e zimosan, além de causar edema quando administrado isoladamente. Além disso, Assreuy *et al.* (2008) também avaliaram o efeito do Cf-PLS sobre a permeabilidade vascular e migração de neutrófilos, verificando que ele aumenta a permeabilidade vascular quando injetado subcutaneamente na pata de animais e quando administrado intraperitonealmente, causa migração de neutrófilos em ratos. Experimentos utilizando substâncias inibidoras sugeriram a participação de citocinas primárias, prostaglandinas e histamina nos efeitos inflamatórios de Cf-PLS. Além disso, o pré-tratamento com L-NAME não foi capaz de inibir o edema causado por este polissacarídeo, sugerindo que o seu efeito inflamatório não está relacionado com a liberação de NO.

A fim de avaliar a importância dos mastócitos na formação do edema causado por SVHV, foram realizados testes onde foi visto a ação de SVHV na degranulação de mastócitos. Foi verificado que este alginato induz uma degranulação nos mastócitos, em menor grau que o controle positivo (composto 48/80), porém de forma mais forte que a carragenana.

Foi então investigado o possível efeito destas células na migração de neutrófilos induzida por SVHV, fazendo uma depleção da população peritoneal de mastócitos através do tratamento com o composto 48/80, porém a migração de neutrófilos induzida por SVHV não foi afetada de forma significativa, o que indica que os mastócitos não são as principais células

responsáveis por esse parâmetro inflamatório. Estudos anteriores indicam que no caso da atividade inflamatória da carragenana e do dextran, os mastócitos são importantes, principalmente na atividade do dextran e na primeira fase da carragenana. Além disso, estudos anteriores demonstraram que neste modelo, o uso do pré-tratamento com o 48/80 não causa nenhuma modificação na população dos macrófagos peritoneais, que se mantém intacta (RIBEIRO *et al.*, 1997).

Sendo assim, pode-se dizer que o alginato SVHV induz a degranulação de mastócitos, o que deve ser importante para a fase inicial do edema, mas não para a fase final, que deve ser dependente da migração de neutrófilos, já que a depleção dos mastócitos não modificou a migração dos neutrófilos. A cinética do edema causado por SVHV difere do edema causado pela carragenana principalmente nas primeiras duas horas. Nestas primeiras horas, SVHV parece ser mais potente que a carragenana, parecendo com o edema causado por dextran, o qual é mais rápido e dependente de mastócitos.

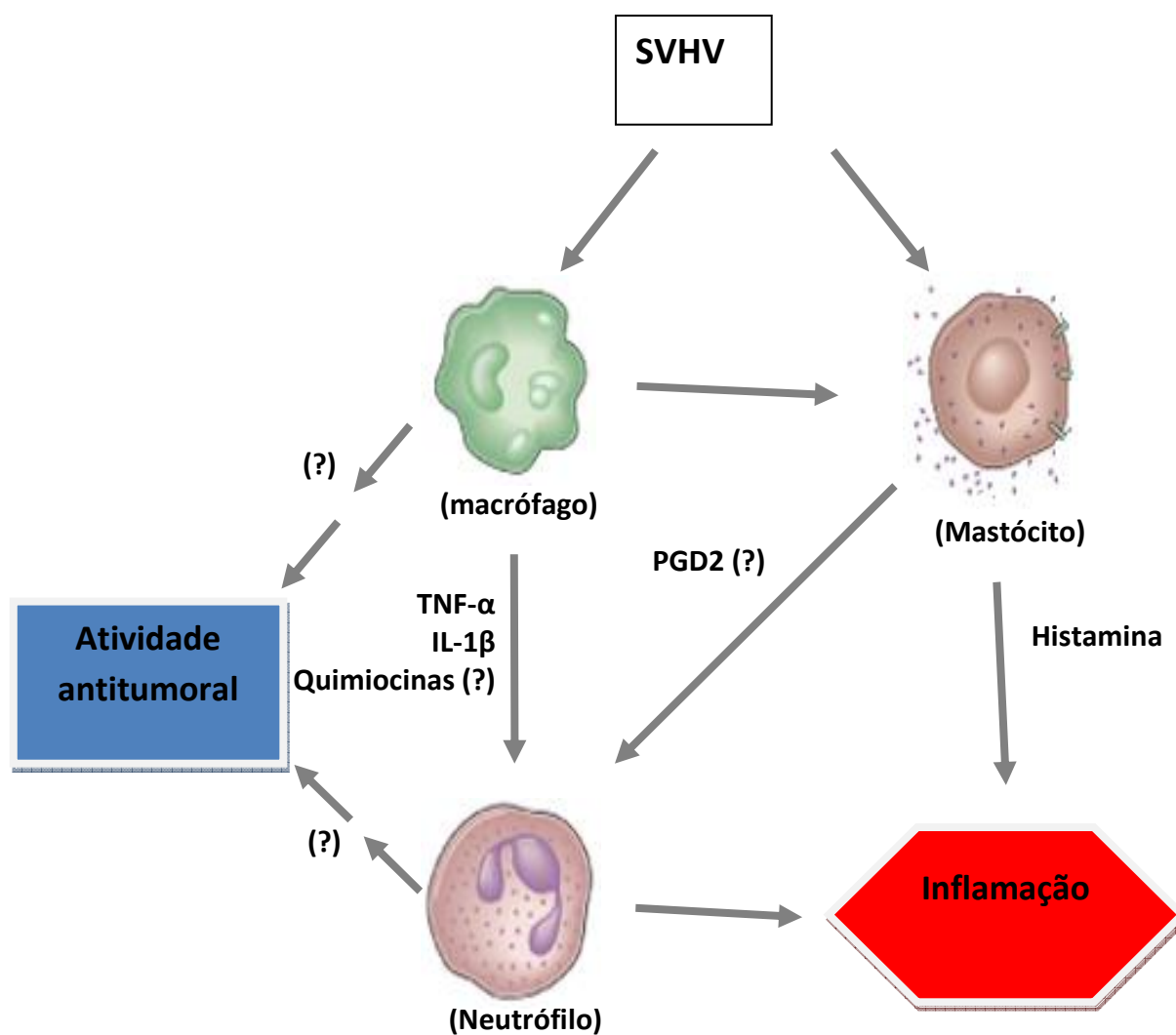
Em seguida, foi investigada a importância dos macrófagos residentes nos efeitos inflamatórios de SVHV, já que foi visto que este alginato induz a ativação de macrófagos *in vitro* e que substâncias como a carragenana e o LPS induzem a migração de neutrófilos através da ativação de células residentes (RIBEIRO *et al.*, 1997). Yang & Jones (2009) também demonstraram que alginatos de sódio isolados de algas marrom são capazes de induzir a ativação de macrófagos, através da via do NF- $\kappa$ B, causando a liberação de citocinas inflamatórias.

A lavagem da cavidade peritoneal com salina é capaz de remover a maioria das células livres presentes na cavidade, incluindo macrófagos (SOUZA *et al.*, 1988). Os animais que tiveram a população de macrófagos depletada através da lavagem peritoneal apresentaram uma redução significativa na migração de neutrófilos induzida por SVHV, sugerindo que este alginato induz a migração de neutrófilos por um mecanismo indireto, o qual depende da presença de macrófagos, porém não necessita da presença de mastócitos.

De forma resumida, podemos sugerir através do presente trabalho, que o alginato SVHV age de forma semelhante com a carragenana e o LPS no sistema imune inato, ativando macrófagos, que começam a produzir citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , que vão por sua vez induzir a geração de mediadores quimiotáticos e substâncias vasoativas como as prostaglandinas, e histamina, induzindo assim, a migração dos neutrófilos e formação de edema (Figura 23).

Esta ativação do sistema imune, especialmente dos macrófagos, pode ser o motivo pelo qual SVHV possui atividade antitumoral contra melanoma como demonstrado neste trabalho. Um macrófago ativado por polissacarídeo pode aumentar sua atividade tumoricida, assim como aumentar a sua capacidade fagocítica, atividade das enzimas lisossomais, produção de nitrito,  $H_2O_2$  e citocinas que vão agir diretamente causando a morte da célula cancerígena (CHOI *et al.*, 2005).

Além de possivelmente inibir diretamente o tumor pela ativação de macrófagos, o alginato SVHV pode ainda estar agindo melhorando de forma geral as atividades imunomoduladoras do organismo. Macrófagos ativados podem liberar IL-12, que estimula a diferenciação de células T  $CD4^+$  auxiliares em efectoras TH1, as quais produzem IFN- $\gamma$  e TNF. O IFN- $\gamma$  age nos linfócitos B, estimulando a produção de anticorpos e é capaz de inibir a angiogênese. A IL-12 age ainda acentuando as funções citotóxicas de células NK ativadas e linfócitos T citotóxicos. Além disso, macrófagos ativados expressam maior quantidade de moléculas co-estimuladoras B7 e de MHC, aumentando ainda mais a ativação de células T. O TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  liberados pelos macrófagos ativados por SVHV podem induzir a migração e maturação de células dendríticas, que são potentes células apresentadoras de antígenos (ABBAS, 2008; ZITVOGEL, *et al.*, 2006). Todas estas vias podem estar relacionadas com a atividade do alginato SVHV na imunomodulação do câncer.



**Figura 23** - Figura esquemática sobre os efeitos hipotéticos do alginato isolado da alga *Sargassum vulgare* (SVHV) sobre o sistema imune.

***Conclusão***

## 6. CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou que o alginato de alta viscosidade isolado da alga marinha *Sargassum vulgare* (SVHV) apresenta atividade antitumoral em camundongos C57BL/6 transplantados com o tumor melanoma B-16. Os ensaios *in vitro* concluíram que esse potencial não está relacionado com uma atividade citotóxica direta.

Estudos em diversos modelos de inflamação e moduladores inflamatórios utilizados neste trabalho mostraram que a ação inflamatória de SVHV se assemelha à ação da carragenana e do LPS. Inicialmente, o alginato causa uma ativação dos macrófagos e mastócitos, que começam então a produzir citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , e histamina, levando ao processo de inflamação caracterizado pela migração dos neutrófilos e formação de edema.

Pode-se concluir que este alginato possui uma ação antitumoral e imunomoduladora, podendo contribuir para estudos sobre novas substâncias para o tratamento do câncer ou como adjuvante para aprimorar vacinas antitumorais.

*Referências*  
*Bibliográficas*



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARESTRUP, F. M., GONCALVES-DA-COSTA, S. C., & SARNO, E.N. The effect of thalidomide on BCG-induced granulomas in mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 28, p. 1069–1076, 1995.
- ALEKSEYENKO T.V.; ZHANAYEVA, S.Y.; VENEDIKTOVA A.A.; ZVYAGINTSEVA, T.N.; KUZNETSOVA, T.A.; BESEDNOVA, N.N. & KOROLENKO, T.A. Antitumor and antimetastatic activity of fucoidan, a sulfated polysaccharide isolated from the Okhotsk sea *Fucus evanescens* brown alga. **Bull. Exp. Biol. Med.**, v. 143, p. 730-732, 2007.
- ALENCAR, N.M.N.; ASSREUY, A.M.S.; HAVT, A.; BENEVIDES, R.G.; MOURA, T.R.; SOUSA, R.B.; RIBEIRO, R.; CUNHA, F.Q. & CAVADA, B. *Vatairea macrocarpa* (Leguminosae) lectin activates cultured macrophages to release chemotactic mediators. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, v. 374, p. 275-282, 2007.
- ALEXANDROFF, A.B.; JACKSON, A.M.; O'DONNELL, M.A. & JAMES, K. BCG immunotherapy of bladder cancer: 20 years on. **Lancet**, v. 353, p. 1689-1694, 1999.
- APLIN, A.E.; HOWE, A.; ALAHARI, S.K. & JULIANO, R.L. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. **Pharmacol. Rev.**, v. 50, p. 197–263, 1998.
- ASSREUY, A.M.S.; GOMES, D.M.; SILVA, M.S.J.; TORRES, V.M.; SIQUEIRA, R.C.L.; PIRES, A.F.; CRIDDLE, D.N.; ALENCAR, N.M.N.; CAVADA, B.S.; SAMPAIO, A.H. & FARIAS, W.R.L. Biological effects of a sulphated polysaccharide isolated from the marine red algae *Champia feldmannii*. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 31, p. 691-695, 2008.
- AUGST, A.D.; KONG, H.J. & MOONEY, D.J. Alginate hydrogels as biomaterials. **Macromol. Biosc.**, v. 6, p. 623-633, 2006.
- AUTRAN, B.; CARCELAIN, G.; COMBADIÈRE, B. & DEBRE, P. Therapeutic vaccines for chronic infections. **Science**, v. 305, p. 205–208, 2004.
- BATCHELOR, H.K.; BANNING, D.; DETTMAR, P.W.; HAMPSON, F.C.; JOLLIFFE, I.G. & CRAIG, D.Q.M. An *in vitro* mucosal model for prediction of the bioadhesion of alginate solutions to the esophagus. **Internat. Journal of Pharmaceutics**, v. 238, p. 123–132, 2002.
- BENT, A.E.; TUTRONE, R.T.; MCLENNAN, M.T.; LLOYD, L.K.; KENNELLY, M.J. & BADLANI, G. Treatment of intrinsic sphincter deficiency using autologous ear chondrocytes as a bulking agent. **Neurourol Urodyn.**, v. 20, p. 157-165, 2001.
- BINDER, R.J. & SRIVASTAVA, P.K. Peptides chaperoned by heat-shock proteins are a necessary and sufficient source of antigen in the cross-priming of CD8<sub>T</sub> cells. **Nat. Immunol.**, v. 6, p. 593–599, 2005.
- BLUNT, J.W.; COPP, B.R.; MUNRO, M.H.G.; NORTHCOTE, P.T. & PRINSEP, M.R. Marine natural products. **Nat. Prod. Rep.**, v. 28, p. 196-268, 2011.
- BOLD, H.C. **O reino vegetal**. São Paulo: Edgard Blucher. 1988. 189p.

BONIFAZ, L.C.; BONNYAY, D.P.; CHARALAMBOUS, A.; DARGUSTE, D.I.; FUJII, S.; SOARES, H.; BRIMNES, M.K.; MOLTEDO, B.; MORAN, T.M. & STEINMAN, R.M. *In vivo* targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. **J. Exp. Med.**, v. 199, p. 815–824, 2004.

BORCHERS, A.T.; STERN, J.S.; HACKMAN, R.M.; KEEN, C.L. & GERSHWIN, M.E. Mushrooms, tumors and immunity. **Proceed. Soc. Exper. Biol. Medic.**, v. 221, p. 281-293, 1999.

BOSCARDIN, S.B.; HAFALLA, J.C.; MASILAMANI, R.F.; KAMPHORST, A.O.; ZEBROSKI, H.A.; RAI, U.; MORROT, A.; ZAVALA, F.; STEINMAN, R.M.; NUSSENZWEIG, R.S. & NUSSENZWEIG, M.C. Antigen targeting to dendritic cells elicits long-lived T cell help for antibody responses. **J. Exp. Med.**, v. 203, p. 599–606, 2006.

BOUCK, N., STELLMACH, V., & HSU, S.C. How tumors become angiogenic. **Adv. Cancer Res.**, v. 69, p. 135–174, 1996.

BRATTHALL, G.; LINDBERG, P.; HAVEMOSE-POULSEN, A.; HOLMSTRUP, P.; BAY, L.; SONDERHOLM, G.; NORDERYD, O.; ANDERSSON, B.; RICKARDSSON, B.; HALLSTROM, H.; KULLENDORFF, B. & BELL, H.S. Comparison of ready-to-use EMDOGAIN-gel and EMDOGAIN in patients with chronic adult periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v.28, p. 923-929, 2001.

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

BRYAN, T.M. & CECH, T.R. Telomerase and the maintenance of chromosome ends. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 11, p. 318-324, 1999.

BURNET, F.M. The concept of immunological surveillance. **Prog. Exp. Tumor Res.**, v. 13, p. 1–27, 1970.

CAO, Q. & LIN, Z. Antitumor and anti-angiogenic activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharides peptide. **Acta Pharmacol. Sin.**, v. 25, p. 833-838, 2004.

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

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

CHIHARA, G.; HAMURO, J.; ARAI Y. & FUKUOKA, F. Fractionation and purification of polysaccharides with marked antitumour activity, especially Lentinan from *Lentinus edodes* (Bark) sing, an edible mushroom. **Cancer Res.**, v. 30, p. 2776-2781, 1970.

CHOY, Y.; LEUNG, K.; CHO, C.; WONG, K. & PANK, K. Immunopharmacological studies of low molecular weight polysaccharides from *Angelica sinensis*. **Americ. J. Chin. Med.**, v. 22, p. 137-145, 1994.

- CHURCH, F.C.; MEADE, J.B.; TREANOR, R.E. & WHINNA, H.C. Antithrombin activity of fucoidan. **J. of Biol. Chem.**, v. 264, p. 3618-3623, 1989.
- COLLIEC, S.; FISCHER, A.M.; TAPON-BRETAUDIÈRE, J.; BOISSON, C.; DURAND, P. & JOZEFONVICZ, J. Anticoagulant properties of a fucoidan fraction. **Thromb. Res.**, v. 64, p. 143-154, 1991.
- COLOTTA, F.; ALLAVENA, P.; SICA, A.; GARLANDA, C. & MANTOVANI, A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. **Carcinogenesis**, v. 30, p. 1073-1081, 2009.
- COOMBE, D.R.; PARISH, C.R.; RAMSHAW, I.E. & SNOWDEN, J.M. Analysis of the inhibition of tumour metastasis by sulfated polysaccharides. **Inter. J. of Cancer**, v. 39, p. 82-88, 1987.
- COPPIN, C.; PORZSOLT, F. & AWA, A. Immunotherapy for advanced renal cell cancer. **Cochrane. Database. Syst. Rev.**, CD001425, 2005.
- COUNTER, C.M.; AVILION, A.A.; LEFEUVRE, C.E.; STEWART, N.G.; GREIDER, C.W.; HARLEY, C.B. & BACCHETTI, S. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. **EMBO J.**, v. 11, p. 1921-1929, 1992.
- CRAGG, G.M. & NEWMAN, D.J. Antineoplastic agents from natural sources: achievements and future directions. **Exp. Opin. Invest. Drugs.**, v. 9, p. 1 – 15, 2000.
- CUMASHI, A.; USHAKOVA, N.A.; PREOBRAZHENSKAYA, M.E.; D'INCECCO, A.; PICCOLI, A.; TOTANI, L.; TINARI, N.; MOROZEVICH, G.E.; BERMAN, A.E.; BILAN, M.I.; USOV, A.I.; NADEZHDA E.; GRACHEV, A.A.; SANDERSON, C.J.; KELLY, M.; RABINOVICH, G.A. & IACOBELLI, S. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. **Glycobiology**, v. 17, p. 541-552, 2007.
- CURCIO, C.; DI CARLO, E.; CLYNES, R.; SMYTH, M.J.; BOGGIO, K.; QUAGLINO, E.; SPADARO, M.; COLOMBO, M.P.; AMICI, A.; LOLLINI, P.L. et al. Nonredundant roles of antibody, cytokines, and perforin in the eradication of established Her-2/neu carcinomas. **J. Clin. Invest.**, v. 111, p. 1161-1170, 2003.
- CURRAN, R. C. **Colon atlas of histopathology**, 3th ed. Oxford University Press, New York. 1990.
- DABA, A.S. & EZERONYE, O.U. Anti-cancer effect of polisaccharides isolated from higher basidiomycetes mushrooms. **Afric. J. of Biotech.**, v. 2, n. 12, p. 672-678, 2003.
- DAMONTE, E.B.; NEYTS, J.; PUJOL, C.A.; SNOECK, R.; ANDREI, G.; IKEDA, S.; WITVROUW, M.; REYMEN, D.; HAINES, H.; MATULEWICZ, M.C.; CERESO, A.; COTO, C.E. & DE CLERCQ, E. Antiviral activity of a sulfated polysaccharide from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*. **Biochem. Pharm.**, v. 47, p. 2187-2192, 1994.
- DAVIS, H.L.; WEERATNA, R.; WALDSCHMIDT, T.J.; TYGRET, L.; SCHORR, J. & KRIEG, A.M. CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. **J. Immunol.**, v. 160, p. 870-876, 1998.

- DE CLERCQ, E. Chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection: Anti-HIV agents targeted at early stages in the virus replicative cycle. **Biomed. Pharmacother.**, v. 50, p. 207-215, 1996.
- DEMEULE, B.; GURNY, R. & ARVINTE, T. Where disease pathogenesis meets protein formulation: renal deposition of immunoglobulin aggregates. **Europ. J. Pharm. Biopharm.**, v. 62, p. 121-130, 2006.
- DI ROSA, M., GIROUD, J. P., & WILLOUGHBY, D. A. Studies of mediators of the acute inflammatory response induced in rats indifferent site by carrageenan and turpentine. **J. Pathol.**, v. 104, p. 15–21, 1971.
- DIAS, P.F.; SIQUEIRA, J.R.J.M.; VENDRUSCOLO, L.F.; NEIVA, T.J.; GAGLIARDI, A.R.; MARASCHIN, M. & RIBEIRO-DO-VALLE, R.M. Antiangiogenic and antitumoral properties of a polysaccharide isolated from *Sargassum stenophyllum*. **Cancer chemother. Pharmacol.**, v. 56, p. 436-446, 2005.
- DIAS, P.F.; SIQUEIRA, J.R.J.M.; MARASCHIN, M.; FERREIRA, A.G.; GAGLIARDI, A.R. & RIBEIRO-DO-VALLE, R.M. A polysaccharide isolated from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum* exerts antivascuogenic effects evidenced by modified morphogenesis. **Microvascular Research**, v. 75, p. 34-44, 2008.
- DOHERTY, G. M., JENSEN, J. C., ALEXANDER, H. R., BURESH, C. M., & NORTON, J. A. Pentoxifylline suppression of tumor necrosis factor gene transcription. **Surgery**, v. 110, p. 192–198, 1991.
- DRAGET, K.I.; OESTGAARD, K. & SMIDSROED, O. Homogeneous alginate gels: A technical approach. **Carbohydrate Polymers**, v. 14, p. 159–178, 1990.
- DRAGET, K.I.; SKJAK-BRAEK, G. & SMIDSROD, O. Alginate based new materials. **Intern. Journal of Biolog. Macromol.**, v. 21, p. 47–55, 1997.
- DUDA, R.B.; YANG, H.; DOOLEY, D.D. & ABU-JAWDEH, G. Recombinant BCG therapy suppresses melanoma tumor growth. **Ann. Surg. Oncol.**, v. 2, p. 542-549, 1995.
- DUNN, G.P.; BRUCE, A.T.; IKEDA, H.; OLD, L.J. & SCHREIBER, R.D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. **Nat. Immunol.**, v. 3, p. 991–998, 2002.
- DUNN, G.P.; OLD, L.J. & SCHREIBER, R.D. The three Es of cancer immunoediting. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 22, p. 329-360, 2004.
- ESTRADA, A.; YUN, C.H.; VAN KESSEL, A.; LI, B.; HAUTA, S. & LAARVELD, B. Immunomodulatory activities of oat  $\beta$ -glucan *in vitro* and *in vivo*. **Microbiol. Immunol.**, v. 41, p. 991–998, 1997.
- FACCIOLI, L. H., SOUZA, G. E., CUNHA, F. Q., POOLE, S., & FERREIRA, S. H. Recombinant interleukin-1 and tumor necrosis factor induce neutrophil migration ‘in vivo’ by indirect mechanisms. **Agents Actions**, v. 30, p. 344–349, 1990.
- FAO. Disponível em: [www.fao.org](http://www.fao.org). Acesso em 2011.

- FARIAS, W.R.L.; NAZARETH, R.A.; MOURÃO, P.A.S. Dual effects of sulfated D-galactans from the red algae *Botryocladia occidentalis* preventing thrombosis and inducing platelet aggregation. **Thromb. Haem.**, v. 86, p. 1540-1546, 2001.
- FEDI, P.; TRONICK, S.R. & AARONSON, S.A. **Growth factors**. In Cancer Medicine, J.F. Holland, R.C. Bast, D.L. Morton, E. Frei, D.W. Kufe & R.R., Weichselbaum, (Eds.) Baltimore, MD: Williams and Wilkins, 1997, p. 41-64.
- FELDMANN, M. & SAKLATVALA, J. Proinflammatory cytokines. **Cytokine Ref.**, v. 1, p. 291-305, 2001.
- FOLKMAN, J. **Tumor angiogenesis**. In Cancer Medicine, J.F. Holland, R.C. Bast, D.L. Morton, E. Frei, D.W. Kufe, and R.R. Weichselbaum (Eds.) Baltimore, MD: Williams and Wilkins, 1997, p. 181-204.
- FONG, L. & ENGLEMAN, E.G. Dendritic cells in cancer immunotherapy. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 18, p. 245-73, 2001.
- FONG, L.; BROCKSTEDT, D.; BENIKE, C.; BREEN, J.K.; STRANG, G.; RUEGG, C.L. & ENGLEMA, E.G. Dendritic cell-based xenoantigen vaccination for prostate cancer immunotherapy. **J. Immunol.**, v. 167, p. 7150-7156, 2001.
- FONTELES, M. C.; COHEN, J. J.; BLACK, A. J. & WERTHEIM, S. J. Support of kidney function by long-chain fatty acids derived from renal tissue. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 244, p. 235-246, 1983.
- FORNELLI, F, MINERVINI, F. & LOGRIECO, A. Cytotoxicity of fungal metabolites to lepidopteran (*Spodoptera frugiperda*) cell line (SF-9). **J. Invert. Pathol.**, v. 85, p. 74-79, 2004.
- FOULDS, L. **The experimental study of tumor progression**. Volumes I-III. London: Academic press. 1954.
- FUJIIHARA, M.; IZIMMA, N.; YAMAMOTO, I. & NAGUMO, T. Purification and chemical and physical characterization of an antitumor polysaccharide from the brown seaweed *Sargassum fulvellum*. **Carbohydrate Research**, v. 125, p. 97-106, 1984.
- FUJIIHARA, M. & NAGUMO, T. The effect of the content of D-mannuronic acid and L-guluronic acid blocks in alginates on antitumor activity. **Carbohydrate Research**, v. 224, p. 343-347, 1992.
- FUJIIHARA, M. & NAGUMO, T. An influence of the structure of alginate on the chemotactic activity of macrophage and the antitumor activity. **Carbohydrate Research**, v. 243, p. 211-216, 1993.
- FURUE, H. & KITO, I. Phase 111-study on Lentinan. **Japan. J. Cancer Chemot.**, v. 8, p. 944-960, 1981.
- GAO, Y.L.; HU, F.L.; ZHU, W. & LI, Y.H. Study on the antitumor activity of propolis and bee pollen and royal jelly. **J. Bee**, v. 7, p. 3-4, 2003.
- GARCIA-LORA, A.; MARTINEZ, M.; PEDRINACI, S. & GARRIDO, F. Different regulation of PKC isoenzymes and MAPK by PSK and IL-2 in the proliferative and cytotoxic

activities of the NKL human natural killer cell line. **Cancer Immunol. Immunot.**, v. 52, p. 59–64, 2003.

GIANNI, L.; EIERMANN, W.; SEMIGLAZOV, V.; MANIKHAS, A.; LLUCH, A.; TJULANDIN, S.; ZAMBETTI, M.; VAZQUEZ, F.; BYAKHOW, M.; LICHINITSER, M.; CLIMENT, M.A.; CIRUELOS, E.; OJEDA, B.; MANSUTTI, M.; BOZHOK, A.; BARONIO, R.; FEYEREISLOVA, A.; BARTON, C.; VALAGUSSA, P. & BASELGA, J. Neoadjuvant chemotherapy with trastuzumab followed by adjuvant trastuzumab versus neoadjuvant chemotherapy alone, in patients with HER2-positive locally advanced breast cancer (the NOAH trial): a randomised controlled superiority trial with a parallel HER2-negative cohort. **Lancet**, v. 375, p. 377-384, 2010.

GIUSTI, R.M.; SHASTRI, K.A.; COHEN, M.H.; KEEGAN, P. & PAZDUR, R. FDA drug approval summary: panitumumab (Vectibix™). **Oncolog.**, v. 12, p. 577–583, 2007.

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

GONZALEZ-ASEGUINOLAZA, G.; VAN KAER, L.; BERGMANN, C.C.; WILSON, J.M.; SCHMIEG, J.; KRONENBERG, M.; NAKAYAMA, T.; TANIGUCHI, M.; KOEZUKA, Y. & TSUJI, M. Natural killer T cell ligand galactosylceramide enhances protective immunity induced by malaria vaccines. **J. Exp. Med.**, v. 195, p. 617–624, 2002.

GRENN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S. & TANNENBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite and [ $^{15}\text{N}$  nitrates] in biological fluids. **Analyt. Bioch.**, v. 126, p. 131-138, 1982.

HADDAD, J.J. Citokines and related-receptor mediated signaling pathways. **Bioch. Biophys. Res. Commun.**, v. 297, 700-713, 2002.

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

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

HANAHAH, D., & FOLKMAN, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. **Cell**, v. 86, p. 353–364, 1996.

HANAHAH, D. & WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, p. 646-74, 2011.

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

HARDMAN, G. & LIMBIRD, L. **The pharmacological basis of therapeutics**. International edition, 9th ed., 1996.

HARRIS, C.C. P53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic-an abridged historical perspective. **Carcinog.**, v. 17, p. 1187-1198, 1996.

- HAVT, A.; FONTELES, M.C. & MONTEIRO, H.S.A. The renal effects of *Bothrops jararacussu* venom and the role of PLA<sub>2</sub> and PAF. **Toxicol.**, v. 39, p. 1841-1846, 2001.
- HAYASHI, A.; GILLEN, A.C. & LOTT, J.R. Effects of daily oral administration of quercetin chalcone and modified citrus pectin on implanted colon-25 tumor growth in Balb-c mice. **Altern. Med. Rev.**, v. 5, p. 546-552, 2000.
- HAYASHI, K.; NAKANO, T.; HASHIMOTO, M.; KANEKIYO, K. & HAYASHI, T. Defensive effects of a fucoidan from brown alga *Undaria pinnatifida* against herpes simplex virus infection. **Int. Immunopharmacol.**, v. 8, p. 109-116, 2008.
- HEATH, W.R. & CARBONE, F.R. Cytotoxic T lymphocyte activation by crosspriming. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 11, p. 314-318, 1999.
- HEATH, W.R. & CARBONE, F.R. Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 1, p. 126-134, 2001.
- HEMMINGSON, J.A.; FALSHAW, R.; FURNEAUX, R.H. & THOMPSON, K. Structure and antiviral activity of the galactofucan sulfates extracted from *Undaria pinnatifida* (Phaeophyta). **J. Appl. Phycol.**, v. 18, p. 185-193, 2006.
- HIRAZUMI, A. & FURUSAWA, E. An immunomodulatory polysaccharide-rich substance from the fruit juice of *Morinda citrifolia* (Noni) with antitumour activity. **Phytoth. Res.**, v. 13, p. 380-387, 1999.
- HIROISHI, S.; SUGIE, K.; YOSHIDA, T.; MORITOMO, J.; TANIGUCHI Y.; IMAI S. & KUREBAYASHI, J. Antitumor effects of *Marginisporum crassissimum* (Rhodophyceae), a marine red alga. **Cancer Let.**, v. 167, p. 145-150, 2001.
- HOEK, C. VAN DEN; MANN, D.G. & JAHNS, H.M. **Algae**: an introduction to phycology. Cambridge University Press, 1995, 637 p.
- HOPKINS, S.J. The pathological roles of cytokines. **Legal Med.**, v. 5, p. 545-547, 2003.
- HRCKOWA, G. & VELEBNY, S. Treatment of *Toxocara canis* infections in mice with liposome-incorporated benzimidazole carbamates and immunomodulator glucan. **J. Helminth.**, v. 75, p. 141-146, 2001.
- HSIEH, T.C.; KUNICKI, J.; DARZYNKIEWICZ, Z. & WU, J.M. Effects of extracts of *Coriolus versicolor* (I'm-Yunity (TM)) on cell-cycle progression and expression of interleukins-1 beta, -6, and -8 in promyelocytic HL-60 leukemic cells and mitogenically stimulated and nonstimulated human lymphocytes. **J. Altern. Complement. Med.**, v. 8, p. 591-602, 2002.
- HU, G.P.; YUAN, J.; SUN, L.; SHE, Z.G.; WU, J.H.; LAN, X.J.; ZHU, X.; LIN, Y.G. & CHEN, S.P. Statistical research on Marine Natural products based on data obtained between 1985 and 2008. **Marine Drugs**, v. 9, p. 514-525, 2011.
- HUANG, Q.; ZHANG, L.; CHEUNG, P.C.K. & TAN, X. Evaluation of sulfated  $\alpha$ -glucans from *Poria cocos* mycelia as potential antitumor agent. **Carb. Polym.**, v. 64, p. 337-344, 2006.

HWANG, J.S.; CHUNG, H.K.; BAE, E.K.; LEE, A.Y.; JI, H.J.; PARK, D.W.; JUNG, H.J.; CHO, C.W.; CHOI, H.J.; LEE, D.S.; LEE, K.R. & YOUN, H.J. The polysaccharide fraction AIP1 from *Artemisia iwayomogi* suppresses apoptotic death of the mouse spleen cells in culture. **Arch. Pharm. Res.**, v. 26, p. 294–300, 2003.

IINUMA, T.; HOMMA, S.; NODA, T.; KUFU, D.; OHNO, T. & TODA, G. Prevention of gastrointestinal tumors based on adenomatous polyposis coli gene mutation by dendritic cell vaccine. **J. Clin. Invest.**, v. 113, p. 1307–1317, 2004.

INCA, Brasil. Ministério da Saúde. Disponível em: [www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br). Acesso em 2012.

INGOLFSDOTTIR, K.; JURCIC, K.; FISCHER, B. & WAGNER, H. Immunologically active polysaccharide from *Cetraria islandica*. **Planta Med.**, v. 60, p. 527-531, 1994.

IRELAN, C.M.; COPP, B.R.; FOSTER, M.P.; MCDONALD, L.A.; RADISKY, D.C. & SWERSEY, J.C. **Biomedical potential of marine natural products**. In Attaway, D. H., Zaborsky, O. R. (eds). *Marine Biotechnology*, v. 1, Pharmaceutical and Bioactive Natural Products, Plenum Press, New York, 1993, p. 1-43.

ITO, K.; NAKAZATO, H.; KOIKE, A.; TAKAGI, H.; SAJI, S.; BABA, S.; MAI, M.; SAKAMOTO, J. & OHASHI, Y. Long-term effect of 5-fluorouracil enhanced by intermittent administration of polysaccharide K after curative resection of colon cancer: A randomized controlled trial for 7-year follow-up. **Int. J. Colorectal Dis.**, v. 19, p. 157–164, 2004.

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

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

JAKOB, T.; WALKER, P.S.; KRIEG, A.M.; UDEY, M.C. & VOGEL, J.C. Activation of cutaneous dendritic cells by CpG-containing oligodeoxynucleotides: a role for dendritic cells in the augmentation of Th1 responses by immunostimulatory DNA. **J. Immunol.**, v. 161, p. 3042-3049, 1998.

JEANNIN, P.; RENNO, T.; GOETSCH, L.; MICONNET, I.; AUBRY, J.P.; DELNESTE, Y.; HERBAULT, N.; BAUSSANT, T.; MAGISTRELLI, G.; SOULAS, C. et al. OmpA targets dendritic cells, induces their maturation and delivers antigen into the MHC class I presentation pathway. **Nat. Immunol.**, v. 1, p. 502–509, 2000.

JI, M.H. **Seaweed chemistry**. 3<sup>a</sup> ed. Beijing: Science Press, 1997, p. 117-196.

JIANG, Y.; JIANG, X.; WANG, P.; MOU, H.; HU X. & LIU, S. The antitumor and antioxidative activities of polysaccharides isolated from *Isaria farinosa* B05. **Microbiol. Res.**, v. 163, p. 424-430, 2006.

JOLY, A.B. Flora marinha do litoral norte do estado de São Paulo e regiões circunvizinhas. **Bol. Fac. Filos., Ciênc. Letr. Univer. São Paulo**, v. 294, p. 1-393, 1965.



- JORI, A., BENTIVOGLIO, A. P., & GARATTINI, S. The mechanism of the local inflammatory reaction induced by compound 48/80 and dextran in rats. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 13, p. 617-619, 1961.
- JUNG, K.; HA, Y.; HA, S.K.; HAN, D.U.; KIM, D.W. & MOON, W.K. Antiviral effect of *Saccharomyces cerevisiae*  $\beta$ -glucan to swine influenza virus by increased production of interferon-gamma and nitric oxide. **J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health**, v. 51, p. 72-76, 2004.
- KAEFFER, B.; BERNARD, C.; LAHAYE, M.; BLOTTIERE, H.M. & CHERBUT, C. Biological properties of ulvan, a new source of green seaweed sulfated polysaccharides, on cultured normal and cancerous colonic epithelial cells. **Plant. Med.**, v. 65, p. 527-531, 1999.
- KAO, J.H. & CHEN, D.S. Recent updates in hepatitis vaccination and the prevention of hepatocellular carcinoma. **Int. J. Cancer**, v. 97, p. 269–271, 2002.
- KATO, M.; HIROSE, K.; HAKOZAKI, M.; OHNO, M.; SAITO, Y.; IZUTANI, R.; NOGUCHI, J.; HORI, Y.; OKUMOTO, S.; KURODA, D.; NOMURA, H.; NISHIMATSU, S. & OHOYANAGI, H. Induction of gene expression for immunomodulating cytokines in peripheral blood mononuclear cells in response to orally administrated PSK, an immunomodulating protein-bound polysaccharide. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 40, p. 152–6, 1995.
- KAWANO, T.; CUI, J.; KOEZUKA, Y.; TOURA, I.; KANEKO, Y.; MOTOKI, K.; UENO, H.; NAKAGAWA, R.; SATO, H.; KONDO, E. et al. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of V<sub>14</sub> NKT cells by glycosylceramides. **Science**, v. 278, p. 1626–1629, 1997.
- KIM, K.; KIM, W.; HONG, S.; SHIN, H.; CHON, Y. & YANG, C. Antitumour, genotoxicity and anticlastogenic activities of polysaccharide from *Curcuma zedoaria*. **Molec. Cells**, v. 10, p. 392-398, 2000.
- KIM, G.Y.; PARK, H.S.; NAM, B.H.; LEE, S.J. & LEE, J.D. Purification and characterization of acidic proteo-heteroglycan from the fruiting body of *Phellinus linteus* (Berk. & M. A. Curtis) Teng. **Bioresour. Technol.**, v. 89, p. 81–87, 2003.
- KIMA, M.H. & JOO, H.G. Immunostimulatory effects of fucoidan on bone marrow-derived dendritic cells. **Immunol. Lett.**, v. 115, p. 138-143, 2008.
- KIMURA, Y.; MIZUNO, H.; SATAKE, K.; TAHARA, H. & TSUKUDA, M. Clinical evaluation of Sizofiran an assistant immunotherapy in treatment of head and neck cancer. **Acta Otolaryng.**, v. 511, p. 192 – 195, 1994.
- KIMURA, Y.; IJIMA, S.; KATO, T.; TSUJIE, M.; NAOI, Y. & HAYASHI, T. Usefulness of TS-1 and lentinan combination immunotherapy in advanced or recurrent gastric cancer pilot study aiming at a randomized trial. **Gan. Kagaku Ryoho.**, v. 30, p. 1125–30, 2003.
- KLOAREG, B. & QUATRANO, R.S. Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. **Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.**, v. 26, p. 259-315, 1988.
- KNUTSON, K.L. & DISIS, M.L. Augmenting T helper cell immunity in cancer. **Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metabol. Disord.**, v. 5, p. 365–371, 2005.

- KO, S.Y.; KO, H.J.; CHANG, W.S.; PARK, S.H.; KWEON, M.N. & KANG, C. Galactosylceramide can act as a nasal vaccine adjuvant inducing protective immune responses against viral infection and tumor. **J. Immunol.**, v. 175, p. 3309–3317, 2005.
- KOBAYASHI, E.; MOTOKI, K.; UCHIDA, T.; FUKUSHIMA, H. & KOEZUKA, Y. KRN7000, a novel immunomodulator, and its antitumor activities. **Oncol. Res.**, v. 7, p. 529–534, 1995.
- KOBAYASHI, H.; MATSUNAGA, K. & FUJII, M. PSK as a chemopreventive agent. **Cancer Epidem., Biomark. & Prevent.**, v. 2, p. 271-276, 1993.
- KODAMA, T.; SENDO, F. & KOBAYASHI, H. Leukemoid Reaction in BALB/c Mice Bearing Transplanted Tumors. **Cancer Res.**, v. 34, p. 176-180, 1974.
- KODAMA, N.; MURATA, Y. & NANBA, H. Administration of a polysaccharide from *Grifola frondosa* stimulates immune function of normal mice. **J. Med. Food**, v. 7, p. 141–145, 2004.
- KOLENDER, A.A.; MATULEWICZ, M.C. & CERESO, A.S. Structural analysis of antiviral sulfated  $\alpha$ -D—(1 3)-linked mannans. **Carboh.Res.**, v. 273, p. 179-185, 1995.
- KOYANAGI, S.; TANIGAWA, N.; NAKAGAWA, H.; SOEDA, S. & SHIMENO, H. Oversulfation of fucoidan enhances its anti-angiogenic and antitumor activities. **Bioch. Pharm.**, v. 65, p. 173-179, 2003.
- KULKARNI, S. K., MEHTA, A. K., & KUNCHANDY, J. Anti-inflammatory actions of clonidine, guanfacine and B-HT 920 against various inflammagen- induced acute paw oedema in rats. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.**, v. 279, p. 324–34, 1986.
- KUMMAR, V.; ABBAS, A. & FAUSTO, N. **Robbins & Cotran pathology basis of disease**, 7th ed. WB Saunders, China, 2004.
- LEE, J.K.; LEE, M.K.; YUN, Y.P.; KIM, Y.; KIM, J.S.; KIM, Y.S.; KIM, K.; HAN, S.S. & LEE, C.K. Acemannan purified from *Aloe vera* induces phenotypic and functional maturation of immature dendritic cells. **Int. Immunopharm.**, v. 1, p. 1275–1284, 2001.
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L. & COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 3ª ed. São Paulo: Sarvier, 2002, 975p.
- LEIRO, J.M.; CASTRO, R.; ARRANZ, J.A. & LAMAS, J. Immunomodulating activities of acidic sulphated polysaccharides obtained from the seaweed *Ulva rigida* C. Agardh. **Int. Immunopharm.**, v. 7, p. 879-888, 2007.
- LETVIN, N.L.; BAROUCH, D.H. & MONTEFIORI, D.C. Prospects for vaccine protection against HIV-1 infection and AIDS. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 20, p. 73–99, 2002.
- LEUNG, M.Y.K.; LIU, C.; KOON, J.C.M. & FUNG, K.P. Polysaccharide biological response modifiers. **Immun. Let.**, v. 105, p. 101-114, 2006.
- LEVY, J.B. & PUSEY, C.D. Nephrotoxicity of intravenous immunoglobulin. **Q. J. Med.**, v. 93, p. 751-755, 2000.

- LI, W.; YAJIMA, T.; SAITO, K.; NISHIMURA, H.; FUSHIMI T.; OHSHIMA Y.; TSUKAMOTO, Y. & YOSHIKAI, Y. Immunostimulating properties of intragastrically administered Acetobacter-derived soluble branched (1,4)- $\beta$ -d-glucans decrease murine susceptibility to *Listeria monocytogenes*. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 7005–7011, 2004.
- LIAO, H.F.; CHOU, C.J.; WU, S.H.; KHOO, K.H.; CHEN, C.F. & WANG, S.Y. Isolation and characterization of an active compound from black soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] and its effect on proliferation and differentiation of human leukemic U937 cells. **Anticanc. Drugs**, v. 12, p. 841-846, 2001.
- LIM, T.S.; NA, K.; CHOI, E.M.; CHUNG, J.Y. & HWANG, J.K. Immunomodulating activities of polysaccharides isolated from *Panax ginseng*. **J. Med. Food**, v. 7, p. 1–6, 2004.
- LINCOLN, R.A.; STRUPINSKI, K. & WALKER, J.M. Bioactive compounds from algae. **Life Chem. Rep.**, v. 8, p. 97-183, 1991.
- LINEHAN, S.A.; MARTINEZ-POMARES, L.; STAHL, P.D. & GORDON, S. Mannose receptor and its putative ligands in normal murine lymphoid and nonlymphoid organs: in situ expression of mannose receptor by selected macrophages, endothelial cells, perivascular microglia, and mesangial cells, but not dendritic cells. **J. Exp. Med.**, v. 189, p. 1961–1972, 1999.
- LINS, K.O.; BEZERRA, D.P.; ALVES, A.P.; ALENCAR, N.M.; LIMA, M.W.; TORRES, V.M.; FARIAS, W.R.; PESSOA, C.; DE MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V. Antitumor properties of a sulfated polysaccharide from the red seaweed *Champia feldmannii* (Diaz-Pifferer). **J. Appl. Toxicol.**, v. 29, p. 20-26, 2009.
- LIU, C.; LEUNG, M.Y.K.; KOON, J.C.M.; ZHU, L.F.; HUI, Y.Z; YU, B. & FUNG, K.P. Macrophage activation by polysaccharide biological response modifier isolated from *Aloe vera* L. var. *chinensis* (Haw.) Berg. **Int. Immunopharm.**, v. 6, p. 1634-1641, 2006.
- LIU, C.; LIN, Q.; GAO, Y.; YE, L.; XING, Y. & XI, T. Characterization and antitumor activity of a polysaccharide from *Strongylocentrotus nudus* eggs. **Carboh. Polym.**, v. 67, p. 313-318, 2007.
- LIU, F.; OOI, V.E.C. & FUNG, M.C. Analysis of immunomodulating cytokine mRNAs in the mouse induced by mushroom polysaccharides. **Life Sci.**, v. 64, p. 1005-1011, 1999.
- LIU, K.; IDOYAGA, J.; CHARALAMBOUS, A.; FUJII, S.; BONITO, A.; MORDOH, J.; WAINSTOK, R.; BAI, X.F.; LIU, Y. & STEINMAN, R.M. Innate NKT lymphocytes confer superior adaptive immunity via tumor-capturing dendritic cells. **J. Exp. Med.**, v. 202, p. 1507–1516, 2005.
- LOLLINI, P.L.; CAVALLO, F.; NANNI, P. & FORNI, G. Vaccines for tumour prevention. **Nat. Rev. Canc.**, v. 6, p. 204–216, 2006.
- LOTHAR, B.; DANIEL, W.; HERMANN, M.; ELMAR, C.F.; WOLF-MEINHARD, B. & ARND, P. Structural and immunological properties of arabinogalactan polysaccharides from pollen of timothy grass (*Phleum pratense* L.). **Carboh. Res.**, v. 340, p. 657-663, 2005.
- MALONEY D.G. Immunotherapy for non-Hodgkin's lymphoma: monoclonal antibodies and vaccines. **J. Clin. Oncol.**, v. 23, p. 6421–6428, 2005.

- MANDAL, P.; MATEU, C.G.; CHATTOPADHYAY, K.; PUJOL, C.A.; DAMONTE, E.B. & RAY, B. Structural features and antiviral activity of sulphated fucans from the brown seaweed *Cystoseira indica*. **Antivir. Chem. Chemother.**, v. 18, p. 153-162, 2007.
- MARUYAMA, H.; NAKAJIMA, J. & YAMOTO, I. A study on the anticoagulant and fibrinolytic activities of a crude fucoidan from the edible brown seaweed *Laminaria religiosa*, with special reference to its inhibitory effect on the growth of sarcoma-180 ascites cells subcutaneously implanted into mice. **Kitas. Arc. Exp. Med.**, v. 60, p. 105-121, 1987.
- MAO, C.; KOUTSKY, L.A.; AULT, K.A.; WHEELER, C.M.; BROWN, D.R.; WILEY, D.J.; ALVAREZ, F.B.; BAUTISTA, O.M.; JANSEN, K.U. & BARR, E. Efficacy of human papillomavirus-16 vaccine to prevent cervical intraepithelial neoplasia: a randomized controlled trial. **Obstet. Gynecol.**, v. 107, p. 18-27, 2006.
- MARTINEZ-MALDONADO, M.; STAVROULAKI-TSAPARA, A.; TSAPARAS, H.; SUKI, W.N. & EKNOYAN, G. Renal effects of lithium administration in rats: Alteration in water and electrolyte metabolism and the response to vasopressin and cyclicadenosine monophosphate during prolonged administration. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 86, p. 445-461, 1975.
- MARTINS, A.; LIMA, A.; TOYAMA, M.; MARANGONI, S.; FONTELES, M. & MONTEIRO, H. Renal effects of supernatant from macrophages activated by *Crotalus durissus cacavella* venom: The role of phospholipase A<sub>2</sub> and cyclooxygenase. **Pharm. & Toxic.**, v. 92, p. 14-20, 2003.
- MASCARELL, L.; FAYOLLE, C.; BAUCHE, C.; LADANT, D. & LECLERC, C. Induction of neutralizing antibodies and Th1-polarized and CD4-independent CD8<sub>T</sub> T-cell responses following delivery of human immunodeficiency virus type 1 Tat protein by recombinant adenylate cyclase of *Bordetella pertussis*. **J. Virol.**, v. 79, p. 9872-9884, 2005.
- MATSUMOTO, T. & YAMADA, H. Regulation of immune complexes binding of macrophages by pectic polysaccharide from *Bupleurum falcatum* L.: pharmacological evidence for the requirement of intracellular calcium/ calmodulin on Fc receptor up-regulation by bupleuran 2IIb. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 47, p. 152-156, 1995.
- MAZUMDER, S.; GHOSAL, P.K.; PUJOL, C.A.; CARLUCCI, M.J.; DAMONTE, E.B. & RAY, B. Isolation, chemical investigation and antiviral activity of polysaccharides from *Gracilaria corticata* (Gracilariaceae, Rhodophyta). **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 31, p. 87-95, 2002.
- MCGREGOR, D.D. The effect of sympathetic nerve stimulation on vasoconstrictor responses in perfused mesenteric blood vessels of the rat. **J. Physiol.**, v. 177, p. 21-30, 1965.
- MEIYU, G.; FUCHUAN, L.; XIANLIANG, X.; JING, L.; ZUOWEI, Y. & HUASHI, G. The potential molecular targets of marine sulfated polymannuroguronate interfering with HIV-1 entry. Interaction between SPMG and HIV-1 rgp120 and CD4 molecule. **Antivir. Res.**, v. 59, p. 127-135, 2003.
- METCALFE, D. D. Mast cells and mastocytosis. **Blood**, v. 112 (4), p. 946-956, 2008.

- MICHAELSEN, T.E.; GILJE, A.; SAMUELSEN, A.B.; HOGASEN, K. & PAULSEN, B.S. Interaction between human complement and a pectin type polysaccharide fraction, PMII, from the leaves of *Plantago major* L. *Scand. J. Immunol.*, v. 52, p. 483–490, 2000.
- MINEV, B.; HIPPEL, J.; FIRAT, H.; SCHMIDT, J.D.; LANGLADE-DEMOYEN, P. & ZANETTI, M. Cytotoxic T cell immunity against telomerase reverse transcriptase in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, v. 97, p. 4796-4801, 2000.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE **Estimativas 2008**: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2007, 94p.
- MIYAZAKI, K.; MIZUTANI, H.; KATABUCHI, H.; FUKUMA, K.; FUJISAKI, S. & OKAMURA, H. Activated (HLA-DR+) T- Lymphocyte subsets in cervical carcinoma and effects of radiotherapy and immunotherapy with sizofiran on cell mediated immunity and survival. *Gynec. Oncol.*, v. 56, p. 412-420, 1995.
- MIZUTANI, Y. & YOSHIDA, O. Activation by the protein-bound polysaccharide PSK (Krestin) of cytotoxic lymphocytes that act on fresh autologous tumor cells and T24 human urinary bladder transitional carcinoma cell line in patients with urinary bladder cancer. *J. Urol.*, v. 145, p. 1082–1087, 1991.
- MOLTO, L.M.; CARBALLIDO, J.; JURINCIC, C.; LAPENA, P.; MANZANO, L.; SALMERON, I.; KLIPPEL, K.F. & ALVAREZ-MON, M. Keyhole limpet hemocyanine can enhance the natural killer activity of patients with transitional cell carcinoma of the bladder. *Eur. Urol.*, v. 19, p. 74-78, 1991.
- MOREIRA, A. L., SAMPAIO, E. P., ZMUIDZINAS, A., FRINDT, P., SMITH, K. A. & KAPLAN, G. Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor alpha by enhancing mRNA degradation. *J. Exp. Med.*, v. 177, p. 1675–1680, 1993.
- MORINAGA, Y.; SUGA, Y.; EHARA, S.; HARADA, K.; NIHEI, Y. & SUZUKI, M. Combination effect of AC-7700, a novel combretastatin A-4 derivative, and cisplatin against murine and human tumors in vivo. *Cancer Sci.*, v. 94, p. 200–204, 2003.
- MORON, G.; DADAGLIO, G. & LECLERC, C. New tools for antigen delivery to the MHC class I pathway. *Trends Immunol.*, v. 25, v. 92–97, 2004.
- MORRIS, C. J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. *Methods Mol. Biol.*, v. 225, p. 115–121, 2003.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.*, v. 16, p. 55 – 63, 1983.
- MOURÃO, P.A.S. Use of sulfated fucans as anticoagulant and antithrombotic agents: future perspectives. *Curr. Pharmaceut. Des.*, v. 10, p. 967-981, 2004.
- NAHTA, R. & ESTEVA, F.J. Herceptin: mechanisms of action and resistance. *Cancer Let.*, v. 232, p. 123–138, 2006.
- NAKANO, H.; NAMATAME, K.; NEMOTO, H.; MOTOHASHI, H.; NISHIYAMA, K. & KUMADA K. A multi-institutional prospective study of lentinan in advanced gastric cancer patients with unresectable and recurrent diseases: effect on prolongation of survival and improvement of quality of life. *Hepatogastroent.*, v. 46, p. 2662–2668, 1999.

- NAKASHIMA, H.; KIDO, Y.; KOBAYASHI, N.; MOTOKI, Y.; NEUSHUL, M. & YAMOTO, N. Purification and characterization of an avian myeloblastosis and human immunodeficiency virus reverse transcriptase inhibitor, sulfated polysaccharides extracted from sea algae. **Antimicrob. Agents Chemot.**, v. 31, p. 1524-1528, 1987.
- NISHINO, T.; NISHIOKA, C.; URA, H. & NAGUMO, T. Isolation and partial characterization of a novel amino sugar-containing fucan sulfate from commercial *Fucus vesiculosus* fucoidan. **Carboh. Res.**, v. 255, p. 213-224, 1994.
- NOWELL, P.C. The clonal evolution of tumor cell populations. **Science**, v. 194, p. 23-28, 1976.
- OEHNINGER, S.; CLARK, G.F.; ACOSTA, A.A. & HODGEN, G.D. Nature of the inhibitory effect of complex saccharide moieties on the tight binding of human spermatozoa to the human zona pellucida. **Fertil. Steril.**, v. 55, p. 165-169, 1991.
- OGATA, M.; MATSUI, T.; KITA, T. & SHIGEMATSU, A. Carrageenan primes leukocytes to enhance lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 3284-3289, 1999.
- OHNISHI, M.; KIMURA, S.; YAMAZAKI, M.; OSHIMA, H.; MIZUNO, D.I.; ABE, S. & YAMAGUCHI, H. Anti-tumour activity of low-toxicity lipopolysaccharide of *Bordetella pertussis*. **Br. J. Cancer**, v. 69, p. 1038-1042, 1994.
- OHWADA, S.; KAWATE, S.; IKEYA, T.; YOKOMORI, T.; KUSABA, T.; ROPPOGI, T.; TAKAHASHI, T.; NAKAMURA, S.; KAWASHIMA, Y.; NAKAJIMA, T. & MORISHITA, Y. Adjuvant therapy with protein-bound polysaccharide K and tegafur uracil in patients with stage II or III colorectal cancer: randomized, controlled trial. **Dis. Colon Rectum**, v. 46, p. 1060-1068, 2003.
- OKAI, Y.; HIGASHI-OKAI, K.; ISHIZAKA, S. & YAMASHITA, U. Enhancing effect of polysaccharides from an edible brown alga, *Hijikia fusiforme* (Hijiki), on release of tumor necrosis factor-alpha from macrophages of endotoxin-nonresponder C3H/HeJ mice. **Nutr. Cancer**, v. 27, p. 74-79, 1997.
- OKAZAKI, M.; ADACHI, Y.; OHNO, N. & YADOMAE, T. Structure-activity relationship of (1→3)-β-D-glucans in the induction of cytokine production from macrophages, *in vitro*. **Biol. Pharmac. Bull.**, v. 18, p. 1320-1327, 1995.
- OLAFSDOTTIR, E.S.; INGOLFSDOTTIR, K.; BARSETT, H.; PAULSEN, B.S.; JURCIC, K. & WAGNER, H. Immunologically active (1→3)-(1→4)-alpha-D-glucan from *Cetraria islandica*. **Phytomed.**, v. 6, p. 33-39, 1999.
- OLSEN, S., & SOLEZ, K. **Acute tubular necrosis and toxic renal injury**. In: C.C. Tisher, & B.M. Brenner, Renal Pathology: with clinical and functional correlations (pp. 769-809). Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 1994.
- OOI, C.V. & LIU, F. Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes. **Current. Med. Chem.**, v. 7, p. 715-729, 2000.
- OOI, E.V. & ANG, JR. P.O. Antiviral polysaccharides isolated from Hong Kong brown seaweed *Hydroclathrus clathratus*. **Sci. China Ser. C-Life Sci.**, v. 50, p. 611-618, 2007.

- ORBACH, H.; TISHLER, M.; & SHOENFELD, Y. Intravenous immunoglobulin and the kidney- a two-edged sword. **Semin. Arthritis Rheum.**, v. 34, p. 593-601, 2004.
- PAULSEN, B.S. Plant polysaccharides with immunostimulatory activities. **Curr. Org. Chem.**, v. 5, p. 939-950, 2001.
- PANARES, R.L. & GARCIA, A.A. Bevacizumab in the management of solid tumors. **Exp. Rev. Anticanc. Ther.**, v. 7, p. 433-445, 2007.
- PARDOLL, D.M. Spinning molecular immunology into successful immunotherapy. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 2, p. 227-238, 2002.
- PASHINE, A.; VALIANTE, N.M. & ULMER, J.B. Targeting the innate immune response with improved vaccine adjuvants. **Nat. Med.**, v. 11, p. 563-68, 2005.
- PEISER, L.; MUKHOPADHYAY, S. & GORDON, S. Scavenger receptors in innate immunity. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 14, p. 123-128, 2002.
- PONCE, N.M.A.; PUJOL, C.A. & DAMONTE, E.B. Fucoidans from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*: extraction methods, antiviral activity and structural studies. **Carbohydr. Res.**, v. 338, p. 153-165, 2003.
- PRINS, R.M.; CRAFT, N.; BRUHN, K.W.; KHAN-FAROOQI, H.; KOYA, R.C.; STRIPECKE, R.; MILLER, J.F. & LIAU, L.M. THE TLR-7 AGONIST, IMIQUIMOD, ENHANCES DENDRITIC CELL SURVIVAL AND PROMOTES TUMOR antigen-specific T cell priming: relation to central nervous system antitumor immunity. **J. Immunol.**, v. 176, p. 157-164, 2006.
- PUGH, N. & PASCO, D.S. Characterization of human monocyte activation by a water soluble preparation of Aphanizomenon flos-aquae. **Phytomed.**, v. 8, p. 445-453, 2001.
- QUATAN, N.; SPICER, J.; PLUNKETT, T. & PANDHA, H. Cellular Immunotherapy for Cancer: Current Concepts and Clinical Perspectives Scientific Basis and Approaches for Therapeutic Cancer Vaccines: Part I. **Clin. Oncol.**, v. 16, p. 356-365, 2004.
- QIU, X.D.; AMARASEKARA, A. & DOCTOR, V. Effect of oversulfation on the chemical and biological properties of fucoidan. **Carbohydrate Polymers.**, v. 63, p. 224-228, 2006.
- QUEIROZ, K.C.S.; MEDEIROS, V.P.; QUEIROZ, L.S.; ABREU, L.R.D.; ROCHA, H.A.O.; FERREIRA, C.V.; JUCA, M.B.; AOYAMA, H. & LEITE, E.L. Inhibition of reverse transcriptase activity of HIV by polysaccharides of brown algae. **Biomed. Pharmacother.**, v. 62, p. 303-307, 2008.
- RAMON, G.; CHASSIGNEUX, A.; RICHOU, R.; & GERBEAUX, C. Sodium nucleate, immunity adjuvant and stimulant. **C. R. Hebd. Seances. Acad. Sci.**, v. 235, p. 111-114, 1952.
- REDDY, S.T.; REHOR, A.; SCHMOEKEL, H.G.; HUBBELL, J.A. & SWARTZ, M.A. In vivo targeting of dendritic cells in lymph nodes with poly(propylene sulfide) nanoparticles. **J. Control Rel.**, v. 112, p. 26-34, 2006.

- RELIGA, P.; KAZI, M.; THYBERG, J.; GACIONG, Z.; SWEDENBORG, J.; HEDIN, U. Fucoidan inhibits smooth muscle cell proliferation and reduces mitogen-activated protein kinase activity. **Europ. J. Vasc. Endovasc. Surg.**, v. 20, p. 419-426, 2000.
- RENN, D.W. Biotechnology and the red seaweed polysaccharide industry: status, needs and prospects. **Tibtech.**, v. 15, p. 9-14, 1997.
- RESCIGNO, M.; AVOGADRI, F. & CURIGLIANO, G. Challenges and prospects of immunotherapy as cancer treatment. **Bioch. Bioph. Acta**, v. 1776, p. 108–123, 2007.
- RIBEIRO, R. A., SOUZA-FILHO, M. V., SOUZA, M. H., OLIVEIRA, S. H., COSTA, C. H., CUNHA, F. Q., & FERREIRA, H. S. Role of resident mast cells and macrophages in the neutrophil migration induced by LTB<sub>4</sub>, fMLP and C5a des arg. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 112 (1), p. 27-35, 1997.
- RONGHUA, H.; YUMIN, D. & JIANHONG, Y. Preparation and *in vitro* anticoagulant activities of alginate sulfate and its quaterized derivatives. **Carboh. Res.**, v. 52, p. 19–24, 2003.
- ROSS, G.D. & VETVICKA, V. CR3 (CD11b, CD18): a phagocyte and NK cell membrane receptor with multiple ligand specificities and functions. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 92, p. 181–184, 1993.
- ROUND, E.F. **Biologia das Algas**. 2<sup>a</sup> ed., Rio de Janeiro, 1973.
- RUIZ-BRAVO, A.; JIMENEZ-VALERA, M.; MORENO, E.; GUERRA, V. & RAMOS-CORMENZANA, A. Biological response modifier activity of an exopolysaccharide from *Paenibacillus jamilae* CP-7. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 8, p. 706-710, 2001.
- SAITO, K.; NISHIJIMA, M. & MIYAZAKI, T. Structure of a heterglycan isolated from the fungus *Omphalia lapidescens*. **Carboh. Res.**, v. 224, p. 209-217, 1992.
- SAKAGAMI, H.; IKEDA, M.; UNTEN, S.; TAKEDA, K.; MURAYAMA, J. & HAMADA, A. Antitumour activity of polysaccharide fractions from pine cone extract of *Pinus parviflora* Sieb. et Zucc. **Anticanc. Res.**, v. 7, p. 1153-1159, 1987.
- SAKURAI, T.; OHNO, N.; SUZUKI, I. & YADOMAE, T. Effect of soluble fungal (1→3)-β-D-glucan obtained from *Sclerotinia sclerotiorum* on alveolar macrophage activation. **Immunoph.**, v. 30, p. 157-166, 1995.
- SALGALLER, M.L. Prostate cancer immunotherapy at the dawn of the new millennium. **Expert. Op. Investig. Drugs**, v. 6, 9, p. 1217-1229, 2000.
- SAMPAIO, E. P., SARNO, E. N., GALILLY, R., COHN, Z. A., & KAPLAN, G. Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated human monocytes. **J. Exp. Med.**, v. 173, p. 699–703, 1991.
- SAMPAIO, E. P., MORAES, M. O., NERY, J. A., SANTOS, A. R., MATOS, H. C., & SARNO, E. N. Pentoxifylline decreases *in vivo* and *in vitro* tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) production in lepromatous leprosy patients with erythema nodosum leprosum (ENL). **Clin. Exp. Immunol.**, v. 111, p. 300–308, 1998.



- SASAKI, H.; KOBAYASHI, M.; POLLARD, R.B. & SUZUKI, F. Effects of Z-100, a *Mycobacterium-tuberculosis*-derived arabinomannan, on the LP-BM5 murine leukemia virus infection in mice. **Pathobiol.**, v. 69, p. 96-103, 2001.
- SCHEPETKIN, I.A.; FAULKNER, C.L.; NELSON-OVERTON, L.K.; WILEY, J.A. & QUINN, M.T. Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Juniperus scopolorum*. **Int. Immunoph.**, v. 5, p. 1783-1799, 2005.
- SCHEPETKIN, I.A. & QUINN, M.T. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. **Int. Immunoph.**, v. 6, p. 317-333, 2006.
- SCHEUER, P. J. & LEFKOWITCH, J.H. **Drugs and toxins**. In: Scheuer, P.J., Lefkowitz, J.H (Eds.), Liver biopsy interpretation, 6th ed. WB Saunders, London, 2000, p. 134-150.
- SCHIAVO, R.; BAATAR, D.; OLKHANUD, P.; INDIG, F.E.; RESTIFO, N.; TAUB, D. & BIRAGYN, A. Chemokine receptor targeting efficiently directs antigens to MHC class I pathways and elicits antigen-specific CD8<sub>T</sub>-cell responses. **Blood**, v. 107, p. 4597–4605, 2006.
- SCHULER, G.; SCHULER-THURNER, B.; STEINMAN, R.M. The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 15, p. 138–47, 2003.
- SHARON, N. & LIS, H. Carbohydrates in cell recognition. **Scient. Americ.**, p. 74-81, 1993.
- SHEPHERD, V.L.; TARNOWSKI, B.I. & MCLAUGHLIN, B.J. Isolation and characterization of a mannose receptor from human pigment epithelium. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 32, p. 1779–1784, 1991.
- SHEVDE, L.A.; WELCH, D.R. Metastasis suppressor pathways—an evolving paradigm. **Cancer Letters**, v. 198, p. 1-20, 2003.
- SHIMIZU, J.; WADA-FUNADA, U.; MANO, H.; MATAHIRA, Y.; KAWAGUCHI, M. & WADA, M. Proportion of murine cytotoxic T cells is increased by high molecular-weight fucoidan extracted from *Okinawa mozuku* (*Cladosiphon okamuranus*). **J. Health Sci.**, v. 51, p. 394-397, 2005.
- SHIMIZU, K.; THOMAS, E.K.; GIEDLIN, M. & MULE, J.J. Enhancement of tumor lysate- and peptide-pulsed dendritic cell-based vaccines by the addition of foreign helper protein. **Cancer Res.**, v. 61, p. 2618-2624, 2001.
- SHOEMAKER, R. Antitumor drug screening with a human tumor colony forming assay (HTCFA). **Proc. Am. Assoc. Cancer Res.**, v. 25, p. 1292, 1984.
- SILK, J.D.; HERMANS, I.F.; GILEADI, U.; CHONG, T.W.; SHEPHERD, D.; SALIO, M.; MATHEW, B.; SCHMIDT, R.R.; LUNT, S.J.; WILLIAMS, K.J. et al. Utilizing the adjuvant properties of CD1d-dependent NK T cells in T cell-mediated immunotherapy. **J. Clin. Invest.**, v. 114, p. 1800–1811, 2004.
- SINGH, R.K., GUTMAN, M., BUCANA, C.D., SANCHEZ, R., LLANSA, N. & FIDLER, I.J. Interferons alpha and beta down-regulate the expression of basic fibroblast growth factor in human carcinomas. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, p. 4562–4566, 1995.

- SINGH, M. & O'HAGAN, D. Advances in vaccine adjuvants. **Nat. Biotechnol.**, v. 17, p. 1075-1081, 1999.
- SMIT, A.J. Medicinal and Pharmaceutical uses of seaweed natural products: a review. **J. Appl. Phycol.**, v. 16, p. 245-262, 2004.
- SONG, J.Q.; XU, Y.T. & ZHANG, H.K. Immunomodulation action of sulfate polysaccharide of *Laminaria japonica* on peritoneal macrophages of mice. **Chin. J. Immunol.**, v. 16, p. 70-75, 2000.
- SONG, J.Y.; YANG, H.O.; PYO, S.N.; JUNG, I.S.; YI, S.Y. & YUN, Y.S. Immunomodulatory activity of protein-bound polysaccharide extracted from *Chelidonium majus*. **Arch. Pharmac. Res.**, v. 25, p. 158-164, 2002.
- SOUSA, A.P.A.; TORRES, M.R., PESSOA, C.; MORAES, M.O.; FILHO, F.D.R.; ALVES, A.P.N.N. & COSTA-LOTUFO, L.V. *In vivo* growth-inhibition of Sarcoma 180 tumor by alginates from brown seaweed *Sargassum vulgare*. **Carboh. Polym.**, v. 69, p. 7-13, 2006.
- SOUSA, A.P.A.; BARBOSA, P.S.F.; TORRES, M.R.; MARTINS, A.M.C.; MARTINS, R.D.; ALVES, R.S.; SOUSA, D.F.; ALVES, C.D.; COSTA-LOTUFO, L.V. & MONTEIRO, H.S.A. The renal effects of alginates isolated from brown seaweed *Sargassum vulgare*. **J. App. Toxicol.**, v. 28, p. 364-369, 2008.
- SOUZA, G. E. P., & FERREIRA, S. H. Blockade by anti-macrophages serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. **Agents Actions**, v. 17, p. 97-103, 1985.
- SPORN, M.B. The war on cancer. **Lancet**, v. 347, p. 1377-1381, 1996.
- STEINMAN, R.M. & NUSSENZWEIG, M.C. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 99, p. 351-358, 2002.
- STRASSER, S.; GUERON, M.; WHITE, R.; LIFSHITZ, M. & APTE, R. Interleukin-6 release following scorpion sting in children. **Toxicon.**, v. 34, p. 389-392, 1996.
- STUART, R.W.; LEFKOWITZ, D.L.; LINCOLN, J.A.; HOWARD, K.; GELDERMAN, M.P. & LEFKOWITZ, S.S. Upregulation of phagocytosis and candidicidal activity of macrophages exposed to the immunostimulant acemannan. **Int. J. Immunopharmacol.**, v. 19, p. 75-82, 1997.
- SUN, J; ZHANG, X; BRODERICK, M. & FEIN, H. Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess reaction assay. **Sensors.**, v. 3, p. 276-284, 2003.
- SZECHY, M. & PAULA, E. Padrões estruturais quantitativos de bancos de *Sargassumi* (Phaeophyta- Fucales) do litoral dos Estados do Rio de Janeiro e São Paul, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 23, p. 121-132, 2000.
- TACKEN, P.J.; DE VRIES, I.J.; GIJZEN, K.; JOOSTEN, B.; WU, D.; ROTHER, R.P.; FAAS, S.J.; PUNT, C.J.; TORENSMA, R.; ADEMA, G.J. & FIGDOR, C.G. Effective induction of naive and recall T-cell responses by targeting antigen to human dendritic cells via a humanized anti-DC-SIGN antibody. **Blood**, v. 106, p. 1278-1285, 2005.

- TAGUCHI, T.; FURUE, H.; KIMURA, T.; KONDO, T.; HATTORI, T.; ITOH, T. & OSAWA, N. End point results of phase III study of lentinan. **Japan. J. Cancer Chemot.**, v. 12, p. 366 – 380, 1985.
- TAKAGUCHI, N.; SAITO, N.; NUNOURA, M.; KOUUDA, K.; ODA, K. & FURUYAMA, N. Use of 5-FU plus hyperbaric oxygen for treatment malignant tumors: evaluation of antitumor effect and measurement of 5-FU in individual organs. **Cancer Chemot. Pharmac.**, v. 47, p. 11-14, 2001.
- TAO, Y.; ZHANG, L. & CHEUNG, P.C.K. Physicochemical properties and antitumor activities of water-soluble native and sulfated hyperbranched mushroom polysaccharides. **Carboh. Res.**, v. 341, p. 2261-2269, 2006.
- TIMMERMAN, J.M.; CZERWINSKI, D.K.; DAVIS, T.A.; HSU, F.J.; BENIKE, C.; HAO, Z.M.; TAIDI, B.; RAJAPAKSA, R.; CASPAR, C.B.; OKADA, C.Y.; VAN BECKHOVEN, A.; LILES, T.M.; ENGLEMAN, E.G. & LEVY, R. Idiotype-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immune responses in 35 patients. **Blood**, v. 99, p. 1517–1526, 2002.
- TRINCHERO, J.; PONCE, N.M.A.; CORDOBA, O.L.; FLORES, M.L.; PAMPURO, S.; STORTZ, C.A.; SALOMON, H. & TURK, G. Antiretroviral activity of fucoidans extracted from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*. **Phytother. Res.**, v. 23, p. 707–712, 2009.
- TRUMPFHELLER, C.; FINKE, J.S.; LOPEZ, C.B.; MORAN, T.M.; MOLTEDO, B.; SOARES, H.; HUANG, Y.; SCHLESINGER, S.J.; PARK, C.G.; NUSSENZWEIG, M.C. et al. Intensified and protective CD4<sub>+</sub> T cell immunity in mice with anti-dendritic cell HIV gag fusion antibody vaccine. **J. Exp. Med.**, v. 203, p. 607–617, 2006.
- TZIANABOS, A.O. Polysaccharides immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biological function. **Clin. Microb. Rev.**, v. 13, p. 523-533, 2000.
- UDAGAWA, M.; KUDO-SAITO, C. & HASEGAWA, G. Enhancement of immunologic tumor regression by intratumoral administration of dendritic cells in combination with cryoablative tumor pretreatment and Bacillus Calmette–Guerin cell wall skeleton stimulation. **Clin. Cancer Res.**, v. 12, p. 7465–7475, 2006.
- UTO, T.; WANG, X.; SATO, K.; HARAGUCHI, M.; AKAGI, T.; AKASHI, M. & BABA, M. Targeting of antigen to dendritic cells with poly gamma-glutamic acid nanoparticles induces antigen-specific humoral and cellular immunity. **J. Immunol.**, v. 178, p. 2979–2986, 2007.
- VAN BROEKHOVEN, C.L.; PARISH, C.R.; DEMANGEL, C.; BRITTON, W.J. & ALTIN, J. G. Targeting dendritic cells with antigen-containing liposomes: a highly effective procedure for induction of antitumor immunity and for tumor immunotherapy. **Cancer Res.**, v. 64, p. 4357–4365, 2004.
- VENDITI, J.M. The National Cancer Institute antitumor drug discovery program, current and future perspective: a commentary. **Cancer Treat. Rep.**, v. 67, p. 767, 1983.
- VINEGAR, R., SCHREIBER, W., & HUGO, R. Biphasic development of carrageenan edema in rat. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 166, p. 96–103, 1969.

- VINEGAR, R., TRUAX, J. F., SELPH, J. L., & VOELKER, F. A. Pathway of onset, development, and decay of carrageenan pleurisy in the rat. **Fed. Proc.**, v. 41, p. 2588–2595, 1982.
- VOLPERT, O.V., DAMERON, K.M., & BOUCK, N. Sequential development of an angiogenic phenotype by human fibroblasts progressing to tumorigenicity. **Oncogene**, v. 14, p. 1495–1502, 1997.
- VONDERHEIDE, R.H.; HAHN, W.C.; SCHULTZE, J.L. & NADLER, L.M. The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. **Immunity**, v. 10, p. 673-679, 1999.
- WALSER, M.; DAVIDSON, D.G. & ORLOFF, J. The renal clearance of alkali-stable inulin. **J. Clin. Invest.**, v. 34, p. 1520–1523, 1955.
- WANG, S.C., BLIGH, S.W.A.; SHI, S.S.; WANG, Z.T.; HU, Z.B.; CROWDER, J.; BRANFORD-WHITE, C. & VELLA, C. Structural features and anti-HIV-1 activity of novel polysaccharides from red algae *Grateloupia longifolia* and *Grateloupia filicina*. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 41, p. 369–375, 2007.
- WASSER, S.P. Medicinal mushrooms as a source of antitumour and immunomodulating polysaccharides. **App. Microb. Biotech.**, v. 60, p. 258-274, 2002.
- WECK, M.M.; GRUNEBACH, F.; WERTH, D.; SINZGER, C.; BRINGMANN, A. & BROSSART, P. TLR ligands differentially affect uptake and presentation of cellular antigens. **Blood**, v. 109, p. 3890–3894, 2007.
- WEINBERG, R.A. The retinoblastoma protein and cell cycle control. **Cell**, v. 81, p. 323-330, 1995.
- WILLMENT, J.A.; MARSHALL, A.S.; REID, D.M.; WILLIAMS, D.L.; WONG, S.Y.; GORDON, S. & BROWN, G.D. The human  $\beta$ -glucan receptor is widely expressed and functionally equivalent to murine Dectin-1 on primary cells. **Eur. J. Immunol.**, v. 35, p. 1539–1547, 2005.
- WINTER, C. A., RISLEY, E. A., & NUSS, G. W. Carrageenan induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proc. Soc. Exp. Biol.**, v. 111, p. 544–547, 1962.
- WITROW, M.; ESTE, J.A.; MATEU, M.Q.; REYMEN, D.; ANDREI, G.; SNOEK, R.; IKEDA, S.; PAUWELS, R.; BIANCHINI, N.V.; DESMYTER, J. & DE CLERCQ, E. Activity of a sulfated polysaccharide extracted from the red seaweed *Aghardhiella tenera* against human immunodeficiency virus and other enveloped viruses. **Antiv. Chem. Chemot.**, v. 5, p. 297-303, 1994.
- WYLLIE, A.H.; KERR, J.F. & CURRIE, A.R. Cell death: the significance of apoptosis. **Int. Rev. Cytol.**, v. 68, p. 251-306, 1980.
- World Cancer Report.** Eds: Stewart, B. W. & Kleihues, P., IARC Press, Lyon, 2003.

- XIA, J.; TANAKA, Y.; KOIDO, S.; LIU, C.; MUKHERJEE, P.; GENDLER, S.J. & GONG, J. Prevention of spontaneous breast carcinoma by prophylactic vaccination with dendritic/tumor fusion cells. **J. Immunol.**, v. 170, p. 1980–1986, 2003.
- YALIN, W.; ISHURD, O.; CUIRONG, S. & YUANJIANG, P. Structure analysis and antitumor activity of (1→3)- $\beta$ -D-glucans (cordyglucans) from the mycelia of *Cordyceps sinensis*. **Planta Med.**, v. 71, p. 381-384, 2005.
- YANG, D., & JONES, K. S. Effect of alginate on innate immune activation of macrophages. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 90, p. 411–418, 2009.
- YANG, Q.; JONG, S.; LI, X.; ZHOU, J.; CHEN, R. & XU, L. Antitumour and immunomodulating activities of the polysaccharide-peptide (PSP) of *Coriolus versicolor*. **J. Immun. Immunoph.**, v. 12, p. 29-34, 1992.
- YANG, Q. & YUN, Z. **Polysaccharopeptide (PSP) and the general aspects of its research**. In: Yang Q, editor. Advanced Research in PSP, 1999. Hong Kong: Hong Kong Association for Health Care Ltd; p. 29–38, 1999.
- YANG, X.; GUO, D.; ZHANG, J. & WU, M. Characterization and antitumor activity of pollen polysaccharide. **Int. Immunopharmacol.**, v. 7, p. 427-434, 2007.
- YANG, X.L.; SUN, J.Y. & XU, H.N. An experimental study on immunoregulatory effect of fucoidan. **Chin. J. Marine Drugs**, p. 9-13, 1995.
- YOSHIZAWA, Y.; ENOMOTO, A.; TODOH, H.; AMETANI, A. & KAMINOGAWA, S. Activation of murine macrophages by polysaccharide fractions from marine algae (*Porphyra yezoensis*). **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 57, p. 1862–1866, 1993.
- YOSHIZAWA, Y.; TSUNEHIRO, J.; NOMURA, K.; ITOH, M.; FUKUI, F., AMETANI, A. & KAMINOGAWA, S. *In vivo* macrophage-stimulation activity of the enzyme-degraded water-soluble polysaccharide fraction from a marine alga (*Gracilaria verrucosa*). **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 60, p. 1667–1671, 1996.
- YUAN, H.M. & SONG, J.M. Preparation, structural characterization and *in vitro* antitumor activity of kappa-carrageenan oligosaccharide fraction from *Kappaphycus striatum*. **J. Appl. Phycol.**, v. 17, p. 7-13, 2005.
- YUN, C.H.; ESTRADA, A.; VAN KESSEL, A.; GAJADHAR, A.A.; REDMOND, M.J. & LAARVELD, B.  $\beta$ -(1→3, 1→4) oat glucan enhances resistance to *Eimeria vermiformis* infection in immunosuppressed mice. **Int. J. Parasitol.**, v. 27, p. 329-337, 1997.
- ZHANG, P. & CHEUNG, P.C.K. Evaluation of sulfated *Lentinus edodes*  $\alpha$ -(1→3)-D-glucan as a potential antitumor agent. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 66, p. 1052-1056, 2002.
- ZHANG, M.; CUI, S.W.; CHEUNG, P.C.K. & WANG, Q. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. **Trends Food Sci. Tech.**, v. 18, p. 4-19, 2007.
- ZHOU, G.; SUN, Y.; XIN, H.; ZHANG, Y.; LI, Z. & XU, Z. *In vivo* antitumor and immunomodulation activities of different molecular weight lambda-carrageenans from *Chondrus ocellatus*. **Pharmacol. Res.**, v. 50, p. 47–53, 2004.

ZITVOGEL, L.; TESNIERE, A. & KROEMER, G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. **Tumor immunology**, v. 6, p. 715-727, 2006.

*Anexos*

## Materiais utilizados

### Equipamentos

- Agitador de placa, MLW modelo Thys 2
- Agitador vortex, AD8850
- Balança analítica, GEHAKA AG200
- Balança para pesar animais, Filizola
- Banho-Maria, MOD. 105 DI DELLTA
- Câmara de Neubauer, Clay Adams
- Centrífuga centimicro, FANEM Modelo 212
- Centrífuga de lâminas, Shandon Shouthern Cytospin
- Centrífuga de placas Eppendorf, Modelo Centrifuge 5403
- Centrífuga excelsa Baby I, FANEM Modelo 206
- Contador manual, Division of Bexton, Dickinson and Company
- Destilador de água
- Espectrofotômetro de placas, DTX 880 multimode detector, Beckman Coulter
- Estufa incubadora de CO<sub>2</sub>, Nuaire
- Fluxo laminar, VECO
- Fotômetro de chama, 443 IL
- HTS (*High throuput screeing* biomek 3000), Beckman Coulter
- Incubadora de células (CO<sub>2</sub> Water-Jacket Incubator), NUAIRES TS Autoflow
- Microscópio óptico, Metripex Hungray PZO-Labimex Modelo Studar lab
- Microscópio óptico de inversão, Nikon Diaphot
- Micrótomo – SLEE - MANZ BR1
- Pipetas automáticas, Gilson



- Pletismômetro, UGO BASILI
- Transdutor, Statham P23, Gould

### Reagentes

- Albumina bovina, Sigma
- Acetato de sódio, Vetec
- Ácido Acético, Vetec
- Ácido clorídrico (HCl), Vetec
- Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), Proquímios
- Aminobenzenosulfanilamida, Sigma
- Azul de Tripán 10%, Sigma
- Bicarbonato de Sódio, Dinâmica
- Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), Sigma
- Cloreto de sódio (NaCl), Vetec
- Dimetilsulfóxido (DMSO), Vetec
- Eosina, Vetec
- Etanol, Vetec
- Formaldeído, Dinâmica
- Fosfato de sódio, Labsynth
- Hematoxilina, Doles
- Heparina, Roche
- Hidróxido de sódio (NaOH), Vetec
- Meio de cultura para células RPMI, Cultilab
- Penicilina, Cultilab
- N-naftil-etilenodiamino (Need)

- Solução salina, Vetec
- Soro fetal bovino (SFB), Cultilab
- Tampão fosfato (PBS), Labsynth

### **Fármacos**

- Carragenana, FMC
- 5 – Fluorouracil, Sigma
- Gentamicina, Novafarma
- LPS, Sigma