



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

JOSÉ GERARDO CARNEIRO

EFEITOS DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DA ALGA MARINHA VERDE
Caulerpa mexicana Sonder ex Kützing NA NOCICEPÇÃO E INFLAMAÇÃO

FORTALEZA

2012

JOSÉ GERARDO CARNEIRO

EFEITOS DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DA ALGA MARINHA VERDE
Caulerpa mexicana Sonder ex Kützing NA NOCICEPÇÃO E INFLAMAÇÃO

Dissertação submetida à Coordenação do
Curso de Pós-Graduação em Bioquímica,
como requisito parcial para a obtenção do grau
de Mestre em Bioquímica.

Orientadora: Prof^a Dra. Norma Maria Barros
Benevides

FORTALEZA

2012

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

- C289e Carneiro, José Gerardo.
Efeito dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha *Caulerpa mexicana* Sonder ex Kützinger na nocicepção e inflamação / José Gerardo Carneiro – 2012.
80 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2012.
Área de Concentração: Bioquímica vegetal.
Orientação: Profa. Dra. Norma Maria Barros Benevides.
1. Chlorophyta. 2. Polissacarídeos sulfatados 3. Antinocicepção. I. Título.

CDD 574.192

JOSÉ GERARDO CARNEIRO

EFEITOS DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DA ALGA MARINHA VERDE
Caulerpa mexicana Sonder ex Kützing NA NOCICEPÇÃO E INFLAMAÇÃO

Dissertação submetida à Coordenação do
Curso de Pós-Graduação em Bioquímica,
como requisito parcial para a obtenção do grau
de Mestre em Bioquímica

Aprovada em: 23/08/2012.

BANCA EXAMINADORA

Norma Maria Barros Benevides

Profª. Dra. Norma Maria Barros Benevides (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará – UFC

Maria Gonçalves Pereira

Profª. Dra. Maria Gonçalves Pereira

Universidade Estadual do Ceará - UECE

Ianna Wivianne Fernandes de Araújo

Profª. Dra. Ianna Wivianne Fernandes de Araújo

Universidade Federal do Ceará - UFC

À Deus;
À Minha Família;
À minha esposa Manuela e
Ao meu filho João Arthur;
e aos meus amigos do CARBOLEC e IFCE.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Norma M. B. Benevides, por ter acreditado em minha capacidade, ter me acolhido em seu laboratório e contribuído para a minha formação científica.

À Profa. Hellfada e todos do Laboratório de Farmacologia da UFC – Sobral (LAF-SOL), por ter-me recebido tão gentilmente e estarem sempre prontos a contribuírem.

Aos meus amigos do Laboratório de Carboidratos e Lectinas (CARBOLEC) com quem tenho o prazer de conviver e quem sem a ajuda e dedicação este trabalho não teria acontecido.

Agradecimento especial ao Ariévilo, Edfranck, Ismael, Ricardo, à Aninha, Ianna, cris, agradeço pelas contribuições e pelo apoio constante durante as realizações dos meus experimentos.

Aos meus amigos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular que foram companheiros e sempre me ajudaram, em especial ao Ednézio, Woshington e Antônio Rocha.

Um agradecimento especial aos meus tios Marlene e Paulino e aos meus primos Julio César e Keila, pelo auxílio, apoio e incentivo desde a minha graduação.

Aos meus pais, Francisco das Chagas e Ana Maria Carneiro, por me ensinar o valor da persistência e determinação e pela família maravilhosa que temos.

À minha esposa Manuela e ao meu filho João Arthur por suporta minhas ausências e aborrecimentos e pelo apoio, companheirismo e paciência.

Acredito que esta vitória não é minha, mas nossa!

Obrigada a todos por tudo!

O presente trabalho foi desenvolvido com o apoio das seguintes instituições:

UFC – Universidade Federal do Ceará através do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, RENORBIO – Rede de Biotecnologia do Nordeste e FUNCAP - Fundação Cearense de Apoio à Pesquisa, que financiaram os projetos desenvolvidos no Laboratório de Carboidratos e Lectinas.

*Tenho a impressão de ter sido uma
criança brincando à beira-mar, divertindo-me
em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma
concha mais bonita que as outras, enquanto o
imenso oceano da verdade continua misterioso
diante de meus olhos.*

*Se eu vi mais longe, foi por estar de
pé sobre ombros de gigantes.*

Isaac Newton

RESUMO

Polissacarídeos sulfatados de algas marinhas são polímeros heterogêneos que representam biomoléculas de interesse comercial, principalmente nas indústrias alimentícia e farmacêutica. O presente trabalho teve como finalidade avaliar os efeitos dos polissacarídeos sulfatados totais (PST) da alga marinha verde *Caulerpa mexicana* em modelos clássicos de nocicepção e inflamação aguda em animais. Foram utilizados camundongos *Swiss* machos (18-25 g) e ratos *Wistar* machos (120-260 g). O rendimento de PST obtidos da extração por digestão enzimática foi de 1,7%. Na análise por espectroscopia na região do infravermelho foram caracterizados como polissacarídeos contendo, principalmente, galactose sulfatada e ácido urônico. Os PST da alga *C. mexicana* foram capazes de reduzir ($p < 0,05$) o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético (1%) em 31,8; 74,5 e 88,9% nas doses de 5, 10 e 20 (mg/kg; i.v.), respectivamente. No teste da formalina, os PST inibiram ($p < 0,05$) o tempo de lambertura da pata somente na segunda fase do teste (88,6 e 98,5% para as doses 10 e 20 mg/kg; i.v., respectivamente). No teste da placa quente, os PST não demonstraram efeito antinociceptivo no decorrer dos 90 minutos do teste. Desta forma, os resultados sugerem que os PST exerceram um efeito antinociceptivo de ação periférica. Em adição, os PST (5, 10 e 20 mg/kg) apresentaram efeito anti-inflamatório quando administrados por via s.c. em ratos *Wistar* no modelo de edema de pata induzido por carragenana, dextrana e histamina. Para analisar o envolvimento da via heme oxigenase (HO) no efeito anti-inflamatório dos PST (20 mg/kg; s.c.), os animais foram pré-tratados por via s.c. com um inibidor de HO específico (zinco protopofirina IX). Os resultados obtidos demonstraram que os PST foram capazes de reduzir o edema de pata induzido por carragenana na terceira hora, cujo resultado foi comprovado pela quantificação da mieloperoxidase. Além disso, os PST reduziram o edema induzido por dextrana ou histamina em modelos de edema de pata nos primeiros 30 minutos após a aplicação dos agentes flogísticos. O efeito anti-inflamatório dos PST no edema de pata induzido por carragenana não foi observado após inibição prévia por zinco protopofirina IX. Portanto, sugerimos que o efeito anti-inflamatório dos PST da alga *C. mexicana* pode estar relacionado com a inibição da liberação de histamina, redução da migração celular e ativação da via da HO. Para avaliar os efeitos sistêmicos dos PST, estes foram administrados por via i.v. (20 mg/kg) em camundongos em dose única e as alterações sistêmicas avaliadas durante 48 h. Os resultados obtidos demonstraram que os PST não causaram mortalidade e nem alterações macroscópicas significativas dos órgãos e dos parâmetros bioquímicos avaliados,

sendo, portanto, considerados seguros na dose testada. Em resumo, os PST da alga *C. mexicana* apresentaram efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios significativos, tornando-se uma importante ferramenta biotecnológica para estudos posteriores.

Palavras-chave: Chlorophyta, *Caulerpa mexicana*, polissacarídeos sulfatados totais, antinociceptiva, anti-inflamatória.

ABSTRACT

Sulfated polysaccharides from seaweed are heterogeneous polymers representing biomolecules of commercial interest, especially in food and pharmaceutical industries. The aim of this study was to evaluate the effects of total sulfated polysaccharides (TSP) of the green seaweed *Caulerpa mexicana* in classical models of nociception and acute inflammation in animals. Swiss male mice (18-25 g) and male Wistar rats (120-260 g) were used. The yield of the extraction of TSP obtained by enzymatic digestion was 1.7%. In analysis by Fourier transformed infrared were characterized as polysaccharides containing mainly sulfated galactose and uronic acid. The TSP of the alga *C. mexicana* were able to decrease ($p < 0.05$) the number of writhes induced by acetic acid (1%) on 31.8, 74.5 and 88.9% at doses of 5, 10 and 20 mg/kg; i.v., respectively. In the formalin test, the TSP inhibited ($p < 0.05$) the licking time of the paw only on the second of the test phase (88.6 and 98.5% for the doses 10 and 20 mg/kg; i.v., respectively). In the hot plate test, the TSP did not show antinociceptive effect in the course of 90 minutes of the test. Thus, the results suggest that the TSP presented analgesic effect by a peripheral action. In addition, TSP (5, 10 and 20 mg/kg) showed anti-inflammatory effect when administered s.c. in rats on paw edema models induced by carrageenan, dextran or histamine. To analyze the involvement of heme oxygenase (HO) pathway in the anti-inflammatory effect of TSP (20 mg/kg, sc), the animals were pretreated (s.c.) with a specific HO inhibitor (zinc protoporphyrin IX). The results showed that the TSP were able to reduce the paw edema induced by carrageenan in the third hour, which was confirmed by myeloperoxidase quantification. In addition, the TSP reduced the edema induced by dextran or histamine in paw edema models in the first thirty minutes after application of the proinflammatory agents. The anti-inflammatory effect of TSP on paw edema induced by carrageenan was not observed after prior inhibition by zinc protoporphyrin IX. Therefore, we suggest that the anti-inflammatory effect of TSP of the alga *C. mexicana* may be related to inhibition of the histamine release, reduction of cell migration and activation of the HO pathway. To evaluate the systemic effects of TSP, they were administered (i.v.) in mice (20 mg/kg) in a single-dose and evaluated the systemic changes for 48 h. The results showed that the TSP did not cause mortality or significant alterations on organs and on biochemical parameters being considered safe in the tested dose. In summary, the TSP from the algae *C. mexicana* have showed significant antinociceptive and anti-inflammatory effects, becoming an important biotechnological tool for further studies.

Keywords: Chlorophyta, *Caulerpa mexicana*, total sulfated polysaccharides, antinociceptive, anti-inflammatory.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	Espécime da alga marinha verde <i>Caulerpa mexicana</i>	36
FIGURA 2	Eletroforese em gel de agarose do polissacarídeos sulfatados totais da alga <i>Caulerpa mexicana</i> , corada com azul de toluidina.....	44
FIGURA 3	Espectro de IV na região entre 4000 a 500 do PST obtido da alga marinha verde <i>Caulerpa mexicana</i>	45
FIGURA 4	Efeito do PST no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos.....	47
FIGURA 5	Efeito dos PST no teste da formalina em camundongos.....	49
FIGURA 6	Efeito antinociceptivo dos PST no teste da placa quente em camundongos.....	52
FIGURA 7	Efeito dos PST no modelo de edema de pata induzido por carragenana em ratos.....	54
FIGURA 8	Atividade da mieloperoxidase no homogenato do tecido das patas dos animais tratados com Cg.....	56
FIGURA 9	Efeito dos PST no modelo de edema de pata induzido por dextrana em ratos.....	58
FIGURA 10	Efeito dos PST no modelo de edema de pata induzido por histamina em ratos.....	59
FIGURA 11	Efeito dos PST no modelo de edema de pata induzido por serotonina em ratos.....	60
FIGURA 12	Efeito da aplicação do zinco protoporfirina IX na ação dos PST no modelo de edema de pata induzido por carragenana em ratos.....	62
TABELA 1	Análises bioquímicas e do peso corporal e dos órgãos de camundongos submetidos a tratamento agudo com PST.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINES	Anti-inflamatórios não esteroidal
BV	Biliverdina
CO	Monóxido de carbono
COX	Ciclooxigenase
Cg	λ -Carragenana
CPC	Cloreto de cetilpiridínio
CS	Condroitim sulfato
DS	Dermatam sulfato
Dexa	Dexametasona
GAG	Glicosaminoglicanos
HO	Heme oxigenase
HS	Heparan sulfato
5-HT	5-hidroxitriptamina
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
μ g	Micrograma
μ L	Microlitro
MPO	Mieloperoxidase
mg	Miligrama
mL	Mililitro
M	Molar
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
PS	Polissacarídeos sulfatados
PST	Polissacarídeos sulfatados totais obtidos da alga <i>Caulerpa mexicana</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
TGO	Transaminase oxalacética
TGP	Transaminase pirúvica
U	Unidade
U/mg	Unidade por miligrama
v/v	volume/ volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Dor e Nocicepção.....	16
<i>1.1.1 Considerações gerais.....</i>	<i>16</i>
<i>1.1.2 Fisiopatologia da dor.....</i>	<i>17</i>
<i>1.1.3 Nocicepção e o Processo Inflamatório.....</i>	<i>18</i>
1.2 Inflamação.....	20
<i>1.2.1 Considerações Gerais.....</i>	<i>20</i>
<i>1.2.2 Eventos Vasculares.....</i>	<i>21</i>
<i>1.2.3 Principais células envolvidas na inflamação.....</i>	<i>22</i>
<i>1.2.4 Mediadores inflamatórios.....</i>	<i>23</i>
<i>1.2.4.1 Heme oxigenase.....</i>	<i>26</i>
<i>1.2.5 Fármacos analgésicos e anti-inflamatórios.....</i>	<i>28</i>
1.3 Algas marinhas.....	29
<i>1.3.1 Considerações Gerais.....</i>	<i>29</i>
<i>1.3.2 Gênero Caulerpa.....</i>	<i>30</i>
<i>1.3.3 Aplicações Biotecnológicas de Algas Marinhas.....</i>	<i>31</i>
1.4 Polissacarídeos Sulfatados.....	32
<i>1.4.1 Considerações Gerais.....</i>	<i>32</i>
<i>1.4.2 Polissacarídeos Sulfatados de Algas Marinhas.....</i>	<i>33</i>
<i>1.4.3 Atividades Biológicas de PS de Algas do Gênero Caulerpa.....</i>	<i>35</i>
2 OBJETIVOS.....	35
2.1 Geral.....	35
2.2 Específicos.....	35
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
3.1 Materiais.....	36
<i>3.1.1 Alga marinha.....</i>	<i>36</i>
<i>3.1.2 Animais.....</i>	<i>37</i>
3.2 Métodos.....	37
<i>3.2.1 Extração dos PST da alga <i>C. mexicana</i>.....</i>	<i>37</i>
<i>3.2.2 Análises química e físico-química dos PST da alga <i>C. mexicana</i>.....</i>	<i>38</i>
<i>3.2.2.1 Determinação do teor de carboidratos totais.....</i>	<i>38</i>
<i>3.2.2.2 Determinação do teor de sulfato.....</i>	<i>38</i>

3.2.2.3 Determinação do teor de proteínas contaminantes	38
3.2.2.4 Eletroforese em gel de agarose.....	38
3.2.2.5 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV).....	39
3.2.3 Atividade antinociceptiva.....	39
3.2.3.1 Testes de contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	39
3.2.3.2 Teste da formalina.....	39
3.2.3.3 Teste da placa quente.....	40
3.2.4 Atividade anti-inflamatória.....	40
3.2.4.1 Edema de pata induzido por carragenana.....	40
3.2.4.2 Determinação da atividade de mieloperoxidase (MPO).....	41
3.2.4.3 Edema de pata induzido por dextrano.....	41
3.2.4.4 Edema de pata induzido por histamina e serotonina.....	41
3.2.4.5 Participação da via heme oxigenase no efeito anti-inflamatório do PST.....	42
3.3 Avaliação dos Efeitos Sistêmicos dos PST.....	42
3.4 Análise Estatística.....	42
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
4.1 Rendimento e caracterização parcial dos PST.....	43
4.1.1 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho.....	44
4.2 Atividade Antinoceptiva.....	46
4.2.1 Efeito dos PST nas contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	46
4.2.2 Efeito do PST no teste da formalina.....	48
4.2.3 Efeito do PST no teste da placa quente.....	51
4.3 Atividade anti-inflamatória.....	53
4.3.1 Efeito dos PST no edema de pata induzido por Carragenana e na dosagem da mieloperoxidase	53
4.3.2 Efeito dos PST no edema de pata induzido por Dextrano, Histamina e Serotonina.....	57
4.3.3 Participação da via heme oxigenase no efeito anti-inflamatório do PST.....	61
4.4 Efeitos sistêmicos dos PST da alga verde <i>C. mexicana</i>.....	63
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	66
6. CONCLUSÃO.....	66
REFERÊNCIAS.....	67

1 INTRODUÇÃO

1.1 Dor e Nociceção

1.1.1 Considerações Gerais

A dor é um dos sinais clássicos do processo inflamatório e decorre da sensibilização dos nociceptores, sendo um dos problemas mais difundidos em nossa sociedade e tem altos custos sociais devido a danos ou incapacidade permanente de milhões de pessoas (VERRI *et al.*, 2006).

A nociceção pode ser definida como a detecção de estímulos nocivos e a subsequente transmissão de informações codificadas para o cérebro. Em contraste, a dor é essencialmente um processo perceptivo que surge em resposta a essa atividade. Hiperalgesia é o aumento das respostas aos estímulos nocivos, descrevendo um estado de hipersensibilidade à dor que acompanha a inflamação e alodinia é a produção de dor por estímulos normalmente inócuos (KIDD; URBAN, 2001).

A nociceção significa a captação do nocivo, ou seja, a recepção de sinais pelo sistema nervoso central, a partir da ativação de terminações nervosas livres especializadas que transformam estímulos ambientais em potenciais de ação. Esses receptores são chamados de nociceptores e estão presentes em fibras aferentes sensitivas, principalmente as fibras C e A, e podem ser ativados por estímulos de natureza diversa, como mecânico, térmico, químico e físico. Cada estímulo produz reações sensoriais diferentes no indivíduo, onde sua durabilidade pode progredir para um estado crônico (KUMMER; COELHO, 2002).

São reconhecidos dois tipos de dor. A dor aguda, gerada através da estimulação nociva intensa, potencialmente injuriante, sendo localizada e transitória. Este tipo de dor inicia respostas reflexas de retirada do segmento corporal da fonte do estímulo nocivo. E a dor crônica que ocorre em resposta à lesão tecidual, representando um fenômeno de sensibilização nociceptiva onde pode ocorrer redução do limiar à dor ou amplificação da resposta aos estímulos. A dor crônica também possui uma fase aguda, associada com dano tecidual e inflamação, e uma fase crônica associada a danos ao tecido nervoso, que caracteriza a dor neuropática (ANDRADE FILHO, 2001).

A dor é uma função do sistema cerebrocortical com componentes afetivos, cognitivos e fisiológicos, que pode ser nociceptiva, neurogênica, neuropática e psicogênica. Desta forma,

a dor representa um problema complexo demandando a busca por tratamentos mais especializados (RIEDEL; NEECK, 2001).

1.1.2 Fisiopatologia da Dor

A gênese e transmissão da dor começam no sistema nervoso periférico através da detecção de um estímulo nocivo, não especializado, que ativa as terminações nervosas livres associadas com neurônios aferentes primários de pequeno diâmetro. Este estímulo físico é posteriormente transduzido em um sinal eletroquímico, que é transmitido da periferia para o sistema nervoso central (MCDOUGALL, 2011). Tem sido descrito a participação de mediadores químicos provenientes do ácido araquidônico, bradicinina, histamina, serotonina, citocinas, óxido nítrico, substâncias P, adenosina trifosfato, adenosina difosfato, prótons, entre outros (DRAY, 1995).

Os nociceptores têm a habilidade de detectar estímulos de natureza física e química, e de convertê-los em sinais eletroquímicos (JULIUS; BASBAUM, 2001). Outra característica dos nociceptores é apresentar um limiar de ativação alto, sendo necessário um estímulo intenso para originar um potencial de ação (CAVALCANTE, 2005). Ao entrar no corno dorsal da medula espinhal, estes impulsos são transmitidos através de neurônios de segunda ordem ao longo de vias ascendentes para o cérebro. Ao chegar a áreas específicas do cérebro, como o córtex somatosensorial e a amígdala, os sinais eletroquímicos são moldados em uma experiência psicofísica que incorpora reflexos motores de proteção e respostas emocionais. Detalhes importantes de todo este processo ainda não são totalmente compreendidos (MCDOUGALL, 2011).

Os neurônios sensoriais são geralmente classificados em fibras A (β - δ) e C com base no diâmetro, grau de mielinização e velocidade de seus potenciais de ação ao longo das fibras aferentes. As fibras A β , mielinizadas e de grande diâmetro, detectam, em geral, estímulos inócuos aplicados a pele, músculos e articulações. As fibras aferentes primárias nociceptivas são representadas pelas fibras A δ e C, que, quando estimuladas, transmitem o estímulo para o corno dorsal da medula espinhal. As fibras A δ , pouco mielinizadas, conduzem o estímulo a uma velocidade de 2 a 30 m/s e respondem a estímulos nocivos mecânicos e térmicos. As fibras C, amielínicas, conduzem o estímulo em velocidades menores que 2 m/s e respondem a estímulos nocivos térmicos, mecânicos e químicos, sendo chamados de polimodais (LE BARS *et al.*, 2001; CAVALCANTE, 2005; LUMPKIN; CATERINA, 2007).

No corno dorsal da medula espinhal encontra-se diversos neurotransmissores e receptores, incluindo: substância P, somatostatina, neuropeptídeo Y, aminoácidos excitatórios e inibitórios, óxido nítrico, opióides endógenos, adenosina e monoaminas, entre outros. Desta forma, a transmissão da dor para o cérebro está sob controle fisiológico diversificado, o que contribui para um difícil desafio na descoberta dos modos de inibir sensações dolorosas sem causar efeitos colaterais (MCCURDY; SCULLY, 2005).

1.1.3 Nociceção e o Processo Inflamatório

A dor resultante de tecidos inflamados ou feridos pode surgir espontaneamente na ausência de um gatilho externo, já que a nociceção é alterada nas lesões teciduais, devido à liberação de mediadores inflamatórios a partir de células danificadas, incluindo íons (K^+ e H^+), bradicinina, histamina, serotonina, fatores de necrose tumoral ($TNF-\alpha$), derivados da Cicloxigenase (COX) e óxido nítrico (KIDD; URBAN, 2001; KRAYCHETE *et al.*, 2006).

A ativação da via do ácido araquidônico leva à produção de prostanóides e leucotrienos, resultando no recrutamento de células imunológicas que liberam mediadores adicionais, incluindo citocinas e fatores de crescimento. Alguns destes mediadores ativam nociceptores periféricos diretamente e levam a dor espontânea, enquanto que outros atuam indiretamente, através de células inflamatórias para estimular a liberação de outros agentes indutores da dor (KIDD; URBAN, 2001; KRAYCHETE *et al.*, 2006). Em algumas situações, as prostaglandinas contribuem diretamente na ativação da dor, mas são consideradas como agentes sensibilizadores, pois elas aumentam os níveis de monofosfato cíclico de adenosina e podem aumentar a sensibilização dos nociceptores, reduzindo o limiar de ativação dos canais de sódio e cálcio e redução do influxo de potássio e cloro para o espaço intracelular (ENGLAND *et al.*, 1996; LAI *et al.*, 2002).

Importantes mediadores inflamatórios também atuam para modificar as propriedades de resposta de neurônios aferentes primários a estímulos subseqüentes (sensibilização periférica). Tal fato pode ocorrer como resultado de alterações na sensibilidade de moléculas receptoras próprias, ou através da modulação de canais dependentes da voltagem de íons (KIDD; URBAN, 2001; LAI *et al.*, 2002; KRAYCHETE *et al.*, 2006).

As citocinas exercem uma influência considerável sobre os neurônios sensoriais. Semelhante a outros mediadores, as citocinas podem atuar diretamente sobre nociceptores ou, mais comumente, indiretamente, estimulando a liberação de mais citocinas e outros agentes, tais como prostaglandinas. Durante a fase aguda, citocinas parecem induzir a sensibilização

através de receptores associados às quinases e fosforilação de canais iônicos (OPREE; KRESS, 2000).

Em circunstâncias normais, estímulos de alta intensidade são codificados por receptores especializados ligada à membrana. A condução de mensagens e a transmissão através dos neurônios da coluna vertebral para os terminais centrais é mediada por canais iônicos e aminoácidos excitatórios. Durante as fases iniciais da inflamação, mediadores, tais como prostaglandinas e bradicinina alteram a sensibilidade dos receptores e reduzem o limiar de ativação para a abertura de canais iônicos. A longo prazo, ocorrem mudanças em eventos transcricionais mediados por citocinas e fatores de crescimento, resultando em aumento da produção de receptores, canais iônicos e transmissores ou moduladores centrais (WOOLF; COSTIGAN, 1999; KIDD; URBAN, 2001).

Vários estudos reforçam a ação das citocinas na hiperalgesia presente no processo inflamatório, como a redução da hiperalgesia em modelos inflamatórios utilizando anticorpos contra TNF- α (WOOLF *et al.*, 1997) e à utilização de novos anti-TNF- α em terapias na artrite reumatóide (MANI *et al.*, 1998), mostrando redução na hiperalgesia mecânica e térmica, em resposta a estímulos inflamatórios (BRESNIHAN *et al.*, 1998; MURPHY *et al.*, 1999).

Compostos inibidores da COX-1, COX-2, TNF- α , Interleucinas (IL-6 e IL-8), da ativação de fatores de transcrição, como o fator nuclear kappa B (NF- κ B), da liberação de histamina, assim como indutores da heme oxigenase (HO) e das IL-10 são capazes de diminuir a hiperalgesia e alodinia em tecidos lesados (KIDD; URBAN, 2001; KRAYCHETE *et al.*, 2006; ABRAHAM; KAPPAS, 2008, GRANJEIRO *et al.*, 2011).

1.2 Inflamação

1.2.1 Considerações Gerais

A inflamação é uma reação localizada de proteção do corpo a estímulos agressivos como irritação alérgica ou química, lesão ou infecções. É caracterizado pela dilatação dos vasos sanguíneos levando a um maior fornecimento de sangue e de aumento dos espaços intercelulares, resultando na circulação de leucócitos, proteínas e fluidos para as regiões inflamadas, resultando nos sinais cardinais da inflamação como dor, calor, vermelhidão, inchaço e perda de função (IWALEWA *et al.*, 2007).

A resposta primária à infecção ou lesão tecidual é a inflamação, com as funções de combater o agente agressor ou o material prejudicial e promover a reparação dos tecidos. A inflamação é caracterizada pela liberação sequencial de uma bateria de mediadores, incluindo aminas vasoativas, eicosanóides, citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento que regulam o aumento da permeabilidade vascular e o recrutamento de leucócitos através do sangue (RODRIGUEZ-VITA; LAWRENCE, 2010; VANDERLEI *et al.*, 2011).

Vários são os agentes envolvidos na resposta inflamatória, tais como componentes do plasma e as células circulantes, que são polimorfonucleares, linfócitos e plaquetas; os vasos sanguíneos e os componentes celulares e extracelulares do tecido conjuntivo, como mastócitos, fibroblastos, macrófagos, linfócitos, proteínas fibrosas estruturais, glicoproteínas de adesão e proteoglicanos (KUMAR; SHARMA, 2010).

A inflamação pode ser dividida em duas fases, aguda e crônica, em que leva em consideração a duração e os agentes envolvidos no processo inflamatório e reparo, podendo ser benéfico ou prejudicial ao organismo, ocasionando várias doenças degenerativas (O'BYRNE; DALGLEISH 2001).

A inflamação aguda é caracterizada por um início rápido e é de curta duração. Caracteriza-se pela exsudação de fluidos e proteínas plasmáticas, com migração de leucócitos, principalmente neutrófilos para a área lesada. A inflamação crônica tem uma duração mais prolongada e se manifesta pela presença de linfócitos e macrófagos, resultando em fibrose e necrose tecidual (IWALEWA *et al.*, 2007). A inflamação crônica persistente aumenta o desenvolvimento das doenças degenerativas tais como artrite reumatóide, aterosclerose, doenças do coração, doença de Alzheimer, asma, câncer, esclerose múltipla, diabetes (O'BYRNE *et al.*, 2000; DALGLEISH; O'BYRNE, 2002).

A complexidade da resposta inflamatória envolve diferentes mecanismos que atuam em vários níveis, incluindo alterações na concentração de células de defesa no tecido lesado, alterações na capacidade de resposta das células, regulação das vias de sinalização e controle da expressão gênica (MEDZHITOV; HORNG, 2009; SHINOHARA *et al.*, 2012).

1.2.2 Eventos Vasculares

O aumento do diâmetro e na permeabilidade dos vasos resulta em extravassamento de líquidos e proteínas, levando ao edema que é uma característica do processo inflamatório. Proteínas plasmáticas e leucócitos (principalmente neutrófilos), normalmente restritos aos vasos sanguíneos, acessam, através de vênulas pós-capilares, os tecidos extravasculares nos locais da infecção ou lesão (MEDZHITOV, 2008). Mediadores inflamatórios como a trombina, bradicinina, histamina, TNF- α e fator de crescimento vascular endotelial aumentam a permeabilidade vascular, abrindo espaços paracelulares e rompendo as junções endoteliais e os complexos de adesão. Essa mudanças vasculares são seguidos pelo recrutamento de neutrófilos, linfócitos e o tráfego de recirculação de monócitos, que exigem adesão e a transmigração através das paredes dos vasos sanguíneos (LEY *et al.*, 2007; WANG; DUDEK, 2009).

Com a descoberta das integrinas, selectinas e seus respectivos ligantes, e quimiocinas e seus receptores, a cascata de adesão leucocitária emergiu como um conceito para explicar o recrutamento de subtipos de leucócitos para locais específicos (LEY *et al.*, 2007). Os leucócitos são recrutados para o local da inflamação por uma série de etapas adesivas que permite sua fixação à parede do vaso endotelial, sua locomoção ao longo desta parede, e sua travessia e migração através do tecido intersticial (MULLER, 2011).

O rolamento é mediado pela L-selectina, P-selectina e E-selectina. A L-selectina é expressa pela maioria dos leucócitos, enquanto E-selectina e P-selectina são expressas pelas células endoteliais inflamadas, sendo a P-selectina também expressa por plaquetas. As interações das selectinas com seus ligantes permitem a aderência dos leucócitos ao endotélio vascular. As integrinas também participam do rolamento e adesão de leucócitos (LEY *et al.*, 2007).

A transmigração, também denominada de migração transendotelial ou diapedese, através das paredes das vênulas pós-capilares é o último passo no processo da migração de leucócitos para os tecidos inflamados. Antes de atravessar as paredes das vênulas, os neutrófilos e monócitos locomovem-se dentro dos vasos sanguíneos de uma forma

dependente de receptores em busca de um local para transmigração (LEY *et al.*, 2007). A transmigração é sem dúvida um ponto sem retorno na resposta inflamatória. Todas as etapas anteriores, rolamento de leucócitos, ativação, adesão e locomoção, são reversíveis e a maior parte dos leucócitos que aderem a vênulas pós-capilares retorna à circulação (MULLER, 2011).

1.2.3 Principais células envolvidas na inflamação

O processo inflamatório consiste de um componente celular responsável pela liberação de mediadores e fagocitose dos agentes agressores e de tecidos mortos, importantes na fase de resolução da inflamação.

Os monócitos desenvolvem-se a partir de células-tronco pluripotentes da medula óssea sob a influência de fatores de crescimento específicos. Os monócitos maduros são liberados da medula óssea e penetram na corrente sanguínea como células quiescentes. Quando recrutados para locais de inflamação, diferenciam-se em macrófagos residentes. Eles também são os precursores das células dendríticas (KATSIARI *et al.*, 2010; SERBINA *et al.*, 2008).

Uma vez localizados nos tecidos, os macrófagos adquirem funções especializadas dependendo das necessidades locais. Assim, no fígado, macrófagos residentes, também conhecidos como células de Kupffer, desenvolvem uma alta capacidade fagocítica destinada à eliminação de endotoxina e de outros materiais estranhos à circulação portal. Nos pulmões, os macrófagos alveolares adquirem a capacidade de liberar grandes quantidades de oxidantes citotóxicos altamente reativos para a destruição de patógenos inalados e xenobióticos. Os macrófagos são efetores celulares essenciais da resposta imune inata, livrando o organismo de vírus, bactérias, células apoptóticas e algumas células tumorais (LASKIN *et al.*, 2011).

Os granulócitos (nome coletivo dado a neutrófilos, eosinófilos e basófilos) têm um papel proeminente na defesa imunológica. Os eosinófilos constituem 5% dos granulócitos circulantes, conferindo resistência à invasão parasitária, além de seu envolvimento na resposta alérgica (HALLETT *et al.*, 2008).

Os basófilos representam menos de 1% dos leucócitos. Além dos grânulos basófilos, compartilham algumas características com os mastócitos residentes, incluindo a expressão de algumas moléculas de superfície e a liberação de mediadores químicos relacionados com as alergias como a histamina (KARASUYAMA *et al.*, 2011).

Os mastócitos localizam-se principalmente na interface do hospedeiro com o ambiente, como a pele e mucosas, desempenhando um importante papel no reconhecimento

de patógenos ou de outros sinais de infecção. Os mastócitos são conhecidos por sua associação com condições patológicas, como alergia, asma e anafilaxia (ABRAHAM, ST. JOHN, 2010).

A ação conjunta dos fagócitos profissionais (neutrófilos, monócitos e macrófagos) é crucial para a efetiva eliminação de agentes infecciosos e detritos celulares. Os neutrófilos são células de curta duração, recrutadas no início da resposta inflamatória, que utilizam uma grande variedade de mecanismos inflamatórios, alguns dos quais são potencialmente prejudiciais ao hospedeiro, e assim a ativação de neutrófilos tem de ser rigorosamente controlada para evitar dano excessivo aos tecidos (SOEHNLEIN; LINDBOM, 2010).

Quando chegam ao local do tecido atingido, os neutrófilos tornam-se ativados, seja por contato direto com patógenos ou por meio das ações de citocinas secretadas por células residentes. Os neutrófilos ativados tentam destruir agentes invasores liberando o conteúdo tóxico de seus grânulos, que incluem espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, proteinase 3, catepsina G e elastase. Estes potentes efetores não discriminam entre os alvos microbianos e o hospedeiro, sendo os danos aos tecidos do hospedeiro inevitáveis (MEDZHITOV, 2008).

A fagocitose está associada à liberação do conteúdo dos grânulos (azurófilos e específicos) citoplasmáticos no vacúolo. Os azurófilos contêm proteínas e peptídeos específicos para destruição microbiana, enquanto, os específicos são responsáveis pela reposição dos componentes da membrana, além de limitar reações de radicais livres (SEGAL, 2005).

Os grânulos azurófilos contêm a enzima mieloperoxidase (MPO), uma proteína di-heme composta por dois heterodímeros idênticos. Os grupos heme, ligados covalentemente, possuem estrutura única e exibem propriedades espectrais incomuns responsáveis pela sua coloração verde (FIEDLER *et al.*, 2000). A MPO gera espécies oxidativas em neutrófilos, usando peróxido de hidrogênio e haletos para produzir ácidos hipóalosos (JANTSCHKO *et al.*, 2005).

1.2.4 Mediadores inflamatórios

O processo inflamatório é controlado por um grupo de substâncias chamadas mediadores químicos, podendo desencadear, conduzir, controlar ou extinguir a inflamação, atuando em estágios definidos da reação inflamatória. Para melhor compreender o processo inflamatório é importante conhecer o papel de seus mediadores. Mediadores são substâncias liberadas por células do sistema de defesa ou proteínas do plasma, e dependendo do estímulo

desencadeador e da duração da lesão, determinam a gravidade da inflamação (ESCH; STEFANO, 2002; TEIXEIRA *et al.*, 2003; SHINOHARA *et al.*, 2012).

Estas substâncias se ligam a receptores específicos sobre as células e modulam várias atividades fisiológicas importantes para o retorno e controle da homeostase. Elas atuam de forma sistêmica e pontual, podendo aumentar a permeabilidade vascular, promover a quimiotaxia de polimorfonucleares, estimular a contração da musculatura lisa, aumentar atividade enzimática direta, provocar dor e mediar dano oxidativo (COLEMAN, 2002). Dentre os mediadores inflamatórios, destacam-se as citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8), quimiocinas, moléculas de adesão e enzimas responsáveis pela produção de mediadores inflamatórios secundários, tais como óxido nítrico sintetase induzida (iNOS) e COX-2 (TILSTRA *et al.*, 2011).

Embora a maioria dos mediadores sejam pró-inflamatórios, à medida que o processo caminha para o reparo, há um aumento na regulação da resposta inflamatória no sentido de diminuir a ação da resposta, evitando fibrose e necrose tecidual, ocorrendo à liberação de algumas citocinas (IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13), ativação ou inibição de cascatas enzimáticas e inibição dos fatores de transcrição e expressão gênica, agindo como moduladores anti-inflamatórios dentro das células (ESCH; STEFANO, 2002). Estudos mostram que a enzima HO responde a diferentes mediadores inflamatórios, contribuindo para resolução da inflamação, apresentando efeitos protetores em vários órgãos contra lesões oxidativas e na redução do processo inflamatório (NAITO *et al.*, 2011; VANDERLEI, *et al.*, 2011; WU *et al.*, 2011).

As aminas vasoativas são mediadores inflamatórios armazenados em grânulos celulares, de rápida ação, liberados imediatamente após a ação do estímulo indutor. Tem sua ação principal nos vasos sanguíneos, provocando vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, estando diretamente relacionadas a hiperalgesia da dor inflamatória, através de sua ação sobre os neurônios sensoriais (DRAY, 1995; SCHNEIDER *et al.*, 2002). As aminas vasoativas mais importantes são a histamina e a serotonina.

A histamina é uma amina vasoativa, sintetizada a partir da descarboxilação do aminoácido L-histidina, pela ação da enzima histidina descarboxilase e constitui o principal componente dos grânulos de mastócitos, sendo esta enzima expressa de forma constitutiva em mastócitos e basófilos (KURAMASU *et al.*, 1998). E está envolvida em muitos processos fisiológicos, principalmente em mecanismos de defesa, aumentando a sensibilidade à dor e contribuindo no processo inflamatório. Trata-se de uma molécula hidrofílica envolvendo um anel imidazólico e um grupamento amino conectado por dois grupamentos metileno. É

encontrada em grânulos de mastócitos e basófilos, que são liberados pelo processo de exocitose durante as reações inflamatórias ou alérgicas através da interação de fatores do sistema complemento (C3a e C5a) e de antígenos com anticorpos IgE (SCHRAMM; THORLACIUS, 2004).

A histamina exerce seus efeitos biológicos ao se ligar, de forma agonista, aos receptores específicos denominados receptores histaminérgicos classificados em H1, H2, H3, e H4 distribuídos por vários tecidos e envolvidos em vários mecanismos fisiológicos, tanto de defesa, quanto de controle da homeostase. Provoca aumento da permeabilidade das vênulas pós-capilar, contração do músculo liso, vasoconstrição pulmonar, aumento dos níveis de guanina monofosfato cíclica nas células, produção de prostaglandinas, aumento da secreção de ácido gástrico bem como de muco e ativação de células T supressoras (SCHNEIDER *et al.*, 2002; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; ZHANG *et al.*, 2007; HUANG; THURMOND, 2008; ZAMPELI; TILIGADA, 2009).

A serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT) presente no organismo é produzida em grande parte pelo trato gastrointestinal (GERSHON, 2004). Noventa por cento da 5-HT é produzida por células enterocromafins, encontradas no epitélio do trato gastrointestinal e absorvida pelas plaquetas. A 5-HT possui ações semelhantes na inflamação às da histamina, ou seja, vasoconstrição inicial, e juntamente com outros mediadores na vasodilatação e no aumento da permeabilidade vascular (RACKE; SCHWORER, 2000).

A expressão gênica é regulada por fatores de transcrição, os quais são elementos protéicos que se ligam as regiões promotoras dos genes, sendo este o mecanismo primário de controle dos processos biológicos (NIMWEGEN, 2003). O NF- κ B se liga a fita de DNA e ativa a transcrição de genes envolvidos no processo inflamatório. A expressão de muitas proteínas, incluindo todas as citocinas pró inflamatórias, quimiocinas, e enzimas da cascata do ácido araquidônico, são reguladas pelo fator de transcrição NF- κ B. Em células normais, NF- κ B está ligado a uma proteína inibidora I κ B, formando o complexo I-kappa B presente no citoplasma (BALDWIN, 1996; PAHL, 1999; MEDZHITOV; HORNG, 2009; HAYDEN; GHOSH, 2012).

Uma variedade de estímulos inflamatórios, tais como infecções bacterianas, o lipopolissacarídeo, lesões, irradiações ultravioletas, e citocinas (TNF- α e IL-1), ativam o NF- κ B por fosforilação do complexo I-kappa B através da ativação da I κ B-quinase e, posteriormente, degradação do Complexo I-Kappa B. Quando liberado NF- κ B é então translocado para o núcleo e liga-se ao DNA e ativa a transcrição de muitos genes, incluindo

de citocinas pró inflamatórias, quimiocinas, TNF- α , IL-1, mieloperoxidase, moléculas de adesão (ICAM-1, VCAM, ELAM-1, E-selectinas), fosfolipídios A2, lipoxigenase, a COX-2, iNOS (BALDWIN, 1996; PAHL, 1999; HAYDEN; GHOSH, 2012).

A ativação anormal do NF- κ B está envolvida nas doenças inflamatórias degenerativas crônicas, tais como asma, artrite reumatóide, doença inflamatória do intestino, aterosclerose e doença de Alzheimer (PODOLSKY, 1991; ROSS, 1993; COLLINS; CYBULSKY, 2001; TAK; FIRESTEIN, 2001; MEDZHITOV; HORNG, 2009).

1.2.4.1 Heme oxigenase

A HO é uma enzima encontrada no retículo endoplasmático de diferentes células e tecidos e está envolvida na degradação de grupos heme. A clivagem oxidativa do grupo resulta na formação de monóxido de carbono (CO), Ferro (Fe) e biliverdina (BV), que logo é convertida em bilirrubina citosólica através da ação da enzima biliverdina redutase (MAINES, 1988; SHIBAHARA, 1988; KIRKBY; ADIN, 2006; RYTER *et al.*, 2006).

Os produtos derivados da HO apresentam atividades biológicas importantes no processo inflamatório. O CO tem ação semelhante a do óxido nítrico na geração de monofosfato cíclico de guanosina, na vasodilatação e inibição de citocinas pró inflamatórias (RODGERS *et al.*, 1996). A BV, que é reduzida pela biliverdina redutase, formando a bilirrubina, um potente agente oxidante. O Fe, que é reutilizado na formação de uma nova molécula heme (MAINES, 1997; KIRKBY; ADIN, 2006; RYTER *et al.*, 2006; ABRAHAM; KAPPAS, 2008).

Em mamíferos, foram identificadas três enzimas HO distintas: HO-1, a HO-2 e a HO-3. Estas são produtos de diferentes genes, e seus padrões de expressão variam amplamente entre diferentes tipos celulares e tecidos. A HO-1 é altamente indutível em tecidos como o coração, rins, fígado, vasos sanguíneos, baço, pulmões e outros (ABRAHAM; KAPPAS, 2008)

A indução de HO-1 é considerada como moduladora da resposta adaptativa e diretamente relacionada com a proteção da célula na presença de lesão oxidativa ou inflamatória. Por outro lado, a HO-2 é constitutivamente encontrada no endotélio e exerce o papel de regulador fisiológico da função celular, estando presente nas camadas média e adventícia dos vasos sanguíneos, testículos e encéfalo (WATANABE *et al.*, 2005), e por fim, a HO-3 foi recentemente descrita no encéfalo (MCCOUBREY *et al.*, 1997; ALCARAZ *et al.*, 2001). A produção de HO-1 é elevada em células inflamatórias durante a fase de resolução da

inflamação, seu envolvimento em processos inflamatórios já está bem estabelecido na literatura (KIRKBY; ADIN, 2006; RYTER *et al.*, 2006; MUZ *et al.*, 2008). Dentro deste contexto, podem ser identificadas diferentes funções da molécula heme na inflamação, bem como dos produtos da sua reação. Por outro lado, dentre os produtos originados da quebra do grupamento heme pela HO-1, o CO é, possivelmente, o principal fator envolvido nas funções protetoras e anti-inflamatórias da enzima (WILLIS *et al.*, 1996; MARKS, 1994; ABRAHAM; KAPPAS, 2008).

Sobre os mecanismos reguladores da expressão e da atividade da HO, o gene da HO-2 é responsivo somente aos glicocorticóides. Já o gene da HO-1 responde a um grande número de estímulos, como por exemplo, os gerados pelo estresse oxidativo, hipertermia, estímulos inflamatórios e fármacos anti-inflamatórios, como os anti-inflamatórios não esteroidal (AINES) e corticóides (CABLE *et al.*, 1997; ABRAHAM; KAPPAS, 2008; GRANJEIRO *et al.*, 2011). Vários estudos demonstram que HO-1 e seus derivados funcionam em uma vasta gama de processos que podem ser ligados à fase de resolução da inflamação, tendo os macrófagos como alvo crítico (OTTERBEIN *et al.*, 2000; VICENTE *et al.*, 2003.; RYTER *et al.*, 2006; MUZ *et al.*, 2008).

Já é consenso na comunidade científica os efeitos da HO-1 na inflamação aguda, tendo a produção de citocinas pró inflamatórias e quimiocinas, tais como IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α , inibidas pela expressão da HO-1 através da inibição da fosforilação da I- κ B e da regulação da ativação de fatores de transcrição (NF- κ B, AP-1) (WIESEL *et al.*, 2000; LEE *et al.*, 2003; RYTER *et al.*, 2006; MIYAMOTO *et al.*, 2003; KOBAYASHI *et al.*, 2006; OH *et al.*, 2006; ABRAHAM; KAPPAS, 2008).

Tem sido demonstrado que HO-1 reduz a produção de citocinas pró inflamatórias (TNF- α , IL-6, IL-8) por linhagens de células sinoviais na artrite reumatóide (KOBAYASHI *et al.*, 2006; MUZ *et al.*, 2008), e atenua a inflamação induzindo a produção de osteoclastos (ZWERINA *et al.*, 2005), sugerindo uma ação moduladora na inflamação crônica. A expressão de COX-2 também é regulada pela HO-1, onde foi verificado que o aumento da expressão de HO-1 está diretamente associado com a diminuição da expressão de COX-2 (HAIDER *et al.*, 2002; RYTER *et al.*, 2006; GRANJEIRO *et al.*, 2011).

Vários estudos relataram a influência da HO-1 na atividade anti-inflamatória e imunossupressora de alguns compostos, derivados de plantas ou algas, correlacionando os resultados com a ativação ou o aumento da expressão da HO-1 e com a potência do efeito anti-inflamatório (ALCARAZ *et al.*, 2000; HO *et al.*, 2007; VANDERLEI, *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2012), sendo considerada um alvo terapêutico em potencial no tratamento de doenças

inflamatórias (RYTER *et al.*, 2006; ABRAHAM; KAPPAS, 2008; GRANJEIRO *et al.*, 2011).

1.2.5 Fármacos analgésicos e anti-inflamatórios

Várias abordagens terapêuticas visam o tratamento da dor e da inflamação, entre elas destacamos o uso de fármacos na resolução de distúrbios patológicos que podem comprometer a qualidade de vida, limitando as atividades diárias e profissionais, afetando suas relações emocionais, sociais e familiares e implicando ainda em aumento dos gastos financeiros para os serviços públicos de saúde (MENDES, 2001).

Os anti-inflamatórios são medicamentos capazes de conter e reverter à inflamação, seja ela de origem sistêmica ou local. Eles devem apresentar rapidez de ação, potência analgésica e segurança no uso. Os AINES e os glicocorticóides são extensamente empregados em todos os campos da medicina.

Os AINEs apresentam propriedades analgésicas, anti-inflamatórias e antipiréticas, agem principalmente na supressão da COX-1 e 2, inibindo a liberação de seus derivados, como as prostaglandinas envolvidas nos mecanismos patogênicos da dor, inflamação e febre. São fármacos importantes para promover rápida supressão da resposta inflamatória tanto aguda, quanto crônica (GENÉ *et al.*, 2009). Dentre eles, os mais usados na clínica médica destacam-se os Salicilatos (aspirina), acetaminofeno, indometacina e os inibidores da COX-2 (nimesulide e meloxicam).

Entretanto, a limitação do uso dos AINES decorre do fato da ocorrência de efeitos adversos, tais como risco aumentado de infarto do miocárdio, acidentes cerebrovasculares, insuficiência cardíaca e renal, hipertensão arterial, além de problemas gastrointestinais, como gastroduodenite, úlcera gástrica e hemorragias (BATLOUNI, 2010).

Os glicocorticóides são muito utilizados em terapia de doenças do sistema imunológico e na prevenção e/ou tratamento da rejeição de transplantes e suas ações anti-inflamatórias se devem, principalmente à inibição do gene da COX 2 e a indução da proteína lipocortina, a qual inibe a enzima fosfolipase A₂. Além disso, reduzem a produção de citocinas pró inflamatórias, tais como TNF- α e IL-1 (ADCOCK *et al.*, 2005).

A dexametasona e a hidrocortisona são alguns exemplos de glicocorticóides mais usados na clínica e exercem inibição do processo inflamatório, tanto nas manifestações iniciais quanto crônicas. Inibem a migração celular para área agredida, por meio da supressão de moléculas de adesão e da inibição de proteínas envolvidas na ação da fosfolipase A₂ e na

liberação de ácido araquidônico. O complexo formado esteróide-receptor também inibe a transcrição de citocinas (IL-1 e TNF- α) envolvidas no processo inflamatório crônico, bem como promove repressão da síntese de receptores, como o receptor IL-2 (ADCOCK *et al.*, 2005). Dentre seus principais efeitos adversos citam-se a osteoporose, fraqueza muscular, úlceras pépticas, hipertensão, diabetes, hiperlipidemia, artrite, insuficiência cardíaca, glaucoma, síndrome de Cushing, supressão adrenal, entre outros (MCDONOUGH *et al.*, 2008; LANSANG; HUSTAK, 2011).

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

Muitos polissacarídeos sulfatados de algas marinhas têm apresentado efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios, ganhando atenção como moléculas bioativas com potencial biotecnológico, despertando o interesse de pesquisadores (ARAÚJO *et al.*, 2011; COURA *et al.*, 2011; VANDERLEI *et al.*, 2011; PATEL, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2012).

1.3 Algas marinhas

1.3.1 Considerações Gerais

As algas são organismos clorofilados, autotrófos, que não possuem tecidos especializados, nem vasos condutores. Compostas por um grupo heterogêneo, variando desde pequenos organismos unicelulares (célula isolada ou agrupadas em colônias) até seres pluricelulares, com forma bastante complexa e diferenciada (LEE, 1999; BARSANTI; GUALTIERI, 2006).

São classificadas em dois grupos principais: as macroalgas, que são seres pluricelulares, que ocupam a zona litorânea, lagos e rios e as microalgas, que são encontradas em hábitat bentônico e no litoral, além dos fitoplâncton presente nos oceanos. As macroalgas, do ponto de vista botânico, são classificadas de acordo com a estrutura física, função e ciclo reprodutivo em 3 principais filos: Phaeophyta (algas pardas), Rhodophyta (algas vermelhas) e Chlorophyta (algas verdes) (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

As algas do filo Phaeophyta, de coloração parda ou marrom são ricas em pigmentos xantofílicos e fucoxantinas, que mascaram a presença de outros pigmentos como a clorofila *a* e *c* e β -carotenos que são encontrados em menores proporções (VIDOTTI; ROLLEMBERG,

2004). As reservas alimentares de algas marrons normalmente são polissacarídeos complexos e álcoois superiores, tendo a laminarina como o carboidrato principal. Nas paredes celulares são predominantes a celulose e ácido algínico. Nos últimos anos muitos metabólitos bioativos vêm sendo isolados com diferentes atividades farmacológicas (EL GAMAL, 2010).

As Rhodophyta recebe a cor vermelha devido a dominância dos pigmentos ficoeritrina e ficoticianina sobre a clorofila *a*, β -carotenos e xantofilas. Nas paredes celulares é encontrado celulose, ágar e carragenana (PERCIVAL; McDOWELL, 1967; VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

A característica da cor verde de algas Chlorophyta é principalmente devido a grande presença de clorofila *a* e *b*, chegando na mesma proporção das plantas superiores (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004). A divisão Chlorophyta, em especial, representa o grupo mais diversificado dentre todas as algas (morfologia, estrutura e ciclo de vida), compreendendo aproximadamente 17.000 espécies e ocorrendo em diversos ambientes costeiros do mundo. Há poucos relatos de novos metabólitos secundários entre as Chlorophyta em relação a outras algas (EL GAMAL, 2010; RODRIGUES *et al.*, 2012).

1.3.2 Gênero *Caulerpa*

Dentre as ordens de algas verdes frequentemente encontradas na costa brasileira destaca-se a ordem Caulerpales, a qual inclui espécies essencialmente marinhas e de águas tropicais, apresentando organização filamentosa formando diversas trabéculas de parede celular, e constituídos, geralmente, de um talo rastejante fixado ao substrato através de uma porção rizomatosa que se expande ao longo do “solo”, fixando-se através de rizóides. Ao longo de toda a sua porção rizomatosa são encontrados ramos eretos que podem se apresentar, em formatos de folhas, penas, pinheiros e cachos de uva, dependendo da espécie. Estudos envolvendo taxonomia e distribuição de algas do gênero *Caulerpa* coletadas na costa brasileira descrevem o elevado polimorfismo desse grupo (OLIVEIRA *et al.*, 2005; BRAYNER *et al.*, 2008). As algas do gênero *Caulerpa*, frequentemente, encontradas no litoral brasileiro são *Caulerpa cupressoides* (Vahl) C. Agardh, *C. mexicana* Sonder ex Kützinger, *C. prolifera* (Forsskal) J. V. Lamouroux, *C. racemosa* (Forsskal) J. Agardh e *C. sertularioides* (S. G. Gmelin) M. Howe, as quais podem até ser vistas na forma de tapetes verdes na zona entre marés (BRAYNER *et al.*, 2008; MARINHO-SORIANO *et al.*, 2008). É destituída de celulose e sim constituída de polímeros de xilana e manana ligadas através de

ligações β -1,3 e β -1,4, respectivamente (LEE, 1999). oriunda de água de lastro de navios, aquicultura e aquários,

A invasão biológica ou acidental de algas desse gênero em sistemas ambientais marinhos também tem sido a causa de grande preocupação em algumas regiões do mundo, devido a notável capacidade de crescimento vegetativo das Caulerpaceae, que colonizam diferentes tipos de substratos e profundidades de até 40 m na coluna d'água, tornando difícil seu controle populacional. A ação invasora desses organismos resulta em competição com as espécies bentônicas nativas e interferindo no equilíbrio do ecossistema local (VERLAQUE, 1994; PIAZZI *et al.*, 2001; RUITTON *et al.*, 2005; PIAZZI; CECCHERELLI, 2006).

Por outro lado, pesquisas relatam a ocorrência de produtos naturais com ações anticoagulante, antitrombótica, antiviral, antitumoral, apoptótica, antiproliferativa, antinociceptiva e anti-inflamatória isolados de algumas espécies do gênero *Caulerpa*, despertando assim o interesse em Biotecnologia (GHOSH *et al.*, 2004; JI *et al.*, 2008; COSTA, L *et al.*, 2010; COSTA, M *et al.*, 2011; RIBEIRO, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2012).

1.3.3 Aplicações Biotecnológicas de Algas Marinhas

Historicamente, a indústria das algas responde por uma grande variedade de produtos, movimentando cifras na ordem de bilhões de dólares. As macroalgas marinhas têm sido utilizadas ao longo do tempo para as mais variadas finalidades, tais como: fontes de alimento, especialmente na China e no Japão; complemento nutricional (vitaminas e minerais) ou como agentes terapêuticos para tratamento de muitas doenças (SMIT, 2004; EL GAMAL, 2010).

Antes da década de 1950, as propriedades medicinais das algas estiveram restritas à terapêutica da medicina tradicional ou alternativa. Durante as décadas 70, 80 e 90, ocorreu um incremento nas pesquisas de novos compostos biológicos com atividades ou propriedades farmacológicas derivados de algas marinhas, diminuindo após a década de 90, com uma maior atenção dada aos micro-organismos marinhos (LINCOLN *et al.*, 1991; MAYER; LEHMANN, 2000; KELECOM, 2002, MAYER, 2011).

Nos últimos anos as empresas farmacêuticas passaram a investigar organismos marinhos, incluindo algas, com a finalidade de obter novas drogas a partir de produtos naturais. Estes produtos, também vêm sendo cada vez mais utilizados nas pesquisas médicas e bioquímicas (SMIT, 2004; MAYER, 2011; PATEL, 2012).

Importantes substâncias bioativas identificadas em macroalgas nas últimas três décadas, têm apresentado grande variedade de propriedades, variando desde o tipo do

composto à sua estrutura química, assim como atividades com possibilidade de ser um medicamento ou possuir algum valor para a indústria farmacêutica (SMIT, 2004; EL GAMAL, 2010; MAYER, 2011; PATEL, 2012).

De todos os produtos de algas, os hidrocolóides têm maior importância, atingindo significativo valor comercial através da sua utilização em diversas indústrias que exploram as suas propriedades físico-químicas, tais como: gelificante, de retenção da água e emulsificante, sendo os outros biopolímeros pouco valorizados pela indústria mundial. Dentre esses hidrocolóides, as carragenanas são comumente usadas na indústria alimentícia como aditivos, na forma de espessantes e gelificantes para iogurtes, achocolatados e preparados (RENN, 1997; MELO *et al.*, 2002; CAMPO *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2010; JIAO *et al.*, 2011; EL GAMAL, 2010; PATEL, 2012).

Algas vermelhas são consideradas como a fonte mais importante de muitos metabólitos biologicamente ativos em comparação com outras classes de algas. Os gêneros *Gracilaria*, *Gelidium* e *Pterocladia* são usados na fabricação do ágar, amplamente utilizado como meio de crescimento para microrganismos e variadas aplicações biotecnológicas. (EL GAMAL, 2010).

1.4 Polissacarídeos Sulfatados

1.4.1 Considerações Gerais

Polissacarídeos sulfatados (PS) são polímeros complexos e heterogêneos formados de unidades repetitivas de açúcares carregados negativamente devido, principalmente, à presença de radicais sulfatados. A biossíntese desses compostos está amplamente distribuída no reino animal, vegetal e no reino protista, no qual se incluem as algas marinhas (PERCIVAL; McDOWELL, 1967; MATHEWS, 1975; AQUINO *et al.*, 2005; ELOY, 2012).

Nos animais os PS são conhecidos como glicosaminoglicanos (GAGs), unidos em cadeias e ligados a uma proteína de membrana ou uma proteína secretora formando proteoglicanos (NELSON; COX, 2008). Os glucosaminoglicanos, tais como a heparina (HEP) e os galactosaminoglicanos, como o condroitim sulfato (CS) e o dermatam sulfato (DS), são os GAGs sulfatados mais conhecidos, contêm grande massa molecular e estão envolvidos em várias funções fisiológicas, como lubrificação, coagulação, suporte de tecidos e reconhecimento celular. (KJELLÉN; LINDAHL, 1991; NELSON; COX, 2008). Nas algas os PS estão amplamente distribuídos nos tecidos, principalmente na parede celular, conferindo a

esses organismos proteção, suporte, forma, rigidez e elasticidade aos tecidos neles encontrados.

1.4.2 Polissacarídeos Sulfatados de Algas Marinhas

Os PS são os principais constituintes da matriz extracelular das algas marinhas, conferindo-lhes flexibilidade. Sua ocorrência está relacionada com atividades fisiológicas importantes como na manutenção e adaptação à ambientes de estresse, conferindo-lhes funções de regulação iônica, mecânica e osmótica, além de agirem como mecanismo de defesa às respostas ambientais (ANDRADE *et al.*, 2010; AQUINO *et al.*, 2005).

A complexidade e a heterogeneidade, assim como o rendimento dos PS varia entre diferentes espécies de algas, com o período de coleta, localização e com as condições climáticas e ambientais (PERCIVAL; McDOWELL, 1967; FRIEDLANDER; ZELIKOVITCH, 1984; FARIAS *et al.*, 2000; VASCONCELOS, *et al.*, 2011). Além destes fatores, a utilização de diferentes protocolos na extração de polissacarídeos, tais como o uso de solventes de precipitação e metodologias enzimáticas, influenciam no rendimento, nas propriedades físico-químicas e nas atividades biológicas dessas moléculas, podendo ser um fator determinante para suas aplicações nos diferentes setores econômicos (PERCIVAL; McDOWELL, 1967; CAMPO *et al.*, 2009; RODRIGUES *et al.*, 2009).

Os PS estão representados nas Rhodophytas por galactanas (agaranas e/ou carragenanas), nas Phaeophytas por fucanas e, nas Chlorophytas, por arabino-galactanas, ramnanas e ulvanas (PERCIVAL; McDOWELL, 1967).

A divisão Chlorophyta, em especial, representa o grupo com maior diversidade de polissacarídeos. Dentre todas as espécies de algas, a ordem Ulvales, apresenta as ulvanas, que são compostos por diferentes seqüências químicas baseadas principalmente em dissacarídeos de ramnose, ácido glucurônico e xilose (PERCIVAL; MCDOWELL, 1967; LAHAYE; ROBIC, 2007). Os gêneros *Clodophora*, *Chaetomorpha*, *Caulerpa* e *Codium* apresentam PS constituídos por D-galactose, L-arabinose e D-xilose em diferentes proporções, denominados arabino-galactanas, pois são heteropolissacarídeos aniônicos pouco repetitivos, apresentando-se, geralmente, bastante ramificados, complexos e constituídos de unidades predominantes de monossacarídeos ou dissacarídeos constituídos de galactose e arabinose (PERCIVAL, McDOWELL, 1967).

A literatura vem mostrando vários estudos relacionando os PS isolados de macroalgas marinhas com atividades de regulação nos processos inflamatórios, tanto pró quanto anti-

inflamatórios (WEIZAI *et al.*, 2008; ANANTHI *et al.*, 2010; ARAUJO *et al.*, 2011; VANDERLEI *et al.*, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2012).

1.4.3 Atividades Biológicas de PS de Algas do Gênero Caulerpa

Dentre as atividades testadas, os PS de algas verdes são os menos estudados quanto as suas estruturas e atividades biológicas, principalmente quando comparados aos de algas vermelhas. Isto pode ser explicado pelo fato dos PS de algas verdes apresentarem uma maior heterogeneidade estrutural, o que dificulta o entendimento da relação dos PS com sua atividade biológica (POMIN; MOURÃO, 2008).

Os PS de algas verdes do gênero *Caulerpa* têm sido relatados como moduladores de uma série de funções biológicas, como visto em estudos de atividades antitumoral (COSTA, L. *et al.*, 2010; JI *et al.*, 2008), antiproliferativa (COSTA, L. *et al.*, 2010), antiviral (GHOSH *et al.*, 2004), anticoagulante (RODRIGUES *et al.*, 2010; COSTA, M. *et al.*, 2011), antitrombótica (RODRIGUES *et al.*, 2011), antioxidante (COSTA, L. *et al.*, 2010; COSTA, M. *et al.*, 2011) antinociceptiva e anti-inflamatória (RODRIGUES *et al.*, 2012; RIBEIRO, 2012). Apesar da variedade de atividades testadas, estudos demonstrando as relações entre estrutura e função de PS não estão claramente estabelecidos devido às dificuldades com a determinação das suas estruturas (POMIN, 2010; PATEL, 2012).

Os estudos relatados até o presente momento demonstram que os PS de algas marinhas verdes podem interferir na resposta à dor e no processo inflamatório. Entretanto, ainda são poucos os estudos descrevendo efeitos de PS de algas verdes em modelos de inflamação, principalmente *in vivo*, porém o interesse desses compostos na atividade inflamatória vem crescendo nos últimos anos (WIJESEKARA *et al.*, 2011, PATEL, 2012). Portanto, o entendimento dos efeitos desses compostos na resposta inflamatória e na nocicepção é importante para o desenvolvimento de novos agentes farmacológicos.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar os efeitos dos polissacarídeos sulfatados totais (PST) da alga marinha verde *Caulerpa mexicana* em modelos clássicos de nocicepção e inflamação.

2.2 Específicos

- Extrair enzimaticamente e determinar o rendimento dos PST da alga *Caulerpa mexicana*;
- Caracterizar quimicamente os PST da alga *C. mexicana*;
- Avaliar o efeito antinociceptivo dos PST através dos modelos clássicos de contorções abdominais induzidas por ácidos acético e testes da formalina e da placa quente em camundongos;
- Avaliar o efeito anti-inflamatório dos PST utilizando os ensaios de edema de pata induzidos por carragenana e dextrana e dosagem da enzima mieloperoxidase em ratos;
- Investigar o mecanismo de ação do efeito anti-inflamatório dos PST através do ensaio de edema de pata induzido por histamina e serotonina em ratos;
- Investigar a participação da via heme oxigenase no efeito anti-inflamatória dos PST;
- Avaliar a toxicidade dos PST por dose única em camundongos, através da análise de parâmetros bioquímicos e histológicos dos órgãos (coração, fígado, baço, timo, linfonodo e rim).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Alga marinha

A alga marinha verde *Caulerpa mexicana* (FIGURA 1) foi coletada na praia de Flecheiras no município de Trairi - Ce, em agosto de 2011 durante a maré baixa (-0,1 a 0,3 m). Em seguida acondicionada em sacos plásticos e transportada ao laboratório em recipiente isotérmico, onde foram limpas, tendo as epífitas removidas, e lavadas com água corrente e depois estocadas a -20 °C, para posterior utilização. Em um segundo momento as algas foram descongeladas, novamente lavadas com água corrente e secas a temperatura ambiente, depois triturada em moinho elétrico e armazenada a temperatura ambiente, em recipiente plástico, tampado e ao abrigo da luz.

Uma exsicata da espécie foi depositada no Herbário Prisco Bezerra do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará sob o número 47304.

Figura 1 - Espécime da alga marinha verde *Caulerpa mexicana*



Filo: Chlorophyta
Classe: Ulvophyceae
Ordem: Caulerpales
Família: *Caulerpaceae*
Gênero: *Caulerpa*
Espécie: *Caulerpa mexicana*
Nome botânico: *Caulerpa mexicana*
Sonder ex Kützing

Fonte: www.algaebase.com

Fonte: Acervo do próprio autor.

3.1.2 Animais

Foram utilizados ratos machos *Wistar* e camundongos *Swiss* (machos e fêmeas) obtidos do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará e mantidos no Biotério de Experimentação do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFC.

A autorização para o uso dos animais nos experimentos foi obtida junto a Comissão de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará (CEPA – UFC) como parte do projeto “Compostos bioativos de algas marinhas: bases moleculares, implicações terapêuticas e industriais” aprovado sob o processo de número 80/10.

3.2 Métodos

3.2.1 Extração dos PST da alga *C. mexicana*

Para extração dos PST, 5 g da alga seca foi hidratada em 250 mL de tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 6,0 com 1020 mg de papaína, 5 mM de cisteína e 5 mM de EDTA, mantendo-se em banho-maria a 60 °C por 6 horas e posteriormente filtrado. Este foi submetido a uma precipitação dos PS através da adição de 16 mL de uma solução a 10% de cloreto de cetilpiridínio (CPC), por 2 horas à temperatura ambiente. A mistura foi então centrifugada (2.560 x g; 20 min, 5 °C), o sobrenadante descartado e o precipitado lavado com 610 mL de uma solução 0,05% de CPC, centrifugado, nas mesmas condições descritas anteriormente, e dissolvido em 172 mL de uma solução de NaCl 2 M: etanol (100:15,v/v). Os PS foram precipitados com 305 mL de etanol absoluto (24 h a 4 °C). O precipitado obtido após centrifugação foi lavado duas vezes com 305 mL de etanol 80% e uma vez com etanol absoluto, sempre seguido de centrifugações nas mesmas condições descritas anteriormente. O material obtido foi então dialisado contra água destilada, liofilizado e denominado de PST (FARIAS *et al.*, 2000).

3.2.2 Análises química e físico-química dos PST da alga *C. mexicana*

3.2.2.1 Determinação do teor de carboidratos totais

Os CT foram determinados pelo método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 492 nm (MASUKO *et al.*, 2005). A D-galactose foi utilizada para a obtenção da curva-padrão.

3.2.2.2 Determinação do teor de sulfato

Foi determinado por hidrólise ácida (HCl 1 M, 5 horas, 105 °C) por turbidimetria e as leituras realizadas em espectrofotômetro a 500 nm pelo método da gelatina-bário (DODGSON & PRICE, 1962). O sulfato de sódio foi utilizado para a obtenção da curva padrão.

3.2.2.3 Determinação do teor de proteínas contaminantes

O teor de PC nas soluções de PST foi obtido segundo o método de Bradford (1976), utilizando Albumina Sérica Bovina (BSA) para obtenção da curva padrão.

3.2.2.4 Eletroforese em gel de agarose

Os PST foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 0,5% (Bioagency, São Paulo, SP) em tampão 1,3 - acetato diaminopropano 50 mM (pH 9,0). Os PST (10 µg) foram aplicados no gel e a corrida realizada em voltagem constante (110 V) durante 1 h. Após o procedimento, os PST presentes no gel foram fixados com uma solução de *N*-cetil-*N,N,N*-brometo de trimetilamônio a 0,1% por 24 horas. Em seguida, o gel foi corado com azul de toluidina a 0,1% e descorado com uma solução contendo etanol absoluto, água destilada e ácido acético concentrado (4,95: 4,95: 0,1; v⁻¹v⁻¹v⁻¹), como descrito por Dietrich e Dietrich (1976).

Devido à inexistência de padrões de polissacarídeos obtidos de algas marinhas, glicosaminoglicanos de animais (condroitim 4-sulfato (CS; ~40 kD), dermatam sulfato (DS; ~20 kD), heparam sulfato (HS; ~10kD)) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) foram

utilizados para a caracterização dos PST obtidos da alga quanto aos padrões e densidades de cargas negativas.

3.2.2.5 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)

Espectros na região do infravermelho dos PST foram obtidos em espectrofotômetro PERKIN ELMER SPECTRUM 100, utilizando-se pastilhas de KBr, na região de 4000 a 500 cm^{-1} .

3.2.3 Atividade antinociceptiva

Os ensaios de nocicepção foram realizados utilizando camundongos *Swiss* machos (20-25 g; n=6). Os animais receberam os seguintes tratamentos 30 min antes do estímulo nociceptivo: PST (5, 10 ou 20 mg/kg; i.v.), salina estéril (0,9%; i.v.) como controle negativo; indometacina (5 mg/kg; s.c), um AINES não específico para COX e morfina (5 mg/kg; s.c.), um opióide, como controles positivos. Após 30 minutos foram submetidos aos testes de contorções abdominais, formalina e placa quente como descritos logo abaixo.

3.2.3.1 Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético

O teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético é um modelo clássico de nocicepção, em que após a injeção intraperitoneal do agente nociceptivo, observam-se respostas que consistem em uma seqüência de contorções no abdômen acompanhadas por extensão dos membros inferiores. As contorções abdominais foram induzidas por ácido acético 1 % (i.p.), segundo o método descrito por Koster et al. (1959). Após administração do ácido acético, o número de contorções foi registrado durante 30 minutos.

3.2.3.2 Teste da formalina

O teste da formalina caracteriza-se por apresentar resposta bifásica distinta a um estímulo químico, sendo a primeira fase denominada neurogênica e a segunda fase, denominada de inflamatória (HUNSKAAR *et al.*, 1985). Após a injeção intraplantar de formalina (1% v/v; 20 μl / pata) na pata traseira direita do animal, foi registrado o tempo gasto

pelo animal para lambar a pata durante dois períodos: a 1ª fase, de 0-5 min (fase neurogênica) e 2ª fase, de 20-25 min (fase inflamatória).

3.2.3.3 *Teste da placa quente*

A atividade analgésica central foi avaliada pelo teste da placa quente segundo o método de Eddy e Leimbach (1953), que consiste em registrar o tempo (s) que os animais, quando em contato com uma placa de metal aquecida (51 ± 1 °C), levam para manifestar uma resposta, que corresponde ao ato de retirar ou lambar a pata traseira e/ou saltar. Este teste é específico para verificar a nocicepção central. Os animais primeiramente são familiarizados com a placa quente, para observação do tempo de reação controle. Os animais que apresentam um tempo de reação superior a 10 segundos são descartados do teste. As respostas ao estímulo térmico foram registradas nos intervalos de 30, 60 e 90 min após os tratamentos, sendo o tempo de reação observado por no máximo 40 s em cada intervalo.

3.2.4 *Atividade anti-inflamatória*

Os ensaios de inflamação foram realizados utilizando ratos *Wistar* machos (180-250 g; n=6). Os animais receberam os seguintes tratamentos 1 h antes do estímulo inflamatório: PST (5, 10 ou 20 mg/kg; s.c.), salina estéril (0,9%; s.c.) como controle negativo e dexametasona (1mg/kg; s.c) como controle positivo.

3.2.4.1 *Edema de pata induzido por carragenana*

O edema de pata induzido por λ -carragenana (Cg) foi realizado segundo o método de Winter *et al.* (1962). A Cg (500 μ g/pata) foi administrada por via s.c. na pata direita traseira do rato. Um grupo adicional recebeu apenas solução salina estéril (0,9%; s.c.). Os volumes da pata direita traseira de cada rato foram medidos através de hidropletismômetro antes da injeção do estímulo inflamatório (tempo zero) e nos intervalos de 1, 2, 3 e 4 horas após a administração do agente flogístico. O edema foi calculado como a diferença entre o volume de líquido (ml) deslocado pela pata em relação ao tempo do volume basal (tempo zero). Ao término do ensaio, os animais foram eutanasiados com cloral hidratado (20%) e a porção inferior da pata foi extraída e conservada (-80 °C) para a posterior dosagem de mieloperoxidase (MPO).

3.2.4.2 Determinação da atividade de mieloperoxidase

A determinação da atividade de MPO no tecido foi realizada segundo Bradley et al. (1982). Para tanto, 50 mg de tecido da pata foi homogeneizado em 1 ml tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0, contendo 0,5% de brometo de hexadecitrimetilamônio, utilizando um homogeneizador Polytron (dois ciclos de 10 s). Após centrifugação a 4000 x g por 12 min a 4 ° C, amostras dos sobrenadantes (7 µL) foram adicionadas ao tampão fosfato (200 µL) contendo diidrocloreto de o-dianisidina 1 mM e peróxido de hidrogênio 0,0005% em microplaca de 96 poços. A leitura foi lida a 450 nm tomando duas leituras em intervalos de 60 s. Foi considerado que 1 unidade de MPO converte 1 µmol de H₂O₂ em 1 min a 22 °C causando uma mudança na absorção de 1,13 x 10⁻² nm/min. Os resultados foram expressos como unidades de MPO/mg de tecido.

3.2.4.3 Edema de pata induzido por dextrana

O modelo do edema de pata induzido por dextrana foi realizado segundo Maity *et al.* (1998). A dextrana (400 µg/pata) foi administrado por via subcutânea na pata direita traseira. Os volumes da pata de cada rato foram medidos através de hidropletismômetro antes da injeção do estímulo inflamatório (tempo zero) e nos intervalos de 0,5; 1; 2; 3 e 4 horas após a administração do agente flogístico. O edema foi calculado como a diferença entre o volume de líquido (ml) deslocado pela pata em relação ao tempo do volume basal (tempo zero).

3.2.4.4 Edema de pata induzido por histamina e serotonina

Inicialmente os animais foram pré-tratados com PST (20 mg/kg; s.c.), 1 h antes da injeção dos mediadores inflamatórios histamina (100 µg/pata) e serotonina (20 µg/pata) na pata traseira direita do rato (MALING *et al.*, 1974).

O volume da pata foi medido pelo hidropletismômetro antes da injeção dos estímulos inflamatórios (tempo zero) e durante os intervalos 0,5; 1; 2; 3 e 4h após a administração dos estímulos. Os resultados foram expressos como a variação no volume líquido deslocado pela pata (ml), calculado como a diferença para o volume basal (tempo zero).

3.2.4.5 Participação da via heme oxigenase no efeito anti-inflamatório do PST

A fim de analisar o possível envolvimento da via heme oxigenase na atividade anti-inflamatória, os animais foram pré-tratados com zinco protoporfirina IX (3mg/kg; s.c.) (FREITAS *et al.*, 2006), seguida da aplicação dos PST (20 mg/kg; s.c.), após 1 h. Após mais 1 h, foi injetado carragenana (500 µg /pata). O volume da pata foi medido imediatamente antes do estímulo (tempo zero) e em intervalos de tempo selecionados (1, 2, 3 e 4h), utilizando um hidropletismômetro. Os resultados foram expressos como a variação no volume da pata (ml), calculado como a diferença para o volume basal (tempo zero).

3.3 Avaliação dos Efeitos Sistêmicos dos PST

Com a finalidade de avaliar os possíveis efeitos sistêmicos dos PST da alga marinha verde *C. mexicana*, administrou-se em camundongos uma dose única de PST (20 mg/kg, i.v.) e em seguida colocados em observação, com acesso livre a comida e água. Após 48 h, os animais foram anestesiados e amostras de sangue coletadas para dosagens bioquímicas (TGO, TGP, fosfatase alcalina e creatinina) e depois eutanasiados, tendo os órgãos retirados e pesados.

3.4 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. (Erro Padrão da Média). Para a verificação das diferenças estatísticas entre os grupos foi realizada Análise de Variância (ANOVA) e teste de Bonferroni e para valores não pareados foi utilizado o Teste de t-Student. Foi considerado significante $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Rendimento e Caracterização Parcial dos PST

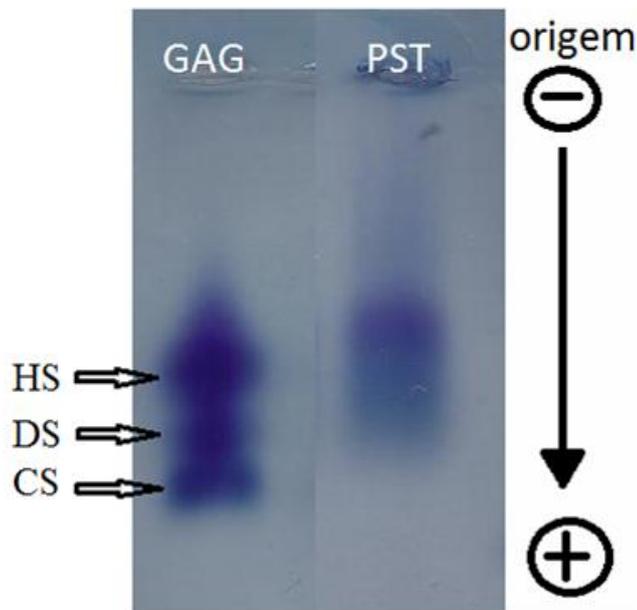
O rendimento da extração enzimática dos PST a partir de 5 g de alga seca foi de 1,7%. Esse resultado está de acordo com os obtidos em outros estudos envolvendo espécies de algas pertencentes ao mesmo gênero, como por exemplo os PST obtidos das algas *Caulerpa cupressóides* e *Caulerpa racemosa*, que apresentaram rendimentos de 3% e 2,2% respectivamente (RODRIGUES *et al.* 2011; RIBEIRO, 2012).

Os teores de carboidratos totais solubilizados e de grupos sulfato livre foram de 38% e 21,5%, respectivamente. Não foram encontrados contaminantes protéicos nos PST extraídos, comprovando dessa forma, a eficiência do método de extração empregado.

Os PST foram submetidos à eletroforese em gel de agarose em tampão 1,3- acetato diaminopropano e corados com azul de toluidina para visualização dos constituintes sulfatados dos polissacarídeos e assim avaliar sua densidade de carga e massa molecular aparente. Foram utilizados como padrões de massa molecular os glicosaminos glicanos (GAG) de animais, CS, DS e HS em face da inexistência de padrões de polissacarídeos para algas. Esse procedimento mostrou duas bandas polidispersas, sendo a primeira com mobilidade eletroforética semelhante ao HS e a outra ao DS (FIGURA 2). Esse resultado mostrou-se semelhante aos polissacarídeos sulfatados totais obtidos da alga verde *Caulerpa cupressoides*, pertencente ao mesmo gênero (RODRIGUES *et al.*, 2011).

No ensaio de eletroforese em gel de agarose em que se utiliza o tampão 1,3- acetato diaminopropano, a diamina interage com os grupamentos sulfatos presente nos PS, bloqueando suas cargas, e apenas aqueles grupos sulfatos que não interagiram com a diamina, devido a impedimentos estruturais provenientes de sua conformação, é que fazem o polissacarídeo migrar de um pólo em direção ao outro (DIETRICH e DIETRICH, 1976).

Figura 2 – Eletroforese em gel de agarose do polissacarídeos sulfatados totais da alga *Caulerpa mexicana*, corada com azul de toluidina



Fonte: Acervo do próprio autor.

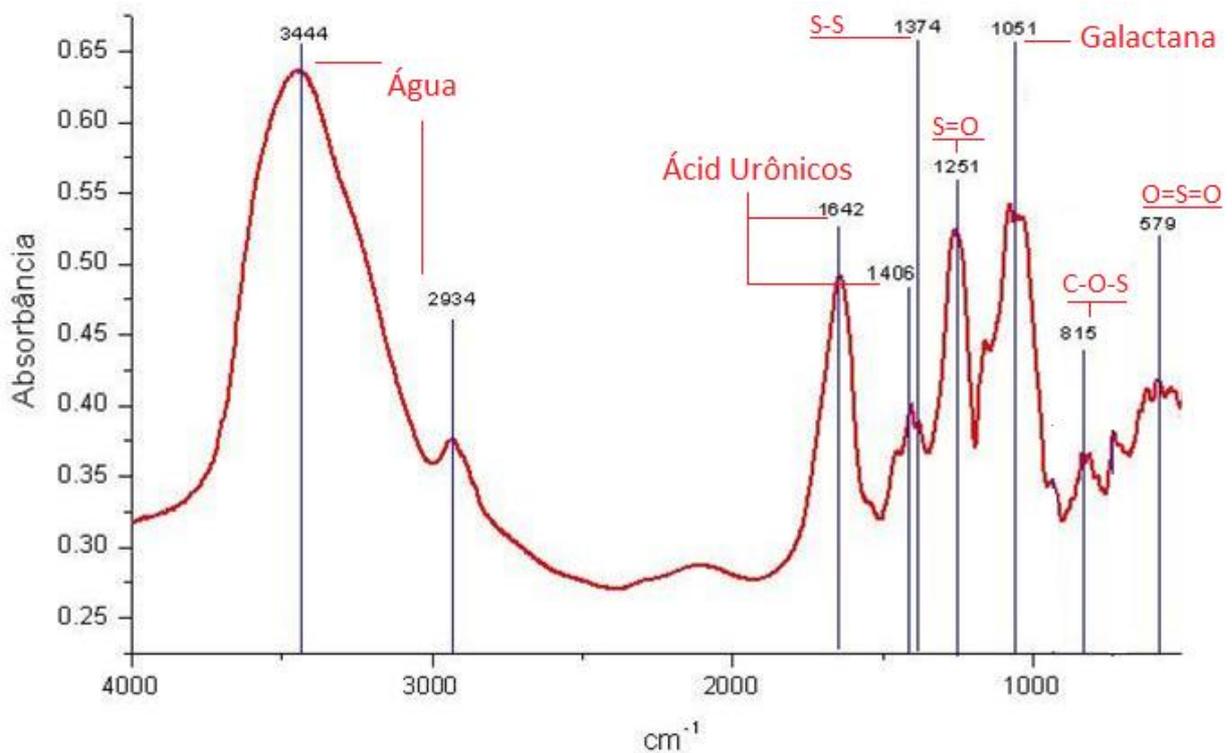
A coloração dos compostos sulfatados pelo azul de toluidina depende da conformação que o polissacarídeo assume após a corrida eletroforética. Assim, compostos muito sulfatados podem não se corar tão intensamente, se a conformação que ele assumir não permitir a interação do azul de toluidina com os grupos sulfato (MELO *et al.*, 2012).

4.1.1 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho

O emprego da técnica espectroscópica de infravermelho por transformação de Fourier é uma ferramenta importante para auxiliar na caracterização estrutural de polissacarídeos sulfatos de algas marinhas.

A Figura 3 mostra o espectro de IV obtido do PST da alga marinha verde *C. mexicana*. O perfil espectral de IV indicou sinais típicos de absorções em 1374; 1251; 815 e 579 cm^{-1} relacionados à presença de sulfato na estrutura química nativa do composto, correspondendo S-S; S=O; C-O-S e O=S=O, respectivamente (MAO *et al.*, 2009; JAULNEAU *et al.*, 2010; ARAÚJO *et al.*, 2011; COSTA, M. *et al.*, 2011).

Figura 3 – Espectro de IV na região entre 4000 a 500 do PST obtido da alga marinha verde *Caulerpa mexicana*



Fonte: Acervo do próprio autor.

Sinais característicos do estiramento de ligação de ácidos urônicos (1642 e 1406 cm^{-1}) foram detectados nos PST de *C. mexicana* (Figura 3) correspondendo ao estiramento da ligação (COO^-) (ZHANG *et al.*, 2008; RODRIGUES, 2011), além de uma banda em torno de 1051 cm^{-1} típica de galactana (JAULNEAU *et al.*, 2010). Em adição, uma banda de absorção em torno de 815 cm^{-1} foi observada indicando a presença da ligação C–O–S no carbono 6 da galactose (MAO *et al.*, 2009; COSTA *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2005), que vem sendo relatada como uma característica estrutural comum de polissacarídeos sulfatados de algas marinhas verdes do gênero *Caulerpa* (GHOSH *et al.*, 2004; CHATTOPADHYAY *et al.*, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2011)

4.2 Atividade Antinoceptiva

Ao longo do tempo, têm sido descritos vários estudos relacionados à dor e inflamação. Tradicionalmente, vem sendo utilizados modelos clássicos com animais para o entendimento dos mecanismos patológicos, das características do desenvolvimento e da resolução da dor e inflamação, bem como a avaliação dos possíveis efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios de novas substâncias, principalmente, as de origem natural (PINTO *et al.*, 2008; LOPES *et al.* 2009; LE BARS *et al.*, 2001).

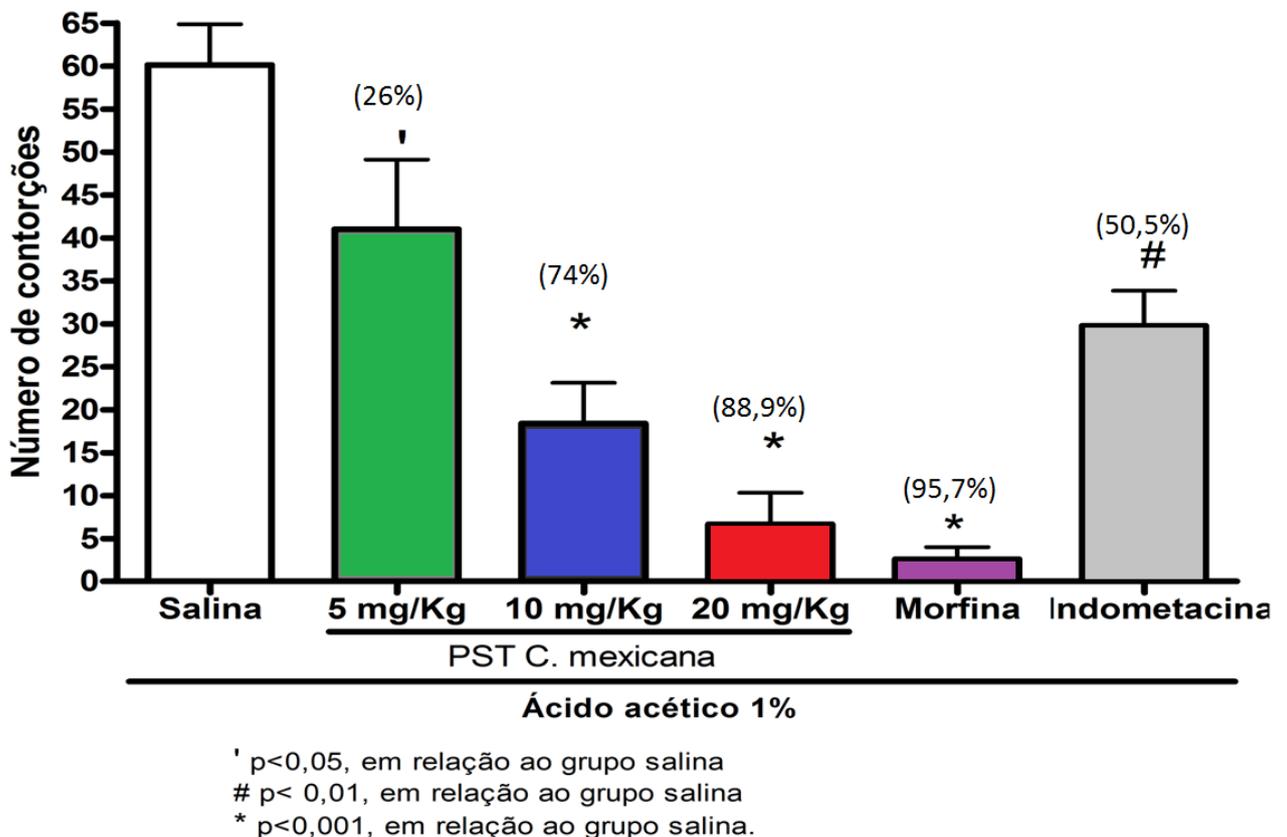
Os modelos utilizados na triagem de moléculas com potencial antinociceptivo comumente baseiam-se na observação da resposta animal frente à utilização de estímulos de diversos tipos e duração. Dessa forma, os modelos experimentais utilizados no estudo da dor são divididos em três categorias, que são classificadas de acordo com os mecanismos de desencadeamento do efeito nociceptivo em estímulos mecânicos, térmicos e químicos (ALMEIDA; OLIVEIRA, 2006; LE BARS *et al.*, 2001).

Estudos realizados com extratos polissacarídeos sulfatados totais obtidos por extração enzimática e suas frações polissacarídicas sulfatadas de algas marinhas vem demonstrando uma variedade de efeitos antinociceptivos em modelos clássicos de dor por indução química (ácido acético e formalina) e por indução térmica (placa quente) (ARAÚJO *et al.*, 2011; COURA *et al.*, 2011; RIBEIRO, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2012).

4.2.1 Efeito dos PST nas contorções abdominais induzidas por ácido acético

Para avaliar o potencial antinociceptivo dos PST foi utilizado o teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. Os camundongos tratados com PST nas doses de 5; 10 e 20 mg/kg (i.v.), 30 min antes do estímulo químico (ácido acético 1%), demonstraram uma redução significativa de maneira dose dependente no número de contorções abdominais, observadas por um período de 30 minutos, de 26% na dose de 5 mg/kg, de 74,5% para a dose de 10 mg/kg e 88,9% para a dose de 20 mg/kg. Os controles positivos Morfina (5 mg/kg) e Indometacina (5 mg/kg) apresentaram inibição no número de contorções de 95,7% e 50,5%, respectivamente (FIGURA 4).

Figura 4 - Efeito do PST no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos



Fonte: Acervo do próprio autor.

O número de contorções foi determinado durante 30 minutos após injeção i.p. de ácido acético 1% em camundongos. PST (5, 10 ou 20 mg/kg, i.v.) ou salina (i.v.) foram aplicados 30 min antes do ácido acético. Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. (n=6). $p < 0,05$ comparando com o controle salina (NaCl 0,15 M) (ANOVA; Teste de Bonferroni).

O ácido acético causa a liberação de mediadores endógenos como prostaglandinas, histamina, bradicinina, serotonina, além de estimular as terminações nervosas diretamente pela redução do pH. Contudo, a inibição ou redução do número de contorções abdominais em resposta ao ácido acético é obtida com uma variedade muito grande de substâncias, agindo de diferentes maneiras. Dessa forma, o teste é caracterizado pela baixa especificidade de resposta a uma determinada droga (LE BARS *et al.*, 2001).

Neste estudo os achados corroboram com os dados da literatura onde as frações polissacarídicas sulfatadas das espécies de algas verdes pertencentes ao mesmo gênero, *C. cupressoides* (RODRIGUES *et al.*, 2012) e *C. racemosa* (RIBEIRO, 2012) foram capazes de inibir o número de contorções em 90,6% e 60%, respectivamente. Já os PST da alga vermelha

Gracilaria cornea também foram capazes de inibir em 96,3% (COURA *et al.* 2011), e as frações polissacarídicas sulfatadas obtidas por cromatografia de troca iônica em DEAE das algas vermelhas *Acanthophora muscoides* e *Solieria filiformes* reduziram as contorções em 71,3% (QUINDERÉ, 2011) e 70,19% (ARAÚJO *et al.*, 2011), respectivamente.

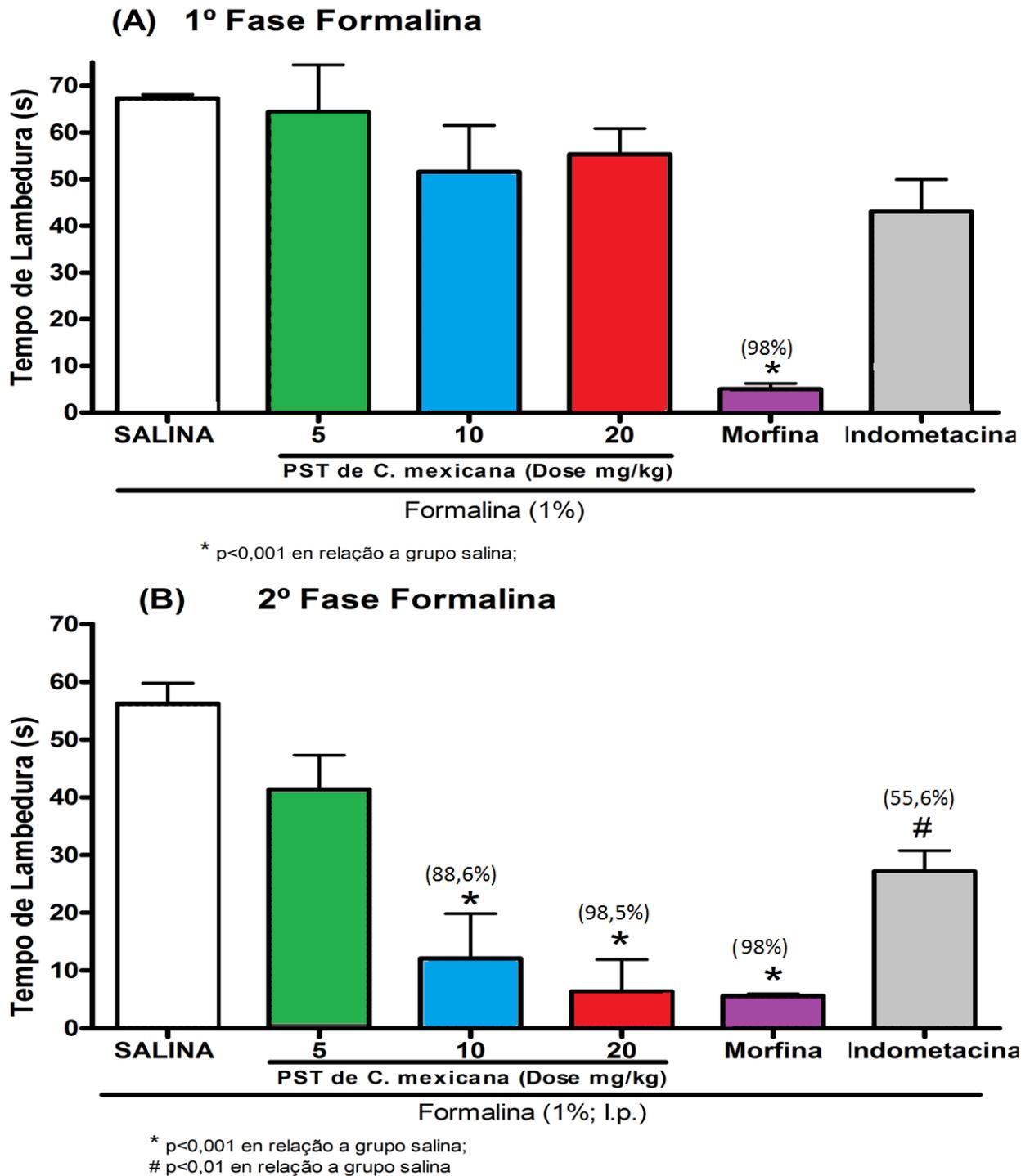
4.2.2 Efeito do PST no teste da formalina

Como o modelo de contorções induzidas pelo ácido acético é reconhecidamente inespecífico e responde tanto a drogas com ação central, como periférica, foram realizados os testes da formalina e da placa quente, para melhor elucidar o efeito antinociceptivo dos PST.

O teste da formalina é dividido em duas fases onde, a primeira fase é caracterizada pela ação direta sobre os nociceptores e ativação das fibras-C, sendo chamada de fase neurogênica. A segunda fase é denominada de fase inflamatória, envolvendo a liberação de mediadores locais e sensível a drogas de ação periférica como AINES e dexametasona (HUNSKAAR *et al.*, 1985; TJOLSEN *et al.*, 1992).

No tratamento dos animais com os PST (5; 10 ou 20 mg/kg; i.v.), 30 min antes do estímulo químico (formalina 1%), como visto na Figura 5-A, não se observa redução no tempo de lambertura da pata na primeira fase do ensaio, demonstrando que os PST não apresentam efeito antinociceptivo na fase neurogênica. Portanto, não sugestivo de efeito de ação central. Na segunda fase, os PST mostram efeito antinociceptivo significativo nas doses de 10 mg/kg (88,6%) e de 20 mg/kg (98,5%) de forma dose dependente (FIGURA 5-B), sugerindo uma ação periférica, atuando diretamente na ação ou na liberação dos mediadores inflamatórios envolvidos no mecanismo nociceptivo. A dose do PST de 20 mg/kg apresentou, na segunda fase do teste, um efeito antinociceptivo semelhante ao da Morfina (5mg/kg) e superior ao da Indometacina (5mg/kg).

Figura 5 - Efeito dos PST no teste da formalina em camundongos



Fonte: Acervo do próprio autor.

O tempo de lambedura da pata foi determinado durante os 5 primeiros minutos (1ª fase – Painele A) e durante 20-25 min (2ª fase – Painele B) por injeção de formalina 1% em camundongos. Morfina (5 mg/kg; s.c), indometacina (5 mg/kg; s.c), PST (5, 10 ou 20 mg/kg, i.v.) ou salina (i.v.) foram aplicadas 30 min. antes da formalina. Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. (n=6). $p < 0,05$ comparando com o controle salina (NaCl 0,15 M) (ANOVA; Teste de Bonferroni).

Contrariamente, o grupo controle positivo morfina (5 mg/kg; s.c.) foi capaz de reduzir o tempo de lambedura dos animais, em ambas as fases do teste. Enquanto, o grupo controle positivo indometacina (5 mg/kg; s.c.) mostrou efeito significativo somente na segunda fase do teste (55,6%). Este efeito corrobora com a literatura, que mostra que drogas específicas de ação central, tais como a morfina, diminuem o tempo de lambedura da pata dos animais em ambas as fases do teste e que AINES como a indometacina são de ação periférica, por inibir a nocicepção apenas na segunda fase do teste, 20-30 minutos após a injeção intraplantar de formalina (HUNSKAAR & HOLE, 1987; LE BARS *et al.*, 2001; ALMEIDA; OLIVEIRA, 2006).

Esses dados corroboram com os dados encontrados por Ribeiro (2012), Araújo *et al.* (2011) e Quinderé, (2011), onde frações polissacarídicas sulfatadas da alga verde *C. racemosa* e das algas vermelhas *S. filiformis* e *A. muscoides*, respectivamente, apresentaram redução no tempo de lambedura da pata somente na segunda fase do teste da formalina.

Porém, Matta *et al.* (2011) em estudos de nocicepção realizados com extratos metanólico, acetato, hexano e clorofórmio da alga *C. mexicana*, demonstraram que todos foram capazes de diminuir o tempo de lambedura da pata nas duas fases do teste da formalina. De maneira semelhante, Rodrigues *et al.* (2012) trabalhando com uma fração polissacarídica sulfatada da alga verde *C. cupressoides*, também encontraram ação antinociceptiva nas duas fases.

Shibata *et al.* (1989) estudando os mecanismos envolvidos no teste da formalina construíram curvas dose respostas de vários analgésicos com diferentes mecanismos de ação nociceptiva e observaram que as drogas de ação central como morfina, meperidina e codeína provocavam inibição nas duas fases; os inibidores da ativação das fibras C e de substância P inibiram somente a primeira fase; os inibidores de bradicinina reduziram o estímulo nas duas fases apresentando efeito maior na segunda fase e quando associados, esses inibidores potencializaram os efeitos dos AINEs e, os inibidores de serotonina e histamina, assim como os AINEs tiveram ação somente na segunda fase.

Comparando os dados de nocicepção deste estudo com os relatados na literatura podemos sugerir que o mecanismo de ação dos PST de *C. mexicana* não está relacionado com a estimulação direta das terminações nervosas seguido pela liberação de substância P e nem com a inibição de bradicinina. Possivelmente, esteja relacionado com ação das aminas vasoativas e prostaglandinas, assim como outros mediadores inflamatórios.

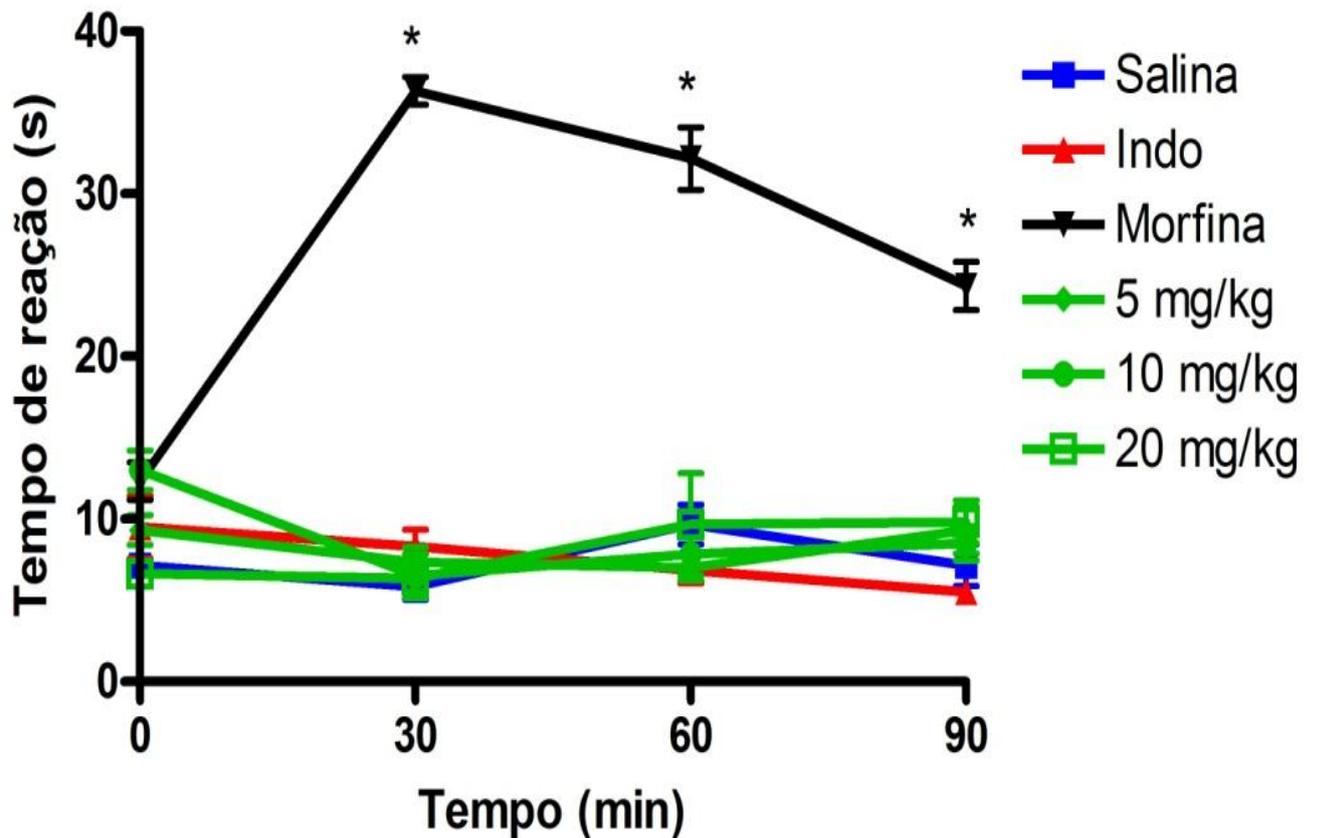
4.2.3 Efeito do PST no teste da placa quente

O teste da placa quente tem sido utilizado para avaliação de substâncias com propriedades nociceptivas que agem, principalmente, por via central (LE BARS *et al.*, 2001; GUPTA *et al.*, 2005). Neste método, o tempo de latência para a observação do comportamento de lambadura ou a retirada da pata ou salto do animal em resposta ao estímulo térmico gerado pela placa aquecida é utilizado como parâmetro para avaliação da atividade analgésica de um determinado composto. Esses comportamentos são interpretados como respostas supra-espinhais de integração cortical (LE BARS *et al.*, 2001; ALMEIDA; OLIVEIRA, 2006).

Os resultados da Figura 6, mostram que o tratamento (i.v.) dos animais com PST (5; 10 ou 20 mg/kg), 30 min antes do estímulo térmico, não produziu efeito antinociceptivo. Ou seja, nenhuma das doses foi capaz de induzir aumento do período de latência nos intervalos avaliados. O tratamento com morfina (5 mg/kg), grupo controle positivo, foi capaz de prolongar significativamente o tempo de resposta dos animais, enquanto o grupo indometacina (5 mg/kg) também não apresentou efeito antinociceptivo, comparado ao grupo salina. Corroborando com o ensaio da formalina, o teste da placa quente confirmou a ausência de ação na dor neurogênica, sugerindo que o PST da *C. mexicana* não tem propriedade antinociceptiva de ação central.

Estes resultados mostraram-se semelhantes aos obtidos para as frações polissacarídicas das algas vermelhas *S. filiformes* (ARAÚJO *et al.*, 2011) e *A. muscoides* (QUINDERÉ, 2011) e da alga verde *C. racemosa* (RIBEIRO, 2012), mas diferem da fração polissacarídica da alga verde *C. cupressoides* (RODRIGUES *et al.*, 2012) e dos PST da alga vermelha *G. cornea* (COURA *et al.* 2011), que foram capazes de prolongar significativamente o tempo de resposta ao estímulo térmico. Assim, como observado por Matta *et al* (2011), que ao testar extratos metanólicos, acetato, hexânico e cloroformico de *C. mexicana* verificou aumento no tempo de latência no teste da placa quente, demonstrando efeito nociceptivo de ação central.

Figura 6 - Efeito antinociceptivo dos PST no teste da placa quente em camundongos



Fonte: Acervo do próprio autor.

Foram aplicadas morfina (5 mg/kg, s.c.), indometacina (5 mg/kg, s.c), PST (5, 10 ou 20 mg/kg, i.v.) ou salina (i.v.) Os valores representam a média \pm E.P.M. (n=6) do tempo de reação (s). $p < 0,05$ comparando com o controle salina (NaCl 0,15 M). (ANOVA; Teste de Bonferroni).

A análise dos resultados nos permitem sugerir que os PST de *C. mexicana* têm ação antinociceptiva de ação periférica podendo estar relacionados com a liberação de mediadores envolvidos na dor inflamatória. Assim, torna-se de suma importância avaliar as ações anti-inflamatórias destes PST em modelos envolvendo diferentes agentes inflamatórios, para melhor caracterização da sua ação farmacológica.

4.3 Atividade anti-inflamatória

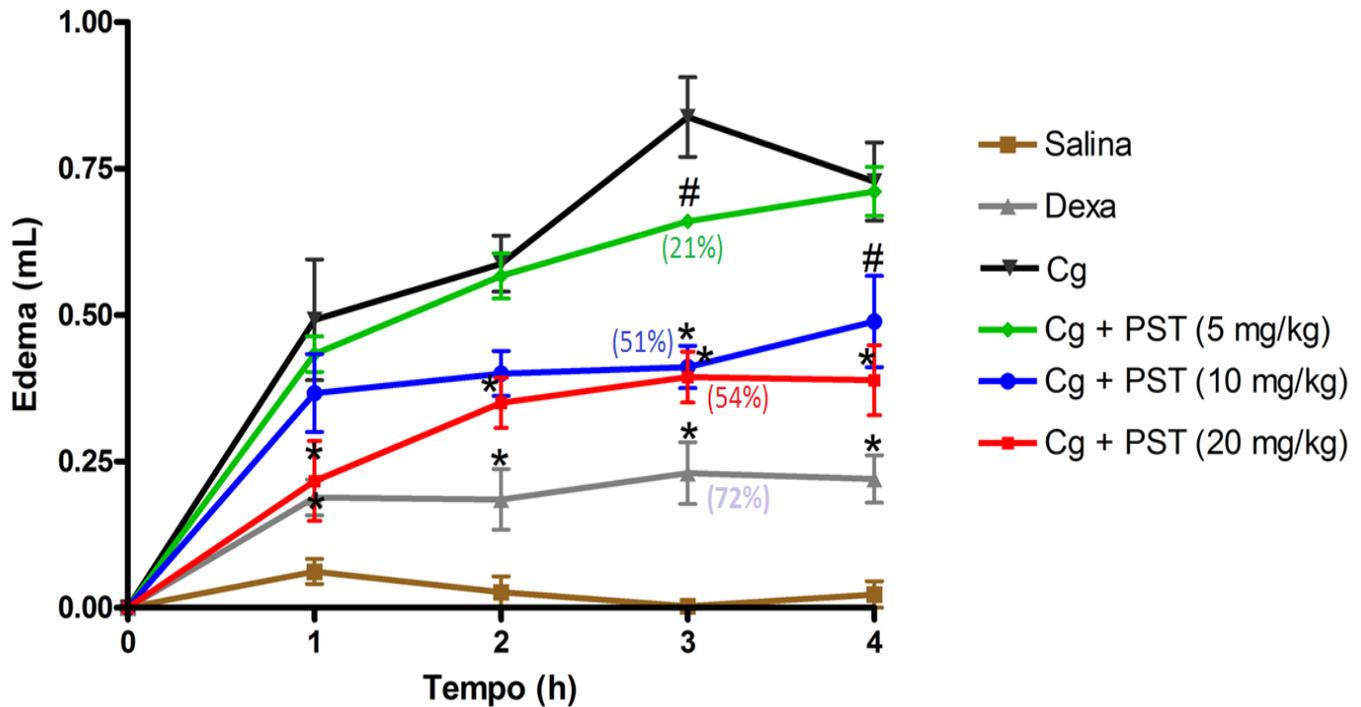
Estudos realizados com extratos polissacarídeos sulfatados totais obtidos por extração enzimática e suas frações polissacarídicas sulfatadas de algas marinhas vem demonstrando uma variedade de efeitos pró e anti-inflamatórios evidenciados pelos modelos de edema de pata induzidos por carragenana e/ou dextrana, além da dosagem da MPO nos tecidos injuriados (ARAÚJO *et al.*, 2011; COURA *et al.*, 2011; VANDERLEI *et al.*, 2011; RIBEIRO, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2012).

4.3.1 Efeito dos PST no edema de pata induzido por Carragenana e na dosagem da mieloperoxidase

O edema de pata induzido por Cg tem sido amplamente utilizado na investigação de agentes anti-inflamatórios, sendo talvez o modelo de edema melhor estudado (EL-SHENAWY *et al.*, 2002). A Cg é um agente inflamatório capaz de produzir edema na pata em roedores caracterizado pelo extravasamento inicial de proteínas plasmáticas, seguido de água e células do sistema imunológico para o meio extravascular, formando um exsudato aquoso contendo proteínas plasmáticas, com extravasamento de neutrófilos e metabólicos do ácido araquidônico oriundos da via da cicloxigenase e lipoxigenase (GARCIA-LEME *et al.*, 1973; ZHANG *et al.*, 2007).

A administração dos PST (5; 10 ou 20 mg/kg; s.c.), 1 hora antes do processo inflamatório provocado pela injeção de Cg, foi capaz de inibir significativamente o edema de forma dose dependente. Na dose de 5 mg/kg, observou-se uma redução significativa na terceira hora de 21% (Cg: $0,83 \pm 0,06$ mL; PST: $0,66 \pm 0,01$ mL); na de 10 mg/kg houve uma redução de 51% na terceira hora ($0,41 \pm 0,03$ mL) e de 30% na quarta hora ($0,48 \pm 0,07$ mL). A dose de 20 mg/kg e o controle positivo dexametasona (1 mg/kg; s.c.) reduziram de forma significativa o edema em todas as horas. Sendo que a dose de 20 mg/kg reduziu em 57% na 1ª hora (Cg: $0,4 \pm 0,06$ mL ; PST: $0,21 \pm 0,06$ mL), 41% na 2ª hora (Cg: $0,58 \pm 0,04$ mL; PST: $0,35 \pm 0,04$ mL), 54% na 3ª hora (Cg: $0,83 \pm 0,06$ mL; PST: $0,39 \pm 0,04$ mL) e 46% na 4ª hora (Cg: $0,72 \pm 0,06$ mL; PST: $0,38 \pm 0,06$ mL) em relação ao grupo controle negativo Cg. No tratamento com dexametasona (1 mg/kg; s.c.) a maior redução do edema foi na 3ª hora (Cg: $0,83 \pm 0,06$ mL; Dexa: $0,23 \pm 0,05$ mL) com 72% de inibição em relação ao grupo controle Cg (FIGURA 7).

Figura 7 - Efeito dos PST no modelo de edema de pata induzido por carragenana em ratos



$p < 0,05$, em relação ao grupo Cg;

* $p < 0,001$, em relação ao grupo Cg.

Fonte: Acervo do próprio autor.

PST (5, 10 ou 20 mg/kg, s.c.), dexametasona (1 mg/kg, s.c.) ou salina (NaCl 0,15 M; s.c.) foram administradas 1 hora antes da injeção s.c. de carragenana (Cg) (40 μ L; 500 μ g/pata). Os volumes das patas foram medidos através de pletismômetro nos tempos 0, 1, 2, 3 e 4 h após injeção do estímulo inflamatório Cg. Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. (n=6). $p < 0,05$ comparando com o controle carragenana (ANOVA; Teste de Bonferroni).

O evento inflamatório iniciado pela administração intraplantar de Cg, cujo pico edematogênico máximo é na 3ª hora, caracteriza-se por três fases, onde a primeira fase seria mediada principalmente pela liberação local de histamina e serotonina (0 – 1,5 h), a segunda estaria relacionada à liberação de citocinas e a terceira (2,5 – 6 h) estaria relacionada à liberação de prostaglandinas (DI ROSA *et al.*, 1971). Esse aumento nos níveis de prostaglandinas coincide com a infiltração celular, na maioria neutrófilos, que contribui para a produção de outros mediadores, incluindo espécies reativas de oxigênio, proteases e peroxidases como a MPO, cuja mensuração tem sido utilizada como marcador da infiltração neutrofílica (POSADAS *et al.*, 2004).

Na intenção de se certificar do efeito anti-inflamatório apresentado pelos PST no modelo de edema de pata induzido por Cg e buscando verificar a importância do influxo celular na inibição do edema, nossos estudos estenderam-se na tentativa de correlacionar esses dados com a dosagem da MPO nas patas estimuladas pela Cg.

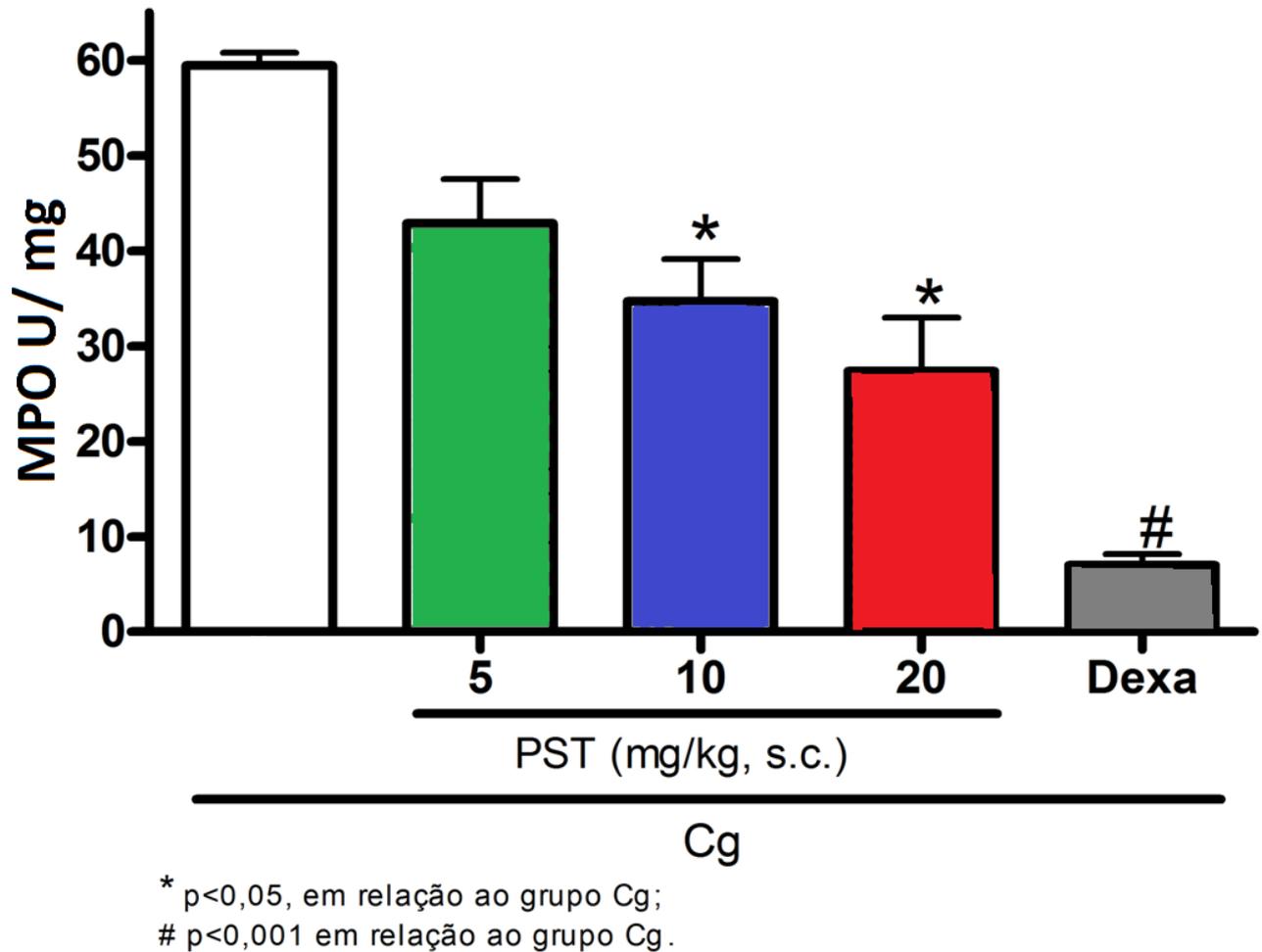
Os níveis teciduais da MPO são considerados marcadores bem padronizados de infiltração de células leucocitárias, principalmente neutrófilos em tecidos lesados e têm sido claramente utilizados na correlação com a gravidade do processo inflamatório (POSADAS *et al.*, 2004; WENDLAND *et al.*, 2007; ARAÚJO *et al.*, 2011; VANDERLEI *et al.*, 2011).

Essa enzima é encontrada predominantemente em neutrófilos, monócitos e em alguns subtipos de macrófagos teciduais. Representa mais de 5% do conteúdo protéico total da célula em neutrófilos e 1% nos monócitos e é o principal constituinte dos grânulos azurófilos dos neutrófilos, prontamente liberada após ativação por diferentes estímulos inflamatórios, contribuindo para a defesa imune inata do organismo (WENDLAND *et al.*, 2007).

No presente estudo a dosagem da MPO foi realizada nas amostras de tecidos removidos das patas após o ensaio do edema de pata induzido por carragenana. Os resultados obtidos demonstraram que os PST reduziram significativamente a atividade da MPO somente nas doses de 10 e 20 mg/kg, confirmando a ação dos PST na inibição do infiltrado celular, mostrado no ensaio de edema de pata induzido por carragenana (FIGURA 8).

Os dados encontrados corroboram com os da literatura para polissacarídeos sulfatados de algas verdes do gênero *Caulerpa*, onde uma fração polissacarídica sulfatada de *C. cupressoides* reduziu de forma significativa o edema de pata induzido por Cg em todas as horas (RODRIGUES *et al.*, 2012) e a fração polissacarídica sulfatada da alga *C. racemosa* (1 mg/kg) apresentou redução do edema induzido por Cg em todas as horas, alcançando maior inibição (79%) na 3ª hora e 74% de redução da MPO em relação ao grupo Cg (RIBEIRO, 2012). Ambas as frações apresentaram efeitos semelhantes à dexametasona (1 mg/kg), tanto para inibição do edema de pata induzido por Cg, como para a dosagem de MPO.

Figura 8 - Atividade da mieloperoxidase no homogenato do tecido das patas dos animais tratados com Cg



Fonte: Acervo do próprio autor.

PST (5, 10 e 20 mg/kg, s.c.), dexametasona (Dexa, 1 mg/kg, s.c.) ou salina estéril (NaCl 0,15 M; s.c.) foram administradas 1 h antes da injeção s.c. de carragenana (Cg) (40 μ L; 500 μ g/pata). Os resultados foram expressos em unidades atividade da MPO/ mg de tecido. Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. (n=6). $p < 0,05$ comparando com o controle Cg. (ANOVA; Teste de Bonferroni).

Vale ressaltar que os resultados da dose de 20 mg/kg no edema Cg, mostraram-se semelhantes aos observados nos animais tratados com o controle positivo dexametasona, um corticóide de ação ampla na inibição do processo inflamatório, sugerindo múltiplos mecanismos de ação, tais como, inibição das vias da cicloxigenase e lipoxigenase, citocinas e principalmente a expressão de moléculas de adesão e infiltrado leucocitário, sugeridos pela redução da dosagem da MPO.

4.3.2 Efeito dos PST no edema de pata induzido por Dextrana, Histamina ou Serotonina

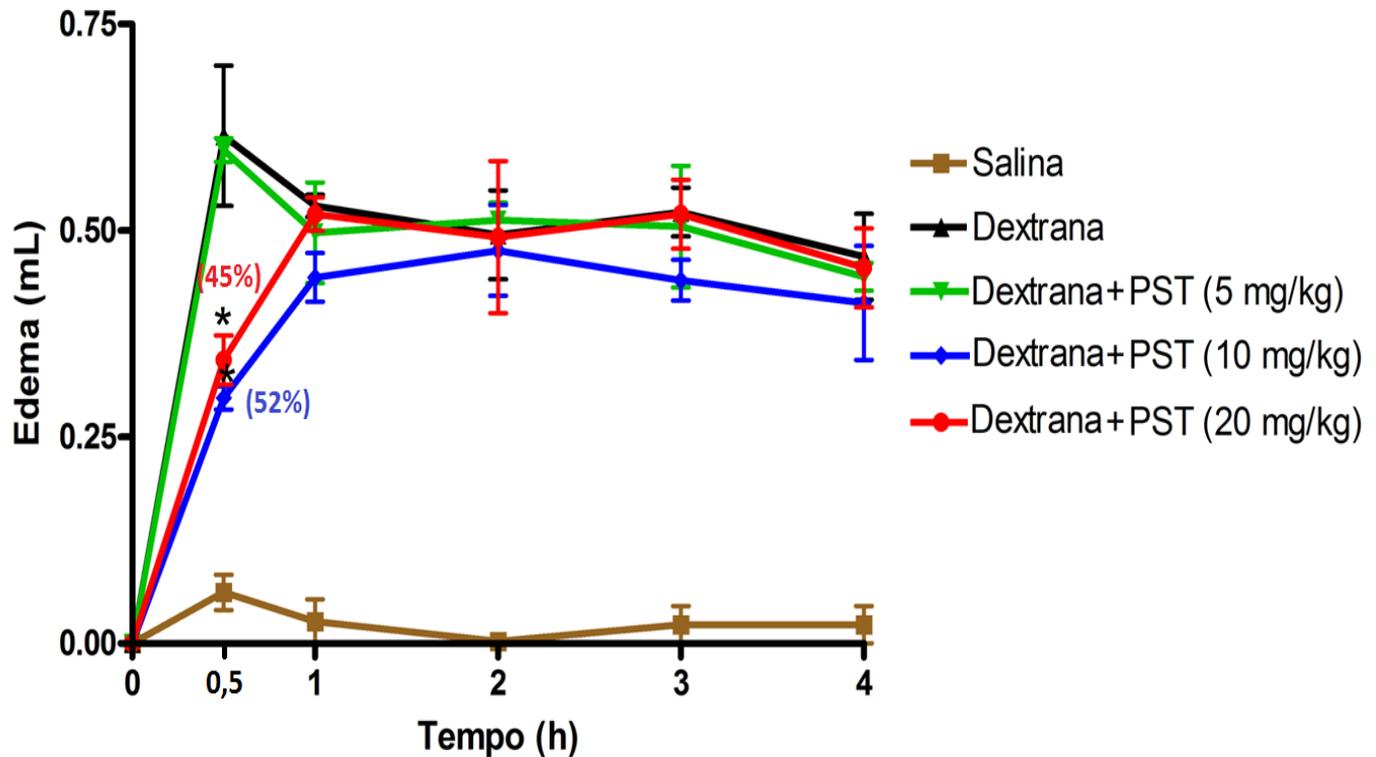
O edema de pata induzido por dextrana apresenta um mecanismo diferente do edema de pata induzido por carragenana. Embora ambos, promovam aumento da permeabilidade vascular, no edema induzido por dextrana este fenômeno ocorre devido à desgranulação dos mastócitos, com a subsequente liberação de mediadores vasoativos, como histamina e serotonina. Outra diferença é que o exsudato, que ocorre como consequência desse processo, apresenta uma baixa quantidade de proteínas e neutrófilos. Assim o edema induzido por dextrana apresenta um rápido extravasamento de fluido, com poucas proteínas e componentes celulares (LO *et al.*, 1982).

A administração dos PST (5, 10 ou 20 mg/kg; s.c.), 1 hora antes da aplicação subplantar de dextrana (400 µg/pata), reduziu o edema de forma significativa no pico da primeira meia hora após a aplicação de dextrana nas doses de 10 e 20 mg/kg, demonstrando uma redução de 52% ($0,29 \pm 0,01$ mL) e 45% ($0,34 \pm 0,03$ mL), respectivamente, quando comparado ao grupo controle dextrana ($0,61 \pm 0,08$ mL). A dose de 5 mg/kg ($0,59 \pm 0,01$ mL) não reduziu o edema (FIGURA 9).

Vários estudos relacionados com polissacarídeos sulfatados de algas marinhas apresentam efeitos inibitórios em edema de pata induzido por dextrana, mas há poucos relatos para polissacarídeos sulfatados de algas do gênero *Caulerpa*. Recentemente, Ribeiro (2012) trabalhando com uma fração polissacarídica sulfatada da alga *C. racemosa* relatou uma redução de 59% no tempo de 30 min após o estímulo de dextrana. Em outros estudos com os PST da alga vermelha *G. cornea* e frações polissacarídicas sulfatadas das algas *G. birdiae*, *Gelidium crinale* e *S. filiformis* foi demonstrado uma redução do edema induzido por dextrana de maneira significativa nos primeiros 30 min, sendo essa redução de 52,8, 48, 34 e 38,5%, respectivamente (COURA *et al.*, 2011; VANDERLEI *et al.*, 2011; SOUSA *et al.*, 2011; ARAÚJO *et al.*, 2011).

O efeito antiedematogênico no edema de pata induzido por dextrana pode estar relacionado com os eventos inflamatórios que envolvem a inibição do edema osmótico, agindo sobre vários mediadores, tais como, a histamina e serotonina. Por esse motivo buscou-se verificar o efeito dos PST de *C. mexicana* no edema provocado por estes mediadores.

Figura 9 - Efeito dos PST no modelo de edema de pata induzido por dextrana em ratos



* $p < 0,001$ em relação ao grupo Dextrana

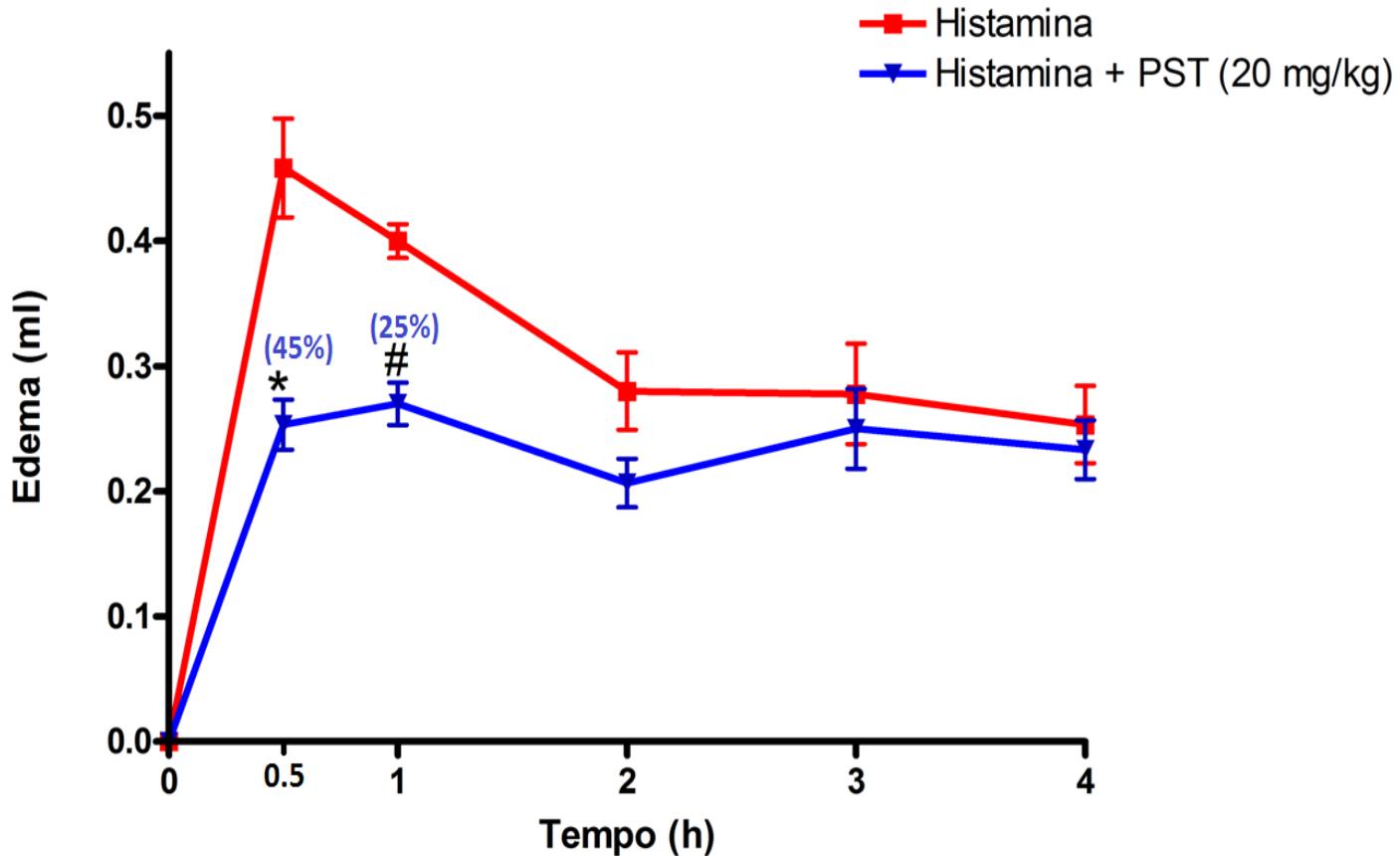
Fonte: Acervo do próprio autor.

PST (5, 10 e 20 mg/kg, s.c.) ou salina estéril (NaCl 0,15 M; s.c.) foram administradas 1 h antes da injeção subplantar de Dextrana (400 μ g/pata). Os volumes das patas foram medidos através de pletismômetro nos tempos 0; 0,5; 1; 2; 3 e 4 h após injeção do estímulo inflamatório. Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. (n=6). $p < 0,05$ comparando com o controle salina (ANOVA; Teste de Bonferroni).

A histamina, um mediador inflamatório conhecido, estando associado à resposta dolorosa, aumentando a hiperalgesia e ativando diretamente nociceptores na dor inflamatória. Encontra-se principalmente estocada em grânulos no interior de mastócitos e é um dos principais mediadores da resposta alérgica, tendo sua liberação associada principalmente com a sensação de prurido (FERREIRA *et al.*, 1990).

A administração dos PST (20 mg/kg; s.c.), 1 hora antes da aplicação de injeção subplantar de histamina (100 μ g/pata), reduziu o edema de forma significativa aos 30 minutos e na primeira hora, demonstrando reduções de 45% (0,25 \pm 0,02 mL) e 25% (0,27 \pm 0,01 mL), respectivamente, quando comparado ao grupo controle histamina nos tempos 0,5 h (0,45 \pm 0,03 mL) e 1 h (0,40 \pm 0,01 mL) (FIGURA 10). Corroborando com os resultados do ensaio de edema de pata induzido por dextrana.

Figura 10 - Efeito dos PST no modelo de edema de pata induzido por histamina em ratos



* $p < 0,001$, em relação ao grupo Histamina
 # $p < 0,01$, em relação ao grupo Histamina

Fonte: Acervo do próprio autor.

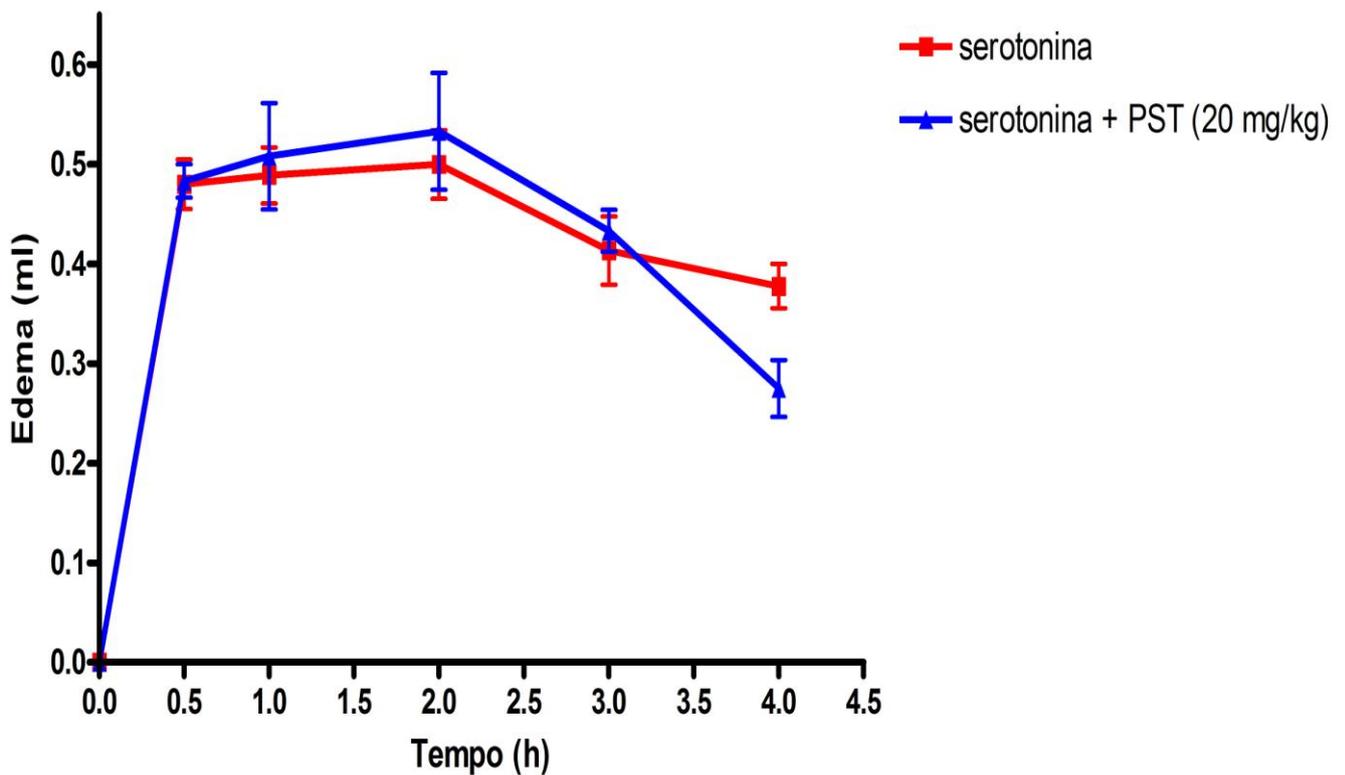
PST (20 mg/kg, s.c.) ou salina estéril (NaCl 0,15 M; s.c.) foram administradas 1 h antes da injeção subplantar de Histamina (100 µg/pata). Os volumes das patas foram medidos através de pletismômetro nos tempos 0; 0,5; 1; 2; 3 e 4 h após injeção do estímulo inflamatório. Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. (n=6). $p < 0,05$ comparando com o grupo histamina (ANOVA; Teste de Bonferroni).

A serotonina é responsável por alterações vasculares, com a indução de edema e extravasamento plasmático durante a inflamação aguda. Tais situações ocorrem tanto de maneira direta, através da ligação 5-HT/receptor neuronal, quanto indireta, por meio de interação com células encontradas no local da lesão e a conseqüente liberação de outras substâncias pró inflamatórias. Acredita-se que sua principal fonte de liberação nos tecidos periféricos ocorra principalmente a partir de mastócitos e plaquetas (SOMMER, 2004; YANGUO et al, 2006; TING et al., 2007).

A administração dos PST (20 mg/kg) de *C. mexicana*, 1 hora antes da aplicação subplantar de serotonina (20 µg/pata), não foi capaz de reduzir o edema de forma significativa em nenhuma das horas testadas, demonstrando não haver relação entre a atividade antiedematogênica dos PST da *C. mexicana* com os efeitos da serotonina (FIGURA 11).

Os nossos resultados mostram semelhanças com os relatados por Sousa *et al.*, (2011), que demonstraram que uma fração polissacarídica sulfatada da alga vermelha *G. crinale* inibiu o edema de pata induzida por histamina em 49% e induzido pelo composto 48/80 em 32%, não sendo eficaz na redução de edemas induzidos por serotonina ou bradicinina.

Figura 11 - Efeito dos PST no modelo de edema de pata induzido por serotonina em ratos



Fonte: Acervo do próprio autor.

PST (20 mg/kg, s.c.) ou salina estéril (NaCl 0,15 M; s.c.) foram administradas 1 h antes da injeção subplantar de Serotonina (20 µg/pata). Os volumes das patas foram medidos através de pletismômetro nos tempos 0; 0,5; 1; 2; 3 e 4 h após injeção do estímulo inflamatório. Os dados foram expressos como média ± E.P.M. (n=6). $p < 0,05$ comparando com o grupo serotonina + salina (ANOVA; Teste de Bonferroni).

É conhecido que o composto 48/80 induz a liberação de histamina e serotonina a partir de mastócitos causando edema em ratos, principalmente por causa da serotonina, e que sua participação é inibida aproximadamente em 1/3 por antagonistas seletivos de histamina e de aproximadamente 2/3 por antagonistas seletivos de serotonina sendo quase suprimida pelo associação dos dois agentes (ROWLEY; BENDITT, 1956; MALING *et al.*, 1974).

Com base nos nossos achados podemos afirmar que os PST de *C. mexicana* inibe o edema induzido por histamina e que é um dos mecanismos envolvidos na atividade anti-inflamatória no edema osmótico induzido por dextrana e na fase inicial do edema induzido por carragenana.

4.3.3 Participação da via heme oxigenase no efeito anti-inflamatório do PST

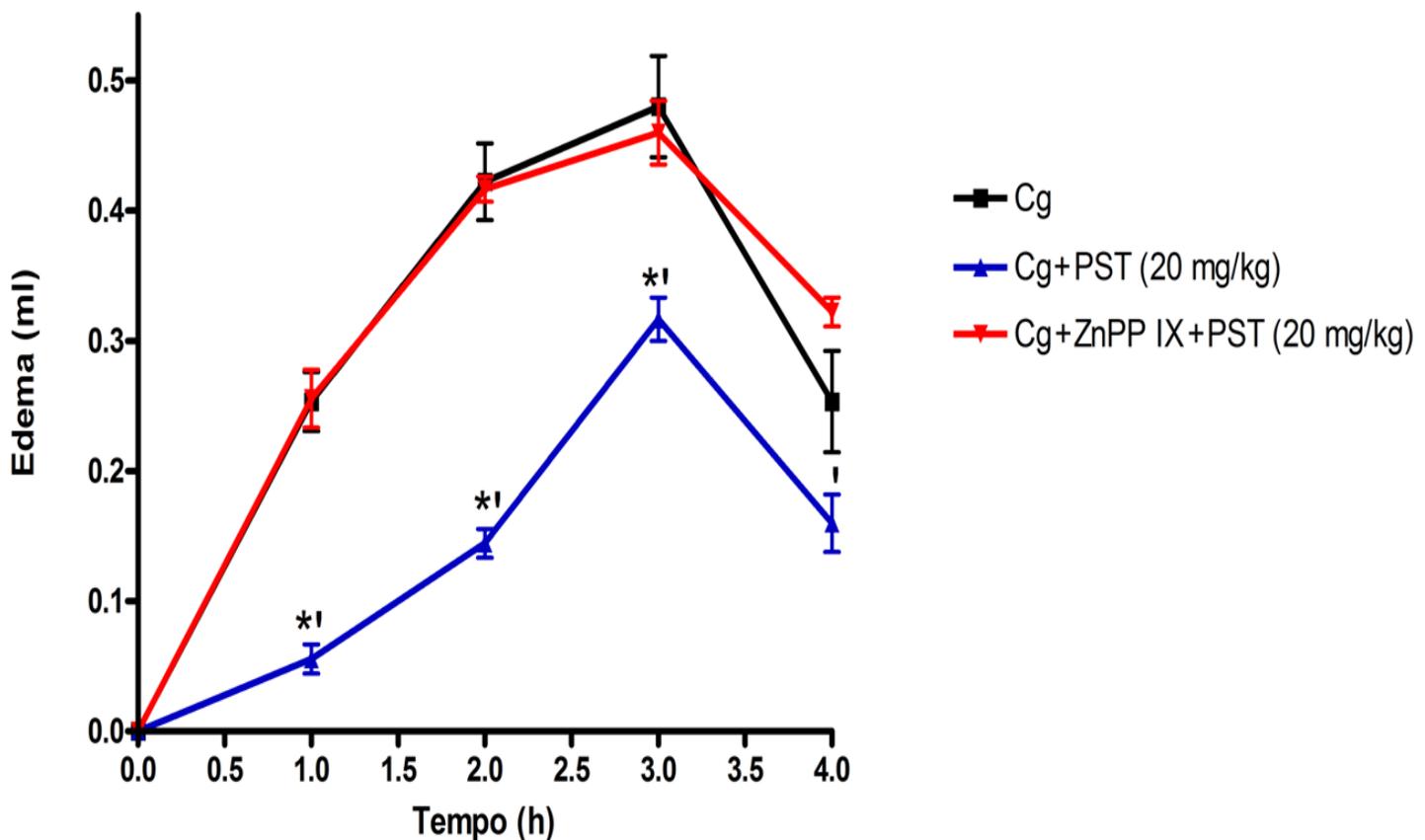
A HO-1 cataboliza a degradação do heme para o CO, Fe e BV, que é reduzida a bilirrubina. Os produtos da degradação do heme estão envolvidos em vários processos de proteção celular e estão superexpressos na inflamação e no estresse oxidativo. Dentre os vários efeitos atribuídos a atividades da HO-1 e seus derivados destacamos os anti-inflamatórios, antioxidantes, antiapoptóticos e moduladores da atividade imune (KIRKBY; ADIN, 2006; RYTER *et al.*, 2006)

O heme pertence ao grupo das metaloporfirinas, tem a estrutura de um quadrado plano tetrapirrólico, sendo composta por quatro anéis pirrólicos ligados por pontes de carbono. Esta conjugação macropirrólica dá cor, planaridade e fluorescência característica das porfirinas. Alguns metais como Fe, Mg, Cu, Zn, Sn, Cd, Co e Ag podem formar um complexo com os anéis porfirínicos (MAINES, 1997). O zinco protoporfirina IX (ZnPP IX) é uma metaloporfirinas análoga ao heme, e age como um inibidor específico, não seletivo da HO-1, inibindo a degradação do heme e a formação de seus derivados (FANG *et al.*, 2003), anulando sua ação anti-inflamatória.

Neste estudo o ensaio de edema de pata induzido por Cg foi escolhido por ser um modelo clássico que vem sendo normalmente utilizado na avaliação da atividade anti-inflamatória de novos compostos, sendo caracterizado pela indução de uma resposta inflamatória persistente após a administração de Cg na pata de animais (PASSOS *et al.*, 2007; MARIOTTO *et al.*, 2008). Além disso, os efeitos anti-inflamatório da HO-1 já foram relatados em modelos de edema de pata em ratos induzidos por carragenana.

A administração dos PST (20 mg/kg; s.c.) de *C. mexicana*, 30 minutos antes da injeção subplantar de Cg (500 µg/pata), reduziu o edema de pata de forma significativa em todas as horas (1, 2, 3 e 4 h), tendo seu efeito inibido pela administração de ZnPP IX (3mg/kg; s.c.), 1 h antes da aplicação dos PST e 1 h antes da Cg. Os PST (20 mg/kg; s.c.) demonstraram uma redução de 78% ($0,05 \pm 0,01$ mL), 65% ($0,14 \pm 0,01$ mL), 32% ($0,31 \pm 0,01$ mL) e 39% ($0,16 \pm 0,02$ mL), nas horas de 1, 2, 3 e 4 respectivamente, quando comparado ao grupo ZnPP IX + PST (FIGURA 12).

Figura 12 - Efeito da aplicação do zinco protoporfirina IX na ação dos PST no modelo de edema de pata induzido por carragenana em ratos



* $p < 0,001$, em relação ao grupo Cg

† $p < 0,001$, em relação ao grupo Cg + ZnPP IX + PST (20 mg/kg)

Fonte: Acervo do próprio autor.

Zinco protoporfirino IX (3 mg/kg; s.c.) foi administradas 30 min antes do PST e PST (20 mg/kg; s.c.) ou salina estéril (NaCl 0,15 M; s.c.) foram administradas 30 min antes da injeção subplantar de carragenana (500 µg/pata). Os volumes das patas foram medidos através de pletismômetro nos tempos 0; 1; 2; 3 e 4 h após injeção do estímulo inflamatório. Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. (n=6). * $p < 0,05$, comparando com o grupo carragenana + salina e † $p < 0,05$ comparando com o grupo carragenana + zinco protoporfirino IX + PST (ANOVA; Teste de Bonferroni).

Os efeitos da HO-1 na inflamação aguda, passa pela inibição da produção de citocinas pró inflamatórias e quimiocinas, tais como IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α , através da regulação da ativação de fatores de transcrição (NF-kB, AP-1) (WIESEL *et al.*, 2000;. LEE *et al.*, 2003; OH *et al.*, 2006; ABRAHAM, KAPPAS, 2008; GRANJEIRO *et al.*, 2011), impedindo a fosforilação da I-kB pela I- κ -quinase, resultando numa diminuição da expressão de COX-2 (MIYAMOTO *et al.*, 2003; KOBAYASHI *et al.*, 2006; HAIDER *et al.*, 2002).

Vários estudos relataram a influência da HO-1 na atividade anti-inflamatória e imunossupressora de alguns compostos, derivados de plantas ou algas, correlacionando os resultados com a ativação ou o aumento da expressão da HO-1 com a potência do efeito anti-inflamatório (ALCARAZ *et al.*, 2000; HO *et al.*, 2007; VANDERLEI, *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2012)

Neste estudo verificamos que a atividade anti-inflamatória dos PST foi inibida pelo ZnPP IX, sugerindo que exercem seus efeitos através da indução da HO-1, corroborando com os resultados encontrados por Ribeiro (2012) e Vanderlei *et al.*, (2011) que demonstraram que as frações polissacarídicas sulfatadas da alga verde *C. racemosa* e da alga vermelha *G. Birdiae* também reduziram o edema de pata induzido por Cg e foram inibidos na presença de ZnPP IX.

4.4 Efeitos sistêmicos dos PST da alga verde *C. mexicana*

A avaliação da toxicidade é realizada com o objetivo de determinar o potencial de novas substâncias e produtos causar danos à saúde humana. Testes que avaliam a toxicidade sistêmica aguda são utilizados para classificar e apropriadamente rotular substâncias de acordo com o seu potencial de letalidade ou toxicidade (VALADARES, 2006). Assim, o estudo toxicológico, independentemente dos resultados farmacológicos, torna-se imprescindível devido aos motivos farmacológicos e para aumentar as informações existentes sobre o grau de segurança de novos compostos (CUNHA *et al.*, 2009)

Um dos estudos de toxicidade aprovados pela *Organisation de coopération et de développement économiques* (OCDE) é a realização de dose única através da avaliação do *screening* hipocrático, baseado em observações comportamentais sistemáticas, que fornece uma estimativa geral da toxicidade da substância sobre o estado de consciência, disposição geral, atividade e coordenação do sistema motor, reflexos e atividades sobre o sistema nervoso central e autônomo, tais como atividade geral, irritabilidade, resposta ao toque, contorção, tônus do corpo, ataxia, tremores, convulsões, hipnose, anestesia, micção,

defecação, pilo ereção, hipotermia, respiração, cianose, hiperemia e morte (CUNHA *et al.*, 2009).

Com a finalidade de avaliar os possíveis efeitos sistêmicos dos PST da alga marinha verde *C. mexicana*, administrou-se em camundongos uma dose única de PST (20 mg/kg; i.v.) e em seguida foram colocados em observação. Após 48 h, os animais foram anestesiados e amostras de sangue coletadas para dosagens bioquímicas e depois eutanasiados, tendo os órgãos retirados e pesados. Não foi observada qualquer alteração nos aspectos comportamentais ou físicos dos camundongos (ereção de pêlos, mucosa, olhos, etc.), assim como na massa corpórea ou no peso dos órgãos (fígado, coração, rim, linfonodos, timo e baço) em ambos os sexos (Tabela 1). O baço dos animais tratados de ambos os sexos apresentaram um crescimento e peso superior aos grupos salina, sem significância estatística, possivelmente indicando um aumento na atividade imunomodulatória, como sugerido por outros estudos (ASSREUY *et al.*, 2008; ARAÚJO *et al.*, 2011; COURA *et al.*, 2011; VANDERLEI *et al.*, 2011; SOUSA *et al.*, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2011).

Lins *et al.*, (2009) trabalhando com uma fração da alga vermelha *C. feldmannii*, observaram um aumento relativo no peso do baço e uma hiperplasia dos folículos germinativos, com centros megacariocíticos no baço, corroborando com a hipótese em que os PST atuam sobre a estimulação imunológica.

Tabela 1 – Análises bioquímicas e do peso corporal e dos órgãos de camundongos submetidos a tratamento agudo com PST

Parâmetros	Tratamentos (i.v.)	
	Salina	PST (20 mg/kg)
Fêmeas		
Peso corporal médio (g) inicial	25,93 ± 0,51	27,08 ± 0,42
Peso corporal médio(g) final	26,29 ± 0,54	27,39 ± 0,43
Fígado (g/ 100g peso corporal)	0,559 ± 0,014	0,559 ± 0,008
Rim (g/ 100g peso corporal)	0,887 ± 0,025	0,879 ± 0,027
Coração (g/ 100g peso corporal)	0,657 ± 0,027	0,663 ± 0,029
Baço (g/ 100g peso corporal)	0,431 ± 0,027	0,833 ± 0,115
Timo (g/ 100g peso corporal)	0,413 ± 0,068	0,343 ± 0,032
Linfonodo (g/ 100g peso corporal)	0,299 ± 0,021	0,249 ± 0,020
Fosfatase Alcalina (UI/L)	48,3 ± 5,53	39,8 ± 4,47
TGO (UI/L)	61,7 ± 10,55	67,43 ± 7,62
TGP (UI/L)	50,32 ± 7,49	45,78 ± 4,57
Creatinina (UI/L)	0,52 ± 9,54	0,48 ± 10,3
Machos		
Peso corporal médio (g) inicial	30,78 ± 0,44	29,30 ± 0,49
Peso corporal médio(g) final	31,21 ± 0,47	29,60 ± 0,50
Fígado (g/ 100g peso corporal)	0,607 ± 0,021	0,648 ± 0,033
Rim (g/ 100g peso corporal)	1,009 ± 0,030	1,010 ± 0,031
Coração (g/ 100g peso corporal)	0,704 ± 0,019	0,637 ± 0,033
Baço (g/ 100g peso corporal)	0,394 ± 0,021	0,719 ± 0,062
Timo (g/ 100g peso corporal)	0,350 ± 0,028	0,328 ± 0,060
Linfonodo (g/ 100g peso corporal)	0,287 ± 0,035	0,206 ± 0,023
Fosfatase Alcalina (UI/L)	50,5±5,49	45,3± 5,6
TGO (UI/L)	80,5±5,5	77,48±4,45
TGP (UI/L)	42,30 ± 5,56	39,82±5,37
Creatinina (UI/L)	0,98 ± 10,0	0,68 ± 13,0

Nota: Os animais foram pesados e tratados com PST (20 mg/kg; i.v.) dose única. Após 48 h os animais foram anestesiados e amostras de sangue coletadas para dosagens bioquímicas (TGO, TGP, fosfatase alcalina e creatinina). Os animais foram eutanasiados e os órgãos pesados. Os dados foram expressos como média ± E.P.M. (n=6). Teste t-Student para valores não pareados. * $p < 0,05$ comparando com o controle salina.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo, foi demonstrado que a alga marinha verde *Caulerpa mexicana* apresentou um rendimento de PST de 1,7% por digestão proteolítica, que mostrou-se comparável ao relatado na literatura para outras espécies de algas pertencentes ao mesmo gênero e empregando a mesma metodologia de extração. Diferentemente, o teor de sulfato obtido mostrou-se superior (21,47%) também quando comparado com os de algas pertencentes ao mesmo gênero.

Na análise prévia estrutural dos PST de *C. mexicana* por espectroscopia de infravermelho, foi demonstrado que estes são constituídos de éster sulfato (S-O), O-H, COOH e de galactose-6-sulfato, sugerindo a sulfatação no C-6 da galactose e a presença de ácidos urônicos.

Os PST de *C. mexicana* apresentaram efeito antinociceptivo em camundongos, com ação periférica, diferente do observado na literatura com outras espécies de algas pertencentes ao mesmo gênero que apresentaram efeitos antinociceptivos de ação central;

Os PST de *C. mexicana* apresentaram efeito anti-inflamatório, em modelos de edema de pata induzidos por vários agentes flogísticos em ratos, com inibição da ação da histamina e com envolvimento da via heme oxigenase;

Os PST de *C. mexicana* mostraram-se toleráveis no ensaio de toxicidade aguda por dose única, não apresentando reações sistêmicas em camundongos, quando aplicado por via endovenosa.

6. CONCLUSÃO

Os polissacarídeos sulfatados totais da alga marinha verde *Caulerpa mexicana* apresentaram efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios, podendo ser considerados uma importante ferramenta biotecnológica nos estudos envolvendo a dor de cunho inflamatório, tais como os relacionados com a histamina e a participação da via heme oxigenase.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, N. G.; KAPPAS, A. Pharmacological and Clinical Aspects of Heme Oxygenase. **Pharmacol Rev** v. 60, p. 79–127, 2008.
- ABRAHAM, S. N.; ST. JOHN, A. L. Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. **Nat.** v.10, p. 440-452, 2010.
- ADCOCK, I. M. *et al.* Redox regulation of histone deacetylases and glucocorticoid-mediated inhibition of the inflammation response. **Antioxid Redox Signal**, v. 7, p. 144-152, 2005.
- ALCARAZ, M. J. *et al.* Heme oxygenase-1 induction by nitric oxide in RAW 264.7 macrophages is upregulated by a cyclo-oxygenase-2 inhibitor. **Biochim Biophys Acta**, v. 1526, p. 13-16, 2001.
- ALCARAZ, M. J. *et al.* Enhanced expression of haem oxygenase-1 by nitric oxide and antiinflammatory drugs in NIH 3T3 fibroblasts. **Br J Pharmacol** v. 130 p. 57–64, 2000.
- ALMEIDA, F. R. C.; OLIVEIRA F. S. Avaliação de drogas analgésicas de ação central. In: *Psicofarmacologia: Fundamentos Práticos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 179-188, 2006.
- ANANTHI, S. *et al.* In vitro antioxidant and in vivo anti-inflammatory potential of crude polysaccharide from *Turbinaria ornata* (Marine Brown Alga). **Food. Chem. Toxicol**, v. 48, 187-192, 2010.
- ANDRADE, L. R. *et al.* Brown algae overproduce cell wall polysaccharides as a protection mechanism against the heavy metal toxicity. **Marine Pollution Bulletin**, v.60, n.9, p.1482-1488, Sep 2010.
- ANDRADE FILHO, A.C.C. **Dor: Diagnóstico e Tratamento**. São Paulo: Ed. Roca, 320p, 2001.
- AQUINO, R. S. *et al.* Occurrence of sulfated galactans in marine angiosperms. evolutionary implications. **Glycobiology**, v. 15, n. 1, p. 11-20, 2005.
- ARAÚJO, I. W. F. *et al.* Effects of a sulfated polysaccharide isolated from the red seaweed *Solieria filiformis* on models of nociception and inflammation. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, p. 1207– 1215, 2011.
- ASSREUY, A. M. S. *et al.* Biological effects of a sulfated-polysaccharide isolated from the marine red algae *Champia feldmannii*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tóquio, v.31, n.4, p.691-695, May 2008.
- BALDWIN, A. S. The NF-kB and IκB proteins: new discoveries and insights. **Ann. Rev. Immunol.** v.14: 649-681, 1996.
- BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. **Algae – Anatomy, Biochemistry and Biotechnology**. 1ª Ed. Boca Raton: Taylor & Francis Group, LLC, 2006.

BATLOUNI, M. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs: Cardiovascular, Cerebrovascular and Renal Effects. **Arq Bras Cardiol.** v. 94, n.4, p. 522-529, 2010.

BITENCOURT, M. A. O. *et al.* Aqueous and Methanolic Extracts of *Caulerpa mexicana* Suppress Cell Migration and Ear Edema Induced by Inflammatory. **Agents. Mar. Drugs**, v. 9, p. 1332-1345, 2011.

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

BRADLEY, P. P. *et al.* Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophils content with an enzyme marker. **J. Invest. Dermatol**, v. 78, p. 206-209, 1982.

BRASIL. MS. OPAS. MCT. **Caracterização do Estado da Arte em Biotecnologia Marinha no Brasil.** Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

BRAYNER, S. *et al.* Taxonomia e distribuição do gênero *Caulerpa* Lamouroux (Bryopsidales – Chlorophyta) na costa de Pernambuco e Arquipélago de Fernando de Noronha, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, São Paulo, v.22, n.4, p.914-928, out./dez. 2008.

BRESNIHAN, B. *et al.*, Treatment of rheumatoid arthritis with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist. **Arthritis Rheum** v. 41, 196 -204, 1998.

CABLE, E. E. *et al.* Mechanism of induction of heme oxygenase by metalloporphyrins in primary chick embryo liver cells: evidence against a stress mediated response. **Mol. Cell. Biochem.** v. 169 p. 13-20, 1997.

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

CAVALCANTE, V. O. Fisiopatologia da Dor. In: **Dor e saúde mental.** 1 ed. São Paulo: Editora Atheneu, cap 2, p.23-32, 2005.

CHATTOPADHYAY, K. *et al.* Polysaccharides from *Caulerpa racemosa*: purificação and structural features. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v.68, n.3, p.407-415, Apr 2007.

COLEMAN, J. W. Nitric oxide: a regulator of mast cell activation and mast cell-mediated inflammation. **Clin. Exp. Immunol.** v. 129: 4-10, 2002.

COLLIER, H. O. J. *et al.* The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in mouse. **Br. J. Pharm.** v. 32, p 295-310, 1968.

COLLINS, T.; CYBULSKY, M. I. NF-kB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? **J. Clin. Invest.** v. 107: 255-264, 2001.

COSTA, L. S. *et al.* Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. **Biomedicine e Pharmacotherapy**, v. 64, p. 21-28, 2010.

- COSTA, M. S. S. P. *et al.* Evaluating the possible anticoagulant and antioxidant effects of sulfated polysaccharides from the tropical green alga *Caulerpa cupressoides* var. *flabellate*. **J. Appl. Phycol.** 2011.
- COURA, C. O. *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory activity of sulfated polysaccharides from the red seaweed *Gracilaria cornea*. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, 2011.
- CUNHA, L. C. *et al.* Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax.. **Rev. bras. farmacogn.** v.19, n.2a, p. 403-411. 2009.
- DALGLEISH, A. G.; O'BYRNE, K. J., Chronic immune activation and inflammation in the pathogenesis of AIDS and cancer. **Adv. Câncer Res.** v. 84: 231-276, 2002.
- DI ROSA, M. *et al.* Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **J Path**, v. 104, p. 15-29, 1971.
- DIETRICH, C. P.; DIETRICH, S. M. Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. **Analytical Biochemistry**, [S.l.], v. 70, n. 2, p. 645-647, 1976.
- DODGSON, K. S.; PRICE, R.G. Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymatic and non-enzymic hydrolysis of carbohydrate and other sulphate esters. **Biochemistry Journal**, v. 78, p. 312-319, 1961.
- DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **British Journal of Anaesthesia**, v. 75, p.125-131, 1995.
- DUBOIS, M. *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical. Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.
- EDDY, N. B.; LEIMBACH, D. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl and dithienylbutylamines. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 107, 385-393, 1953.
- EL GAMAL, A. A. Biological importance of marine algae. **Saudi Pharmaceutical Journal**. v. 18, p. 1-25, 2010.
- EL-SHENAWY, S. M. *et al.* Studies on the anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of melatonin in the rat. **Pharmacol Res.** v.463, p. 235-43, 2002.
- ELOY, Y. R. G. Caracterização físico-química e estrutural de polissacarídeos obtidos de folhas da planta *aloe barbadensis* e avaliação de suas atividades antiviral e anti-hemorragica. 2012. [Tese] - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.
- ENGLAND. S. *et al.* Prostaglandin E2 modulates the tetrodotoxin-resistant sodium current in neonatal rat dorsal root ganglion neurones via the cyclic AMP±protein kinase A cascade. **J Physiol** v. 495, p. 429±40, 1996.

ESCH, T.; STEFANO, G. B. Proinflammation: A common denominator or initiator of different pathophysiological disease processes. **Med. Sci. Monit.** v. 8(5): HY1-9, 2002.

ESTEVEZ, J. M. *et al.* Chemical and *in situ* characterization of macromolecular components of the cell walls from the green seaweed *Codium fragile*. **Glycobiology**, Oxford, v.19, n.3, p.212-228, 2009.

FANG, J. *et al.* In vivo antitumor activity of pegylated zinc protoporphyrin: targeted inhibition of heme oxygenase in solid tumor. **Cancer Res** v. 63, p. 3567–3574, 2003

FARIAS, E. H. C. *et al.* A preponderantly 4-sulfated, 3-linked galactan from the green alga *Codium isthmocladum*. **Glycobiology**, Oxford, v.18, n.3, p.250-259, 2008.

FARIAS, W. R. L. *et al.* Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans. Isolation of a unique sulfated galactan from the red alga *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 38, p. 29299-29307, 2000.

FERREIRA, S.H. *et al.* Induction, blockade and restoration of a persistent hypersensitive state. **Pain** **42(3)**: 365, 1990.

FIEDLER, T. J. *et al.* X-ray crystal structure and characterization of halide-binding sites of human myeloperoxidase at 1.8°A resolution. **J.Biol. Chem.** v.275,p.11964-71, 2000.

FREITAS, A. *et al.* Heme oxygenase/carbon monoxide biliverdin pathway down regulates neutrophil rolling, adhesion and migration in acute inflammation. **British Journal of Pharmacology**. v.149, p.345–354, 2006.

FRIEDLANDER, M.; ZELEKOVICH, N. Growth rates, phycocolloid yield and quality of the red seaweeds, *Gracilaria* sp, *Pterocladia capillacea*, *Hypnea musciformis*, and *Hypnea cornuta*, in field studies in Israel. **Aquaculture**, Amsterdam, v.40, n.1, p.57-66, 1984.

FOLMER, F. *et al.* The inhibition of TNF- α -induced NF- κ B activation by marine natural products. **Biochemical Pharmacology**. v.78, p.592–606, 2009.

GARCIA-LEME, J. *et al.* Pharmacological analysis of the acute inflammatory process induced in the rat's paw by local injection of carrageenin and by heating. **Br J Pharmacol.** v. 48, p. 88-96, 1973

GENÉ, E. *et al.* Recommendations for the use of anti-inflammatory drugs and indications for gastrointestinal protection in emergency departments. **Emergencias**, v.21, p.295-300, 2009.

GERSHON, M. D. Review article: serotonin receptors and transporters – roles in normal and abnormal gastrointestinal motility. **Aliment Pharmacol Ther.** v. 20, p.3-14, 2004.

GHOSH, P. *et al.* In vitro anti-herpetic activity of sulfated polysaccharide fractions from *Caulerpa racemosa*. **Phytochemistry**, v. 65, p. 3151-3157, 2004.

GUPTA, M. *et al.* Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects of methanol extract from *Bauhinia racemosa* stem bark in animal models, **J Ethnopharmacol.** v. 98, n. 03, p. 267-273, 2005.

GRANJEIRO, N. M. G. *et al.* Heme oxygenase/carbon monoxide-biliverdin pathway may be involved in the antinociceptive activity of etoricoxib, a selective COX-2 inhibitor. **Pharmacological reports.** v. 63, p. 112-119, 2011.

HAIDER, A. *et al.* Regulation of cyclooxygenase by the heme-heme oxygenase system in microvessel endothelial cells. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 300, p. 188-194, 2002.

HAJARE, S. W. *et al.* Anti-inflammatory activity of *Dalbergia sissoo* leaves. **Fitoterapia,** v.72, p.131-139, 2001.

HALLETT, J. M. *et al.* Novel pharmacological strategies for driving inflammatory cell apoptosis and enhancing the resolution of inflammation. **Trends Pharmacol Sci.** v.29, n.5, p. 25-257, 2008.

HAYAKAWA, Y. *et al.* Inhibition of thrombin by sulfated polysaccharides isolated from green algae. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology,** v. 1543, p. 86-94, 2000.

HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. NF-kB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. **Genes Dev.** v.26, p.203-234, 2012.

HO, F. M. *et al.* The anti inflammatory actions of LCY-2-CHO, a carbazole analogue, in vascular smooth muscle cells. **Biochem Pharmacol** v. 74, p. 298–308, 2007.

HOLANDA, M.L. **Iota-carragenana da alga marinha vermelha *Solieria filiformis* versus iota-carragenana comercial: propriedades estruturais e reológicas.** 121f. 2007. [Tese] - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

HUANG, J. F.; THURMOND, R. L. The new biology of histamine receptors. **Curr. Allergy Asthma Rep.,** v. 8, p. 21-27, 2008.

HUNSKAAR, S. *et al.* Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **Journal of Neurosciences Methods,** v. 14, n. 1, p. 69-76, 1985.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain.** v.30, p.103-114, 1987.

IWALEWA, E. O. *et al.* Inflammation: the foundation of diseases and disorders. A review of phytomedicines of South African origin used to treat pain and inflammatory conditions. **African Journal of Biotechnology.** vol. 6 (25), pp. 2868-2885, 2007.

JANTSCHKO, W. *et al.* Exploitation of the unusual thermodynamic properties of human myeloperoxidase in inhibitor design. **Biochem Pharmacol** v.69, p.1149–1157, 2005.

JAULENEAU, V. *et al.* Ulvan, a Sulfated Polysaccharide from Green Algae, Activates Plant Immunity through the Jasmonic Acid Signaling Pathway. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. 2010.

JI, H. *et al.* Separation of the Polysaccharides in *Caulerpa racemosa* and their chemical composition and antitumor activity. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 110, p. 1435–1440, 2008.

JIAO, G. *et al.* Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. **Marine Drugs**, v. 9, pp. 196-223, 2011.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nat.** v. 413, p. 203-210, 2001.

KARASUYAMA, H. *et al.* Nonredundant roles of basophils in immunity. **Annu. Rev. Immunol.** v.29, p.45-69, 2011.

KATSIARI, C. G. *et al.* The pathophysiologic role of monocytes and macrophages in systemic lupus erythematosus: a reappraisal. **Semin Arthritis Rheum.** v. 39, p.491-503, 2010.

KELECOM, A. Secondary metabolites from marine microorganisms. **Acad. Bras. Cienc.** v.74, p.151–170. 2002.

KIDD, B. L.; URBAN, L.A. Mechanisms of inflammatory pain. **Br J Anaesth** v. 87, p. 3-11, 2001.

KIRKBY, K. A.; ADIN, C. A. Products of heme oxygenase and their potential therapeutic applications. **Am J Physiol Renal Physiol** v. 290, p. 563–571, 2006.

KJELLÉN, M.; LINDAHL, U. Proteoglycans: structures and interactions. **Annual Review of Biochemistry**, Palo alto, v.60, p.443-475, 1991.

KOBAYASHI, H. *et al.* Regulatory role of heme oxygenase 1 in inflammation of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum** v. 54, p. 1132–1142, 2006.

KOSTER, R. *et al.* Acetic acid for analgesic screening. **Fed Proc.**, v. 18, p. 412-417, 1959.

KRAYCHETE *et al.*, Citocinas Pró-inflamatórias e Dor. **Rev Bras Reumatol**, v. 46, n.3, p. 199-206, 2006.

KUMAR, V.; SHARMA, A. Neutrophils: Cinderella of innate immune system. **International Immunopharmacology**. 2010.

KUMMER, C. L.; COELHO, T. C. R. B. Anti-inflamatórios não esteróides inibidores da ciclooxigenase II (COX II): aspectos atuais. **Rev Bras Anestesiologia**, v. 5, n. 4, 2002.

- KURAMASU, A. *et al.* Mast cell /basophil-specific transcriptional regulation of human L-histidine decarboxylase gene by CpG methylation in the promoter region. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 31607-31614, 1998.
- LAHAYE, M.; ROBIC, A. Structure and functional properties of ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. **Biomacromol.** v.8, p.1765-1774, 2007.
- LAI, J. *et al.* Inhibition of neuropathic pain by decreased expression of the tetrodotoxin - resistant sodium channel. **Pain** v. 95, p. 143-52, 2002.
- LANSANG, M.C; HUSTAK, L. K. Glucocorticoid-induced diabetes and adrenal suppression: How to detect and manage them. **Cleve Clin J Med.** v.78, n.11, p.748-56, 2011.
- LASKIN, D. L. *et al.* Macrophages and tissue injury: agents of defense or destruction? **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** v. 51, p.267-288, 2011.
- LE BARS, D. *et al.* Animal Models of Nociception. **Pharmacological Reviews.** v.53, n.4, p.597-652, 2001.
- LEE, R.E. **Phycology.** 3. ed. New York: Cambridge University Press, New York, NY, USA, 614p, 1999.
- LEE, J. A. *et al.*, Anti-inflammatory Effects of *Amomum compactum* on RAW 264.7 Cells via Induction of Heme Oxygenase-1 **Arch Pharm Res** v. 35, n. 4, p. 739-746, 2012.
- LEE, T. S. *et al.* Induction of Heme Oxygenase-1 Expression in Murine Macrophages is Essential for the Anti-inflammatory Effect of Low Dose 15-Deoxy- Δ 12,14- prostaglandin J2. **J Biol Chem** v. 278, p. 19325-19330, 2003.
- LEVER, R. *et al.* Role of glycosaminoglycans in inflammation. **Inflammopharmacology**, v. 9, n. 1,2, p. 165-169, 2001.
- LEY, K. *et al.* Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nat. Rev. Immunol.** v.7, p.678-89, 2007.
- LI, H. *et al.* Structural characterization of an anticoagulant-active sulfated polysaccharide isolated from green alga *Monostroma latissimum* **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v.85, p.394-400, 2011.
- LINCOLN, R. A. *et al.* Bioactive compounds from algae. **Life Chem. Rep.** v.8, p.97-183. 1991.
- LINS, K. O. A. L. *et al.* Antitumor properties of a sulfated polysaccharide from the red seaweed *Champia feldmannii* (Dias-Pifferer). **Journal of Applied Toxicology**, Chichester, v.29, n.1, p.20-26, Jan 2009.
- LO, T. N. *et al.* Dextran and carrageenin evoke different inflammatory response in rat with respect to composition of infiltrates and effect of indomethacin. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 221, p. 261-7, 1982.

- LOPES, L. S. *et al.* Antinociceptive effect of topiramate in models of acute pain and diabetic neuropathy in rodents. **Life Sci.** v. 84, n. 03, p. 105-110, 2009.
- LUMPKIN, E. A.; CATERINA, M. J. Mechanisms of sensory transduction in the skin. **Nat.** v.445, p.858-865, 2007.
- MAINES, M. D. Heme oxygenase: Function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. **FASEB J** v. 2, p. 2557–2568, 1988.
- MAINES, M. D. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. **Rev Pharmacol Toxicol** v. 37, p. 517–554, 1997.
- MAITY, T. K. *et al.* Studies on antiinflammatory effect of *Cassia tora* leaf extract (Fam. Leguminales). **Phytotherapy Research**, v. 12, p. 221-223, 1998.
- MALING, H. M. *et al.* Inflammation induced by histamine, serotonin, bradykinin and compound 48/80 in the rat: antagonists and mechanisms of action. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 191 p. 300–310, 1974.
- MANI, R. N. *et al.* Therapeutic efficacy of multiple intravenous infusions of anti-tumor necrosis factor a monoclonal antibody combined with methotrexate in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum** v. 41 p. 552-563, 1998.
- MAO, W. *et al.* Chemical characteristic and anticoagulant activity of the sulfated polysaccharide isolated from *Monostroma latissimum* (Chlorophyta). **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v.44, n.1, p.70-74, 2009.
- MAO, W. *et al.* Sulfated polysaccharides from marine algae *Ulva conglobata* and their anticoagulant activity. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v.18, n.1, p.9-14, 2006.
- MAO, W. J. *et al.* Heparinoid-active two sulfated polysaccharides isolated from marine green algae *Monostroma nitidum*. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v.74, n.4, p.834-839, 2008.
- MARINHO-SORIANO, E. *et al.* **Manual de identificação das macroalgas marinhas do litoral do Rio Grande do Norte.** 1ª Ed., Natal: EDUFRRN, 120p, 2008.
- MARIOTTO, S. *et al.* Protective effect of Arbutus unedo aqueous extract in carrageenan induced lung inflammation in mice. **Pharmacol. Res.**, v. 57, p. 110-124, 2008.
- MARKS, G. S. Heme oxygenase: the physiological role of one of its metabolites, carbon monoxide and interactions with zinc protoporphyrin, cobalt protoporphyrin and other metalloporphyrins. **Cell. Mol. Biol.** v. 40, p. 863-870, 1994.
- MASUKO, T. *et al.* Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v.339, n.1, p.69-72, 2005.
- MATHEWS, M. B. **Polyanionic proteoglycans.** In: Connective Tissue: Macromolecular Structure and Evolution Kleinzeller, Springer, G.F.; Witman, H.G. (eds). Berlin: Springer-Verlag, p.93-125, 1975.

- MATSUBARA, K. *et al.* Anticoagulant properties of a sulfated galactan preparation from a marine green alga, *Codium cylindricum*. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v.28, n.5, p.395-399, Jun 2001.
- MATTA, C. B. B. *et al.* Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activity from Algae of the Genus *Caulerpa*. **Agents. Mar. Drugs**, v. 9, p. 307-318, 2011.
- MAYER, A. M. S.; LEHMANN, V. K. B. Marine pharmacology in 1998: Marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, antiinflammatory, anthelmintic, antiplatelet, antiprotozoal, and antiviral activities; with actions on the cardiovascular, endocrine, immune, and nervous systems; and other miscellaneous mechanisms of action. **Pharmacologist**. v.42, p.62–69. 2000.
- MAYER, A. M. S. *et al.* Marine pharmacology in 2007–8: Marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous system, and other miscellaneous mechanisms of action. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, 153, p.191–222. 2011.
- MCCOUBREY, W. *et al.* Isolation and characterization of a cDNA from the cat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. **Eur. J. Biochem.** v. 247, p. 725-732, 1997.
- MCCURDY, C. R.; SCULLY, S. S. Analgesic substances derived from natural products (natureceuticals). **Life Sci** v.78, p.476-484, 2005.
- MCDONOUGH, A. K. *et al.* The epidemiology of glucocorticoid-associated adverse events. **Curr Opin Rheumatol.** v.20, p.131–137, 2008.
- MCDOUGALL, J. J. Peripheral analgesia: hitting pain where it hurts. **Biochim Biophys Acta.** v.1812, p. 459-467, 2011.
- MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nat.** v.454, p.428-435, 2008.
- MEDZHITOV, R.; HORNG, T. Transcriptional control of the inflammatory response. v. 09, 2009.
- MELO, K. R. T. *et al.* Caracterização e atividade anticoagulante de PS extraídos da alga marrom *dictyopteris justii*. **HOLOS**, Ano 28, v. 1, p. 29-40, 2012.
- MELO, M. R. S. *et al.* Isolation and characterization of soluble sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria cornea*. **Carbohyd. Polym.**, v.49, n.4, p.491-498, 2002.
- MENDES, A. Avaliação em larga escala do diclofenaco colestiramina em lesões traumáticas agudas. **Revista Brasileira de Medicina**, v.58, n.4, p.249-256, 2001.
- MIYAMOTO, Y. *et al.* Taurine is involved in oxidation of IkappaB alpha at Met45: Nhalogenated taurine and anti-inflammatory action. **Adv Exp Med Biol** v. 526, p. 373–380, 2003.

- MULLER, W. A., Mechanisms of leukocyte transendothelial migration. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.** v.6, p.323–44, 2011.
- MURPHY P. G.; *et al.*, Endogenous interleukin-6 contributes to hypersensitivity to cutaneous stimuli and changes in neuropeptides associated with chronic nerve constriction in mice. **Eur J Neurosci** v. 11, p. 2243±53, 1999.
- MUZ, B. *et al.* Heme oxygenase-1 participates in the anti-inflammatory activity of taurine chloramine **Amino Acids** v. 35, p. 397–402, 2008.
- NAITO, Y. *et al.*, Heme oxygenase_1: a novel therapeutic target for gastrointestinal diseases. **J. Clin. Biochem. Nutr.** v.48, n.2 , p. 126–133, 2011.
- NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehinger – principles of biochemistry.** 5. Ed. New York: W.H. Freeman and Company, 1100p, 2008.
- NIMWEGEN, V. "Scaling laws in the functional content of genomes". **Trends Genet.** v.19, n.9, p.479–84, 2003.
- O'BYRNE K. J.; DALGLEISH A. G., Chronic immune activation and inflammation as the cause of malignancy. **Br. J. Cancer** 85: 473-483, 2001.
- O'BYRNE K. J. *et al.*, The relationship between angiogenesis and the immune response in carcinogenesis and the progression of malignant disease. **Eur. J. Cancer** 36: 151-169. 2000.
- OH, G. S. *et al.* Hydrogen sulfide inhibits nitric oxide production and nuclear factor-kappaB via heme oxygenase-1 expression in RAW264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide. **Free Radic. Biol. Med.** v. 41, p. 106-119, 2006.
- OLIVEIRA, E. C. *et al.* **Marine plants of Tanzania.** A field guide to the seaweeds and seagrasses. Stockolm, Stockolm University, 2005.
- OPREE, A.; KRESS, M. Involvement of the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-a, IL-1b and IL-6 but not IL-8 in the development of heat hyperalgesia: effects on heat-evoked calcitonin gene-related peptide release from rat skin. **J Neurosci** v. 20 p. 6289±93, 2000.
- OTTERBEIN, L. E. *et al.* Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogenactivated protein kinase pathway. **Nat Med** v. 6, p. 422–428, 2000.
- PAHL, H. L. Activators and target genes of Rel/NF-kB transcription factors. **Oncogene** v.18: 6853-6866, 1999.
- PASSOS, G. F. *et al.* Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **J. Ethnopharmacol.** v. 110, p. 323-333, 2007.
- PATEL, S. Therapeutic importance of sulfated polysaccharides from seaweeds: updating the recent findings. **Biotech.** 2012.

- PERCIVAL, E.; McDOWELL, R. H. Chemistry and enzymology of marine algal polisaccharides. **Academic Press, New York**, 1967.
- PI, S. H. *et al.* Heme oxygenase-1 mediates nicotine- and lipopolysaccharide-induced expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in human periodontal ligament cells. **J Periodont Res.** v. 45, p. 177–183, 2010.
- PIAZZI, L. *et al.* Comparative study of the growth of the two co-occurring introduced green algae *Caulerpa taxifolia* and *Caulerpa racemosa* along the Tuscan coast (Italy, western Mediterranean). **Cryptogamie Algologie**, Paris, v.22, n.4, p.459-466, Oct/Dec 2001.
- PIAZZI, L.; CECCHERELLI, G. Persistence of biological invasion effects: Recovery of macroalgal assemblages after removal of *Caulerpa racemosa* var. *cylindracea*. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, London, v.68, n.3-4, p.455-461, Jul 2006.
- PINTO, H. S. A. *et al.* Antinoceptive effect of triterpenoid alpha,beta-amyrin in rats on orofacial pain induced by formalin and capsaicin. **Phytomedicine.** v. 15, n. 08, p. 630- 634. 2008.
- PODOLSKY, D. K. Inflammatory bowel disease. **N. Engl. J. Med.** v. 325: 928-9237, 1991.
- POMIN, V. H. Structural and functional insights into sulfated galactans: a systematic review. **Glycoconj J** v.27, p.1–12, 2010.
- POMIN, V. H.; MOURÃO, P. A. S. Structure, biology, evolution, and medical importance of sulfated fucans and galactans. **Glycobiology.** v. 18, n. 12, p. 1016–1027, 2008.
- POSADAS, I. *et al.* Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **British Journal of Pharmacology.** v. 142, p. 331-38, 2004.
- PRAJAPATI, B. *et al.* Role of NFkB in Various Immunological & Inflammatory Disorders. **International Journal of Toxicological and Pharmacological Research.** v.2, n.1, p.35-39, 2010.
- QUINDERÉ, A. L. G. Propriedades na nocicepção e na inflamação de uma fração polissacarídica sulfatada da alga marinha *Acanthophora muscoides*. [**Dissertação**]. Fortaleza (CE): Universidade Federal do Ceará, 2011.
- RACKE, K.; SCHWORER, H. Regulation of serotonin release from the intestinal mucosa. **Pharmacol Res**, v. 23, p. 13-25, 2000.
- RAVEN, P. H. *et al.* **Biologia vegetal.** 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.
- RENN, D. W. Biotechnology and the red seaweed polysaccharide industry: status, needs and prospects. **Tibtech.** v.15, p.9–14. 1997.
- RIBEIRO, N. A. Efeitos de uma fração polissacarídica sulfatada da alga marinha verde *Caulerpa racemosa* (forsskål) j. agardh na nocicepção e inflamação. [**Dissertação**]. Fortaleza (CE): Universidade Federal do Ceará, 2012.

RIEDEL, W.; NEECK, G. Nociception, pain, and antinociception: current concepts. **Z Rheumatol** v. 60, p.404–415, 2001.

RYTER, S. W. *et al.* Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. **Physiol. Rev.** v. 86, p. 583-650, 2006.

RYTER, S. W.; TYRELL, R. M. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. **Free Radic. Biol. Med.** v. 28, p. 289-309, 2000.

ROCHA, N. F. M. Estudo do efeito farmacológico do (-)- α -bisabolol em modelos animais de nociceção, inflamação e úlcera gástrica em camundongos. [**Dissertação**]. Fortaleza (CE): Universidade Federal do Ceará, 2009.

RODGERS, P. A. *et al.* Duration of action and tissue distribution of zinc protoporphyrin in neonatal rats. **Pediatr. Res.** v. 39, p. 1041-1049, 1996.

RODRIGUES, J. A. G. *et al.* Análise de metodologias na precipitação de PS extraídos da alga marinha verde *Caulerpa racemosa* (Forsskal) J. Agardh. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, São Luís, v.4, n.1, p.32-43, jan. 2009.

RODRIGUES, J. A. G. *et al.* PS isolados das clorofíceas *Caulerpa racemosa* e *Caulerpa cupressoides* – extração, fracionamento e atividade anticoagulante. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 32, n. 2, p. 113-120, 2010.

RODRIGUES, J. A. G. *et al.* An antithrombin-dependent sulfated polysaccharide isolated from the green alga *Caulerpa cupressoides* has *in vivo* anti- and prothrombotic effects. **Ciência Rural**, v.41, n.4, 2011.

RODRIGUES, J. A. G. *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory activities of a sulfated polysaccharide isolated from the marine green seaweed *Caulerpa cupressoides*. **Pharmacological Reports**, v. 64, p. 282-292, 2012.

RODRIGUEZ-VITA, J.; LAWRENCE, T. The resolution of inflammation and cancer. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 21, p.61–65, 2010.

ROSS R. Atherosclerosis: current understanding of mechanisms and future strategies in therapy. **Transplant Proc.** v. 25: 2041–2043, 1993.

ROWLEY, D. A.; BENDITT, E. P. 5-Hydroxytryptamine and histamine as mediators of the vascular injury produced by agents which damage mast cells in rats. **Exp. Med.** v. 103, p. 399–412, 1956.

RUITTON, S. *et al.* First assessment of the *Caulerpa racemosa* (Caulerpales, Chlorophyta) invasion along the French Mediterranean coast. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v.50, n.10, p.1061-1068, 2005.

SCHNEIDER, E. *et al.* Trends in histamine research: new functions during immune responses and hematopoiesis. **Trends Immunol**, v. 5, p. 255-263, 2002.

- SCHRAMM, R; THORLACIUS, H. Neutrophil recruitment in mast cell dependent inflammation inhibitory mechanisms of glucocorticoids. **Inflammation research**, v.53 (12), p. 644-652, 2004.
- SEGAL, A. W., How neutrophils kill microbes. **Annu. Rev. Immunol.** v. 23, p.19-223, 2005.
- SERBINA, N. V. *et al.* Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. **Annu. Rev. Immunol.** v.26, p.421-52, 2008.
- SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Pract Res Clin Anaesthesiol**, v. 18, p. 385-405, 2004.
- SHIBAHARA, S. Regulation of heme oxygenase gene expression. **Semin Hematol** v. 25, p. 370–376, 1988.
- SHIBATA, M. *et al.* Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain.** v. 38, p.347-352, 1989.
- SHINOHARA, M. *et al.* Functional Metabolomics Reveals Novel Active Products in the DHA Metabolome.** *Front Immunol.* n. 3, v. 81, 2012.
- SIDDHANTA, A. K. *et al.* Sulphated polysaccharides of *Codium dwarkense* Boergs. From the west coast of India: chemical composition and blood anticoagulant activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v.26, n.2-3, p.151-154, Nov 1999.
- SILVA, F.R.F. *et al.* Anticoagulant activity, paw edema and pleurisy induced carrageenan: action of major types of commercial carrageenans. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v.79, n.1, p.29-33, 2010.
- SILVA, T. M. A. *et al.* Partial characterization and anticoagulant activity of a heterofucan from the brown seaweed *Padina gymnospora*. **Braz. J. Med. Biol.** V. 38, p.523–533, 2005.
- SMIT, A. J. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review. **Journal of Applied Phycology.** v.16, p.245–262, 2004.
- SOEHNLEIN, O., LINDBOM, L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. **Nat Rev Immunol.** v.20, p.427-439 2010.
- SOMMER, C. Serotonin in pain and analgesia: actions in the periphery. **Mol Neurobiol**, v. 30, p. 117-125, 2004.
- SOUSA, A. A. S. *et al.* A report of a galactan from marine alga *Gelidium crinale* with in vivo anti-inflammatory and antinociceptive effects. **Fundamental & Clinical Pharmacology.** 2011.
- TAK, P. P.; FIRESTEIN, G. S. NF- κ B: a key role in inflammatory diseases. **J. Clin. Invest.** v. 107: 7–11, 2001.

- TEIXEIRA, C. F. P. *et al.* Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A2. **Toxicol.**, v.42, p.947–62, 2003.
- TILSTRA, J. S. *et al.* NF- κ B in Aging and Disease. **Aging Dis.** v.2, n.6, p. 449-465, 2011.
- TING, E. *et al.* Indirect mechanism of histamine-induced nociception in temporomandibular joint of rats. **Life Sci**, v. 81 p. 765-771, 2007.
- TJOLSEN, A. *et al.* The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v.51, p.5-17, 1992.
- VALADARES, M. C. Acute toxicity evaluation: strategies post “DL50 test era”. **Revista Eletrônica de Farmácia**. v. 3, n.2, p. 93-98, 2006.
- VANDERLEI, E. S. O. *et al.* The involvement of the HO-1 pathway in the anti-inflammatory action of a sulfated polysaccharide isolated from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. **Inflamm. Res**, v. 60, p. 1121–1130, 2011.
- VASCONCELOS, M. A. *et al.* Temporal variation in vegetative development of *caulerpa scapelliformis* (chlorophyta) from baleia beach, Ilha Grande bay (Rio de Janeiro, Brazil). **Brazilian Journal of Oceanography**. v. 59, p. 145-152, 2011.
- VERLAQUE, M. Inventaire des plantes introduites en Méditerranée: origines répercussions sur l'environnement et les activités humaines. **Oceanologica Acta**, Paris, v.17, n.1, p.1-23, 1994.
- VERRI J. R. *et al.* Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development?. **Pharmacol. Ther.**, , v.112, p. 116–138, 2006.
- VICENTE, A. M. *et al.* Participation of Heme Oxygenase-1 in a Model of Acute Inflammation. **Exp Biol Med** v. 228, p. 514–516, 2003.
- VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. C. Algas: da economia dos ambientes aquáticos à bioremediação e á química analítica. **Quim Nov**, v.27, n.1, p139-145, 2004.
- WANG, L.; DUDEK, S. M. Regulation of vascular permeability by sphingosine 1-phosphate. **Microvasc Res**. v.77, p. 39-45, 2009.
- WATANABE, M. *et al.* Acute renal failure: The heme oxigenase system. **J. Bras. Nefrol.** v. 4, p. 179-183, 2005.
- WEIZAI, S. *et al.* Immunomodulatory effects of *Caulerpa racemosa* var *peltata* polysaccharide and its selenizing product on T lymphocytes and NK cells in mice. **Sci China Ser C-Life Sci**. v. 51, n. 9, p. 795-801, 2008.
- WENDE, C.; MARGOLIN, S. Analgesic test based upon experimentally induced acute abdominal pain in rats. *Fed Proc*. v. 15, p 494-499, 1956.
- WENDLAND. *et al.* O Papel da Mieloperoxidase na Doença Cardiovascular. **Arq Bras Cardiol**. v. 91, p. 12-19, 2007.

- WIESEL, P. *et al.* Thioredoxin facilitates the induction of heme oxygenase-1 in response to inflammatory mediators. **J. Biol. Chem.** v. 275, p. 24840-24846, 2000.
- WIJESEKARA, I. *et al.* Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v.84, p.14-21, 2011.
- WILLIS, D. *et al.* Heme oxygenase: A novel target for the modulation of the inflammatory response. **Natl. Med.** v. 2, p. 87-90, 1996.
- WINTER, C. A. *et al.* Carrageenin induced edema in hind paw of rats as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 111, p. 544-547, 1962.
- WOOLF, C. J. *et al.* Cytokines, nerve growth factor and inflammatory hyperalgesia: the contribution of tumor necrosis factor α . **Br J Pharmacol** v. 121 p. 417±24, 1997.
- WOOLF, C. J.; COSTIGAN, M. Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 96, p. 7723-7730, 1999.
- WU, M. L. *et al.* Heme oxygenase-1 in inflammation and cardiovascular disease. **Am J Cardiovasc Dis.** v.1, n.2, p.150-158, 2011.
- Xu, X. *et al.* Nociceptive responses in interleukin-6-deficient mice to peripheral inflammation and peripheral nerve section. **Cytokine** v. 9, p. 1028±33, 1997.
- YANGUO, H. *et al.* Topical ketanserin attenuates hyperalgesia and inflammation in arthritis in rats. **Pain**, v. 124, p. 27–33, 2006.
- ZAMPELI, E.; TILIGADA, E. The role of histamine H4 receptor in immune and inflammatory disorders. **Br. J. Pharmacol.**, v. 157, p. 24-33, 2009.
- ZHANG, B. *et al.* Analgesic and anti-inflammatory activities of a fraction rich in gaultherin isolated from *gaultheria yunnanensis* **Biol Pharm Bull.** v. 30, n. 03, p. 465-9, 2007.
- ZHANG, H. J. *et al.* Chemical characteristics and anticoagulant activities of a sulfated polysaccharide and its fragments from *Monostroma latissimum*. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v.71, n.3, p.428-434, Feb 2008.
- ZHANG, M. *et al.* The histamine H(4) receptor: a novel modulator of inflammatory and immune disorders. **Pharmacol. Ther.**, v. 113, p. 594-606, 2007.
- ZWERINA, J. *et al.* Heme oxygenase 1 (HO-1) regulates osteoclastogenesis and bone resorption. **Faseb J** v. 19, p. 2011–2013, 2005.

ANEXO I



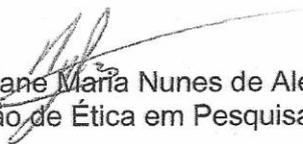
Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

DECLARAÇÃO

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

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

Fortaleza, 25 de março de 2011


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