



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

**ESTUDO DAS ATIVIDADES ANTITUMORAL E
IMUNOESTIMULANTE DO POLISSACARÍDEO SULFATADO
ISOLADO DE *Champia feldmannii* DIAZ-PIFFERER (1977).**

KÉZIA OLIVEIRA ABRANTES DE LACERDA LINS

FORTALEZA – CE

2008

KÉZIA OLIVEIRA ABRANTES DE LACERDA LINS

**ESTUDO DAS ATIVIDADES ANTITUMORAL E IMUNOESTIMULANTE DO
POLISSACARÍDEO SULFATADO ISOLADO DE *Champia feldmannii* DIAZ-
PIFFERER (1977).**

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

Orientadora:

Prof^a Dr^a Leticia Veras Costa Lotufo

Fortaleza - CE

2008

KÉZIA OLIVEIRA ABRANTES DE LACERDA LINS

**ESTUDO DAS ATIVIDADES ANTITUMORAL E IMUNOESTIMULANTE DO
POLISSACARÍDEO SULFATADO ISOLADO DE *Champia feldmannii* DIAZ-
PIFFERER (1977).**

Aprovada em 15 de julho de 2008

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

A citação de qualquer trecho deste trabalho é permitida, desde que seja feita em conformidade com as normas da ética científica.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Letícia Veras Costa-Lotufo

Universidade Federal do Ceará

- Orientadora -

Profa. Dra. Ana Maria Sampaio Assreuy

Universidade Estadual do Ceará

Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins

Universidade Federal do Ceará

AGRADECIMENTOS

À Profª Drª Letícia Veras Costa-Lotufo, pela orientação deste trabalho, por toda a ajuda, e por ser um exemplo de orientadora;

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

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

À Profª Drª Raquel Carvalho Montenegro, pelo apoio;

Ao Prof. Wladimir Ronald Lobo Farias, pelo fornecimento do material e toda a ajuda;

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

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

À Profª Drª Helena Serra Azul Monteiro, por oferecer o seu laboratório e por todos os esclarecimentos;

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

À Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins, pela participação na banca;

Ao amigo Daniel, pela orientação e ajuda sempre;

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

Aos colegas do LFAVET, por toda a ajuda e os bons momentos juntos;

Aos técnicos Silvana, Luciana, Adriano e Maria de Fátima, por toda a colaboração nos experimentos;

Aos professores da Pós-graduação em Farmacologia pelos ensinamentos;

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia;

Aos meus pais, pelo amor incondicional e torcida constante;

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

Ao meu amado esposo, com o qual eu tenho passado os melhores momentos da minha vida.

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

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

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Índice

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Símbolos e Abreviaturas

Resumo

Abstract

1. Introdução.....	20
1.1. Câncer.....	21
1.2. Polissacarídeos como modificadores da resposta biológica.....	29
1.3. Algas como fonte de produtos bioativos.....	36
2. Objetivos.....	41
2.1. Geral.....	42
2.2. Específicos	42
3. Material e Métodos.....	43
3.1. Materiais utilizados.....	44
3.1.1. Equipamentos.....	44
3.1.2. Reagentes.....	45
3.1.3. Fármacos.....	46

3.1.4. Células.....	46
3.2. Coleta e limpeza do material.....	47
3.3. Extração dos polissacarídeos.....	47
3.4. Fracionamento dos Polissacarídeos Sulfatados.....	49
3.5. Atividade citotóxica <i>in vitro</i>	49
3.5.1. Ensaio do MTT.....	49
3.5.1.1. Manutenção das células.....	49
3.5.1.2. Procedimento experimental.....	50
3.5.1.3. Análise dos dados.....	50
3.6. Estudo da atividade antitumoral <i>in vivo</i>	50
3.6.1. Obtenção e manutenção dos animais.....	50
3.6.2. Procedimento experimental.....	51
3.6.3. Análise dos dados.....	51
3.6.4. Análise morfológica e histopatológica.....	51
3.6.4.1. Procedimento experimental.....	51
3.6.4.2. Análise dos dados.....	52
3.6.5. Determinação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos.....	52
3.6.5.1. Procedimento experimental.....	52
3.6.5.2. Análise dos dados.....	52
3.7. Atividade Imunoestimulatória.....	53
3.7.1. Atividade edematogênica.....	53

3.7.1.1. Procedimento experimental.....	53
3.7.1.2. Análise dos dados.....	53
3.7.2. Imunização subcutânea.....	54
3.7.2.1. Procedimento experimental.....	54
3.7.2.2. Análise dos dados.....	54
3.7.3. Ativação de macrófagos <i>in vivo</i>	55
3.7.4. Tratamento de Sarcoma 180 com sobrenadante de macrófagos ativados.....	55
3.7.4.1. Procedimento experimental.....	55
3.7.4.2. Análise dos dados.....	56
3.7.5. Migração de neutrófilos.....	56
3.7.5.1. Procedimento experimental.....	56
3.7.5.2. Análise dos dados.....	57
3.7.6. Produção de NO.....	57
3.7.6.1. Procedimento experimental.....	57
3.7.6.2. Análise dos dados.....	58
3.8. Perfusão de rim isolado.....	58
3.8.1. Obtenção e manutenção dos animais.....	58
3.8.2. Sistema de perfusão.....	58
3.8.2.1. Calibração do sistema.....	60
3.8.2.2. Solução perfusora.....	61
3.8.2.3. Técnica cirúrgica.....	61

3.8.2.4. Procedimento experimental.....	64
3.8.2.5. Análises bioquímicas.....	64
3.8.2.6. Cálculos de parâmetros funcionais renais.....	64
3.8.2.7. Estudo histológico.....	66
3.9. Perfusão de leito vascular isolado.....	66
3.9.1. Procedimento experimental.....	66
3.9.2. Análise dos dados.....	68
4. Resultados.....	69
4.1. Atividade citotóxica <i>in vitro</i>	70
4.2. Estudo da atividade antitumoral <i>in vivo</i>	70
4.2.1. Inibição tumoral.....	70
4.2.2. Análise morfológica e histopatológica.....	72
4.2.3. Determinação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos.....	78
4.3. Atividade imunoestimulatória.....	81
4.3.1. Atividade edematogênica.....	81
4.3.2. Imunização subcutânea.....	82
4.3.3. Tratamento de Sarcoma 180 com sobrenadante de macrófagos Ativados.....	84
4.3.4. Migração de neutrófilos.....	85
4.3.5. Produção de NO.....	86

4.4. Perfusão de rim isolado.....	86
4.5. Perfusão de leito vascular isolado.....	95
5. Discussão.....	96
6. Conclusão.....	107
7. Referências Bibliográficas.....	109

Lista de Figuras

Figura 1	Ilustração esquemática das capacidades adquiridas do câncer.....	23
Figura 2	Ilustração esquemática da ativação da célula T.....	26
Figura 3	Ilustração esquemática do mecanismo proposto para ativação de células imunes por polissacarídeos modificadores da resposta biológica.....	35
Figura 4	Fotografia da alga <i>Champia feldmannii</i>	40
Figura 5	Fluxograma de extração de polissacarídeos sulfatados.....	48
Figura 6	Desenho esquemático do sistema de perfusão de rim isolado (LFAVET)....	59
Figura 7	Valores de pressão de perfusão (PP) registrados durante a calibração do sistema.....	60
Figura 8	Valores registrados pelo Fluxômetro (L/h) durante a calibração do sistema ...	60
Figura 9	Valores de volume urinário (mL/min) registrados durante a calibração do sistema.....	61
Figura 10	Procedimento cirúrgico para retirada de rim isolado de rato. A: isolamento da artéria femoral; B: isolamento e fixação da cânula ao ureter; C: isolamento das artérias mesentérica e renal; D: cânula fixada à artéria renal (LFAVET-UFC).....	63
Figura 11	Desenho esquemático do sistema de perfusão de leito vascular mesentérico (LFAVET-UFC).....	67

Figura 12	Efeito do polissacarídeo sulfatado isolado da alga <i>Champia feldmannii</i> (Cf-PLS) sobre a massa tumoral de camundongos transplantados com Sarcoma 180.....	71
Figura 13	Microfotografias dos cortes histológicos (400X) dos tumores de camundongos transplantados com células tumorais de Sarcoma 180.....	74
Figura 14	Microfotografias dos cortes histológicos (400X) dos fígados de camundongos transplantados com células tumorais de Sarcoma 180.....	75
Figura 15	Microfotografias dos cortes histológicos (400X) dos rins de camundongos transplantados com células tumorais de Sarcoma 180. A- grupo controle (salina); B- 5-FU (10 mg/Kg/dia); C- Cf-PLS (10 mg/Kg/dia); D- Cf-PLS + 5-FU (10 mg/Kg/dia); E- Cf-PLS (25 mg/Kg/dia).....	76
Figura 16	Microfotografias dos cortes histológicos (400X) dos baços de camundongos transplantados com células tumorais de Sarcoma 180. A- grupo controle (salina); B- 5-FU (10 mg/Kg/dia); C- Cf-PLS (25 mg/Kg/dia); D- Cf-PLS + 5-FU (10 mg/Kg/dia).....	77
Figura 17	Efeito do polissacarídeo sulfatado isolado da alga <i>Champia feldmannii</i> (Cf-PLS) sobre a formação de edema em ratos.....	81
Figura 18	A - Efeito de polissacarídeo sulfatado isolado de <i>Champia feldmannii</i> (Cf-PLS) na produção de anticorpos Ig total (■), IgE (●), IgG1 (▲) and IG2a (Δ). B – Efeito de Cf-PLS na produção de anticorpos específicos contra a ovalbumina (OVA).....	83
Figura 19	Efeito do polissacarídeo sulfatado isolado da alga <i>Champia feldmannii</i> (Cf-PLS) sobre a inibição de tumor Sarcoma 180.....	84
Figura 20	Efeito do polissacarídeo sulfatado isolado da alga <i>Champia feldmannii</i> (Cf-PLS) sobre a migração de neutrófilos.....	85
Figura 21	Efeitos do polissacarídeo sulfatado isolado da alga <i>Champia feldmannii</i> (Cf-PLS) na Pressão de Perfusão (PP) em rim isolado.....	87

Figura 22	Efeitos do polissacarídeo sulfatado isolado da alga <i>Champia feldmannii</i> (Cf-PLS) na Resistência Vascular Renal (RVR) em rim isolado.....	87
Figura 23	Efeitos do polissacarídeo sulfatado isolado da alga <i>Champia feldmannii</i> (Cf-PLS) no Fluxo Urinário (FU) em rim isolado.....	88
Figura 24	Efeitos do polissacarídeo sulfatado isolado da alga <i>Champia feldmannii</i> (Cf-PLS) no Ritmo de Filtração Glomerular (RFG) em rim isolado.....	88
Figura 25	Efeitos do polissacarídeo sulfatado isolado da alga <i>Champia feldmannii</i> (Cf-PLS) na Porcentagem de Transporte Tubular de Sódio (%T Na ⁺) em rim isolado.....	89
Figura 26	Efeitos do polissacarídeo sulfatado isolado da alga <i>Champia feldmannii</i> (Cf-PLS) na Porcentagem de Transporte Tubular de Potássio (%T K ⁺) em rim isolado.....	89
Figura 27	Efeitos do polissacarídeo sulfatado isolado da alga <i>Champia feldmannii</i> (Cf-PLS) na Porcentagem de Transporte Tubular de Cloreto (%T Cl) em rim isolado.....	90
Figura 28	Efeitos do polissacarídeo sulfatado isolado da alga <i>Champia feldmannii</i> (Cf-PLS) na Porcentagem de Transporte Tubular Proximal de Sódio (%pT Na ⁺) em rim isolado.....	90
Figura 29	Porcentagem de Transporte Tubular Proximal de Potássio (%pT K ⁺) no grupo tratado com o polissacarídeo sulfatado isolado da alga <i>Champia feldmannii</i> (Cf-PLS) em rim isolado.....	91
Figura 30	Efeitos do polissacarídeo sulfatado isolado da alga <i>Champia feldmannii</i> (Cf-PLS) na Porcentagem de Transporte Tubular Proximal de Cloreto (%pT Cl) em rim isolado.....	91

Figura 31	Efeitos do polissacarídeo sulfatado isolado da alga <i>Champia feldmannii</i> (Cf-PLS) na Excreção de Sódio (ENa^+) em rim isolado.....	92
Figura 32	Efeitos do polissacarídeo sulfatado isolado da alga <i>Champia feldmannii</i> (Cf-PLS) na Excreção de Potássio (EK^+) em rim isolado.....	92
Figura 33	Efeitos do polissacarídeo sulfatado isolado da alga <i>Champia feldmannii</i> (Cf-PLS) na Excreção de Cloreto (ECI^-) em rim isolado.....	93
Figura 34	Microfotografias dos cortes histológicos (400X) dos rins de ratos.....	94
Figura 35	Pressão de leito mesentérico no grupo tratado com o polissacarídeo sulfatado isolado da alga <i>Champia feldmannii</i> (Cf-PLS).....	95

Lista de Tabelas

Tabela 1	Linhagens tumorais utilizadas no ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i>	46
Tabela 2	Cálculos para determinação de parâmetros funcionais renais.....	65
Tabela 3	Efeito do polissacarídeo sulfatado isolado da alga <i>Champia feldmannii</i> (Cf-PLS) em camundongo transplantado com tumor Sarcoma-180.....	73
Tabela 4	Efeito do polissacarídeo sulfatado isolado da alga <i>Champia feldmannii</i> (Cf-PLS) nos parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos transplantados com tumor S180.....	79
Tabela 5	Efeito do polissacarídeo sulfatado isolado da alga <i>Champia feldmannii</i> (Cf-PLS) nas alterações hematológicas de sangue periférico de camundongo transplantado com tumor S180.....	80

Lista de Símbolos e Abreviaturas

5-FU	5-Fluorouracil
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
CI ₅₀	Concentração inibitória média
DMSO	Dimetilsulfóxido
E.P.M.	Erro padrão da média
FGF	Fator de crescimento do fibroblasto
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral
FU	Fluxo Urinário
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
M	Molar
MHC	Molécula do complexo de histocompatibilidade
PBS	Phosphate buffer solution (Tampão fosfato)
% pT Cl ⁻	Porcentagem de Transporte Tubular proximal de Cl ⁻
% pT K ⁺	Porcentagem de Transporte Tubular proximal de K ⁺

$\% \text{ pT Na}^+$	Porcentagem de Transporte Tubular proximal de Na^+
$\% \text{ T Cl}^-$	Porcentagem de Transporte Tubular total de Cl^-
$\% \text{ T K}^+$	Porcentagem de Transporte Tubular total de K^+
$\% \text{ T Na}^+$	Porcentagem de Transporte Tubular total de Na^+
PP	Pressão de Perfusão
pRb	Proteína retinoblastoma
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
RVR	Resistência Vascular Renal
RFG	Ritmo de Filtração Glomerular

RESUMO

ESTUDO DAS ATIVIDADES ANTITUMORAL E IMUNOESTIMULANTE DO POLISSACARÍDEO SULFATADO ISOLADO DE *Champia feldmannii* DIAZ-PIFFERER (1977). Kézia Oliveira Abrantes de Lacerda Lins. Orientadora: Letícia Veras Costa Lotufo. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFC, 2008.

O câncer é uma doença que afeta cada vez mais um número maior de pessoas em todo o mundo. As terapias atuais utilizadas para o tratamento do câncer são ainda insatisfatórias. Produtos naturais têm sido avaliados para seleção de compostos ativos, capazes de reduzir os tumores malignos de uma forma mais eficiente e com menos efeitos indesejáveis. O polissacarídeo sulfatado extraído da alga *Champia feldmannii* (Cf-PLS) foi testado para avaliação do seu potencial antitumoral e imunoestimulante. Além disso, foram feitos testes de toxicidade do fígado, rins e baço após o tratamento com Cf-PLS. Os resultados demonstraram que Cf-PLS não apresenta citotoxicidade *in vitro*, mas é capaz de reduzir o tumor Sarcoma 180 implantado em camundongos em 48,16% e 48,62% nas doses de 10 e 25mg/kg, respectivamente, e reduz 68,32% quando administrado juntamente com 5-Fluorouracil (5-FU). As análises do fígado e rins revelaram que houve certa toxicidade no rim, com áreas de necrose tubular aguda na maior dose. Os testes da perfusão renal revelaram que Cf-PLS causa aumento da pressão de perfusão, resistência vascular renal, ritmo de filtração glomerular e fluxo urinário, além da excreção de sódio, cloreto e potássio. Não houve alterações nos percentuais de transporte totais ou tubular proximais de sódio, cloreto ou potássio. Houve discreta deposição protéica nos glomérulos e túbulos renais. Não houve alterações nas análises bioquímicas e os testes hematológicos revelaram uma leucopenia causada por 5-FU, entretanto esta foi revertida pelo tratamento com Cf-PLS. Também foi demonstrado que Cf-PLS age como agente imunoestimulante e imunomodulador, aumentando a produção de anticorpos totais e específicos contra Cf-PLS e OVA, aumentando também a polpa branca e o número de megacariócitos nos baços dos animais tratados e induzindo a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos. Pode-se concluir que Cf-PLS apresenta atividade antitumoral e que esta atividade pode estar relacionada com suas propriedades imunoestimulantes.

Palavras-chave: *Champia feldmannii*, polissacarídeos sulfatados, antitumoral, imunomodulatório, toxicidade.

ABSTRACT

ANTITUMOR AND IMMUNOSTIMULANT PROPERTIES OF A SULFATED POLYSACCHARIDE ISOLATED FROM *Champia Feldmannii* DIAZ-PIFFERER (1977). Kézia Oliveira Abrantes de Lacerda Lins. Advisor: Letícia Veras Costa Lotufo. Master. Postgraduate Program on Pharmacology. Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceara, UFC, 2008.

Cancer is a disease that occurs in a larger number of people each year. The therapies used to treat it are still not satisfactory. Natural products have been studied to select new compounds capable of reducing tumours and with fewer side effects. The sulfated polysaccharide isolated from the seaweed *C. feldmannii* (Cf-PLS) was investigated for its antitumor and immunostimulating properties and also for the toxicological aspects related to Cf-PLS treatment. The Cf-PLS did not show any significant *in vitro* cytotoxic effect, but showed a strong *in vivo* antitumor effect. The inhibition rates of sarcoma 180 tumor development were 48.16 % and 48.62% at the doses of 10 and 25 mg/kg, respectively, and 68.32% when treated together with 5-fluorouracil (5-FU). The histopathological analysis of liver and kidney showed that the kidneys were affected by Cf-PLS-treatment, presenting some focal areas of acute tubular necrosis at the higher dose. Cf-PLS caused considerable changes in renal physiology, as shown by an increase in parameters such as perfusion pressure, renal vascular resistance, glomerular filtration rate, urinary flow and sodium, chloride and potassium excretion. Neither enzymatic activity of alanine aminotransferase, urea nor creatinin levels were significantly altered. In hematological analyses, leucopeny was observed after 5-FU treatment, but this effect was prevented when the treatment was associated with the Cf-PLS. It was also demonstrated that Cf-PLS acts as an immunomodulatory agent, raising the production of specific antibodies, and also increasing the production of OVA-specific antibodies. In addition, it induced a discreet increase of the white pulp and nest of megakaryocytic in spleen of treated mice and the neutrophil migration to the intraperitoneal cavity of mice. In conclusion, Cf-PLS has some interesting antitumour activity that could be associated with its immunostimulanting properties.

Keywords: *Champia feldmannii*, sulfated polysaccharides, antitumor activity, immunomodulatory activity, toxicity.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer

O câncer é uma doença responsável pela morte de mais de sete milhões de pessoas por ano em todo o mundo, o que representa 13% do total de 58 milhões de mortes ocorridas no ano de 2005. No Brasil, estima-se que no ano de 2008 ocorrerão 466.730 novos casos de câncer, sendo os mais incidentes, com exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, os cânceres de próstata e de pulmão, no sexo masculino, e os cânceres de mama e de colo do útero, no sexo feminino (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Existem mais de 100 tipos diferentes de câncer. Observações em modelos de cânceres animais e humanos concluem que o desenvolvimento de tumores acontece através de um processo análogo à evolução Darwinista, onde há uma sucessão de mudanças genéticas, cada uma permitindo algum tipo de vantagem no crescimento celular, levando à conversão de células humanas normais a células cancerígenas (FOULDS, 1954; HANAHAN & WEINBERG, 2000; NOWELL, 1976).

De acordo com Hanahan & Weinberg (2000), a maioria, ou talvez todos os tipos de tumores de câncer, tenham adquirido um conjunto de alterações na fisiologia da célula durante o seu desenvolvimento, as quais coletivamente irão promover um crescimento de forma maligna (Figura 1).

Uma das capacidades adquiridas pelas células cancerígenas é a auto-suficiência de sinais de crescimento. Estes são requeridos durante o processo de mitose pelas células normais na passagem de um estado quiescente para um estado proliferativo. As células tumorais são capazes de gerar seus próprios sinais de crescimento, diminuindo a dependência do microambiente ao redor. Para isso, agem a nível de receptores dos sinais de crescimento extracelulares, dos transdutores transcelulares e dos efetores que traduzem os sinais dentro da célula (FEDI *et al.*, 1997) .

Para manter a homeostase nos tecidos, vários sinais antiproliferativos são usados a fim de forçar as células normais a saírem de um estado proliferativo para um estado quiescente até que haja uma mudança nos sinais extracelulares, ou induzi-las a entrar em um estado pós-mitótico, onde seu potencial proliferativo será permanentemente perdido. Para prosperarem, as células cancerígenas precisam tornar-se insensíveis a esses sinais. Isso ocorre, principalmente, através de uma ação, a nível molecular, no circuito de sinalização da proteína retinoblastoma (pRb). Quando em seu estado hipofosforilado, a pRb impede a proliferação ao seqüestrar e alterar funções do fator de transcrição E2F, que controla a expressão de genes essenciais para a progressão da fase G1, onde há a síntese de proteínas, para a fase S, onde ocorre a replicação das moléculas de DNA (WEINBERG, 1995).

O mecanismo que a célula usa para impedir que erros sejam propagados durante a replicação celular é a morte celular programada ou, apoptose. Uma vez iniciada, após uma variedade de sinais fisiológicos, acontece uma série de eventos: as membranas celulares são rompidas, o esqueleto citoplasmático e nuclear é quebrado, o citosol é expelido, os cromossomos degradados, e o núcleo é fragmentado, tudo isso no tempo de 30 a 120 minutos. No final, os restos celulares são englobados pelas células vizinhas e desaparecem, geralmente dentro de 24 horas (WYLLIE *et al.*, 1980). Em mais de 50% dos cânceres em humanos, observa-se que há uma mutação no gene supressor *p53*, causando uma inativação do seu produto, a proteína p53, um dos componentes principais na detecção de danos ao DNA e conseqüente indução da cascata apoptótica (HARRIS, 1996).

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



Figura 1 - Ilustração esquemática das capacidades adquiridas do câncer (modificado de HANAHAN & WEINBERG, 2000).

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

Durante o desenvolvimento da maioria dos cânceres humanos, algumas células saem do tumor inicial e invadem tecidos adjacentes também indo para locais distantes no corpo, onde não há limitação de espaço e nutrientes, para tentar formar novas colônias. Este processo é conhecido como metástase e é responsável por 90% das mortes por câncer (SPORN, 1996). Para aquisição desta habilidade é essencial a ativação de proteases extracelulares e alteração da especificidade de ligação de caderinas, de moléculas de adesão intercelular (CAMs) e de integrinas (APLIN *et al.*, 1998). Entretanto, os mecanismos moleculares que regulam essas alterações ainda estão pouco estabelecidos.

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

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

Durante o desenvolvimento de tumores é produzida constantemente uma grande quantidade de antígenos, que podem ser detectados pelo sistema imune. Em seguida, o sistema imune inicia uma resposta para eliminar as células transformadas e inibir o

desenvolvimento do tumor (BURNET, 1970; DUNN *et al.*, 2002). A resposta produzida pelo sistema imune pode ser do tipo inata ou adquirida. A imunidade adquirida tem a vantagem de apresentar especificidade por antígenos e gerar uma memória imunológica. Ela pode ser dividida em humoral ou mediada por célula. Enquanto a resposta humoral é direcionada contra antígenos nativos, normalmente extracelulares, a resposta mediada por célula elimina patógenos intracelulares e células modificadas (QUATAN *et al.*, 2004).

O reconhecimento de uma célula tumoral pelo sistema imune se dá através da ligação entre os receptores dos linfócitos T (LTR) e pequenos peptídios que estão na superfície das moléculas do complexo de histocompatibilidade (MHC). No geral, as moléculas de MHC da classe I apresentam peptídios antigênicos para as células T citotóxicas (CD8⁺), enquanto as células T auxiliares (CD4⁺) reconhecem os peptídios apresentados pelas moléculas MHC da classe II. Para que ocorra a ativação das células T, é necessário que se tenha uma ligação do seu receptor com os peptídios das moléculas MHC presentes nas células dendríticas (DC), que são células apresentadoras de antígenos derivadas da medula óssea. É necessário ainda uma co-estimulação através da interação entre CD80 e CD86 das células dendríticas e do CD28 da célula T, tudo isso na presença da IL-12 (Figura 2). Todo este processo de ligação cruzada é conhecido como “*cross-priming*” (HEATH & CARBONE, 1999; 2001).

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

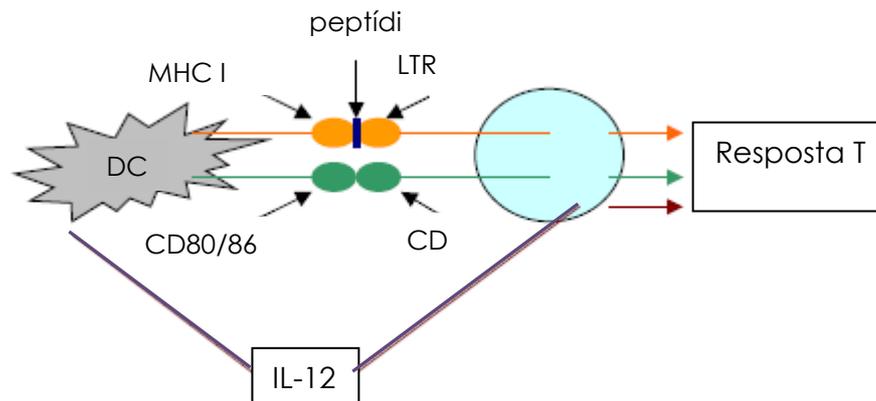


Figura 2 - Ilustração esquemática da ativação da célula T (modificado de QUATAN *et al.*, 2004). DC- célula dendrítica; IL-12- Interleucina-12; LTR-receptores de linfócitos T; MCH I- moléculas do complexo de histocompatibilidade do tipo I. CD- receptores.

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

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

De acordo com Rescigno *et al.* (2007) as vacinas terapêuticas que estão direcionadas ao tratamento contra tumores já estabelecidos, podem ser distinguidas como imunoterapia passiva ou ativa. A imunoterapia passiva é baseada na transferência de células imunes ativadas *ex-vivo*, imunomoduladores (incluindo citocinas) ou anticorpos tumores-específicos, enquanto a imunoterapia ativa consiste na ativação do sistema imune do próprio paciente. Isso se dá através da administração de uma vacina terapêutica, como por exemplo, no uso de células dendríticas como adjuvantes.

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

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

Alguns adjuvantes comumente usados são o adjuvante de Freund, um óleo mineral que contém micobactéria. Também a vacina contra a tuberculose, Bacillus-Calmette-Guérin (BCG), tem uma ótima atividade adjuvante e suscita tanto a resposta humoral como a mediada por célula. Por causa da sua segurança, tem sido amplamente utilizada como adjuvante em testes clínicos (ALEXANDROFF *et al.*, 1999; DUDA *et al.*, 1995). A hemocianina, uma proteína derivada de moluscos, tem sido usada como adjuvante imunológico e como antígeno

marcador substituto na avaliação de respostas mediadas por célula a vacinas (MOLTO *et al.*, 1991; SHIMIZU *et al.*, 2001). Também as saponinas, glicosídeos triterpenóides isolados da planta *Quillaja saponaria*, como a QS21 possuem um forte poder adjuvante para indução de células T citotóxicas, citocinas Th1, como IL-2 e INF- γ , e anticorpos IgG2a. Além disso, DNA bacterial tem efeitos imunoestimulatórios em células imunes *in vitro*, devido à presença de dinucleotídeos CG não metilados. Isso induz as células do sistema imune, como macrófagos e células dendríticas, a aumentar a expressão de moléculas MHC II e de moléculas co-estimulatórias, além de promover a transcrição de mRNA de citocinas e secretar citocinas pró-inflamatórias (DAVIS *et al.*, 1998; JAKOB *et al.*, 1998).

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

Estudos clínicos em pacientes com linfoma e pacientes com câncer de próstata demonstraram que o uso de células dendríticas como adjuvantes pode levar a resultados promissores na imunoterapia do câncer (FONG *et al.*, 2001; TIMMERMAN *et al.*, 2002). A administração de células dendríticas associadas com citocinas, prostaglandinas e ligantes do receptor *Toll-like* (TLR), são capazes de aumentar a capacidade imunoestimulatória dessas células (WECK *et al.*, 2007). Diversos compostos naturais ou sintéticos podem agir como ligantes para os receptores *Toll-like*, como lipopolissacarídeos, RNAs e DNAs bacterianos. O imiquimode, atualmente utilizado para o tratamento de carcinomas, é possivelmente um imunomodulador e funciona como um ligante de TLR, aumentando a imunogenicidade e sobrevivência das células dendríticas (PRINS *et al.*, 2006).

1.2. Polissacarídeos como Modificadores da Resposta Biológica

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

Modificadores da resposta biológica são substâncias que têm a capacidade de melhorar o sistema imune. Estas podem ser citocinas que são produzidas de forma endógena no corpo por células imunes ou derivados de outros organismos. Estes modificadores da resposta biológica exógenos podem ser ácidos nucleicos, lipídios, proteínas ou polissacarídeos. Dentre eles, os polissacarídeos são os que estão presentes em maior abundância na natureza. Sua origem pode ser de uma bactéria, fungo, alga ou planta. A nível celular, sua fonte pode ser a partir de reservas de polissacarídeos do citoplasma, ou polissacarídeos estruturais presentes nas membranas ou paredes celulares dos organismos. Os métodos de extração e purificação estão diretamente relacionados com a forma como as moléculas de polissacarídeos se encontram arranjadas (LEUNG *et al.*, 2006).

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

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

Nas últimas décadas, vários polissacarídeos foram isolados de fungos, algas, líquens e plantas superiores, e têm atraído elevada atenção devido ao seu amplo espectro de propriedades terapêuticas e uma toxicidade relativamente baixa (PAULSEN, 2001; TZIANABOS, 2000; WASSER, 2002). Mais de 35 espécies de plantas pertencentes a 22 famílias diferentes apresentam atividade antitumoral e imunoestimulantes, como *Panax ginseng* (SONG *et al.*, 2002), *Morinda citrifolia* (HIRAZUMI & FARUSAWA, 1999), *Pinus parviflora* (SAKAGAMI *et al.*, 1987), *Glycine max* (LIAO *et al.*, 2001), *Curcuma zedoaria* (KIM *et al.*, 2000), *Angelica sinensis* (CHOY *et al.*, 1994), *Aloe vera* L. var. *chinensis* (LIU *et al.*, 2006), entre outras. Polissacarídeos contendo arabinogalactanos extraídos de *Juniperus scopolorum* apresentam potentes propriedades imunoestimulatórias em macrófagos humanos, demonstrado pela expressão de iNOS, produção de NO e aumento da produção tanto de citocinas inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-12, e TNF- α) como anti-inflamatórias (IL-10) (SCHEPETKIN *et al.*, 2005). Polissacarídeos isolados também de pólen de plantas têm apresentado atividade antitumoral e imunoestimulante (GAO *et al.*, 2003; LOTHAR *et al.*, 2005). Yang *et al.* (2007) isolaram um polissacarídeo do pólen de *Brassica napus* L. que apresentou atividade antitumoral *in vivo* contra Sarcoma-180 e melanoma B-16, através da imunomodulação, ação leucogênica e antianêmica. Liu *et al.*, 2007, baseado na medicina tradicional chinesa, que utiliza ouriços na alimentação como forma de melhorar o sistema

imune, verificou a presença de atividade antitumoral de polissacarídeos isolados dos ovos de *Strongylocentrotus nudus* em camundongos implantados com sarcoma-180.

A maioria dos estudos está ainda em fase experimental pré-clínica, utilizando animais. Estudos clínicos têm sido realizados principalmente na China e Japão, onde alguns polissacarídeos já estão sendo comercializados.

A lentinana, produzida pelo fungo *Lentinus edodes*, é um β -D-glucano puro, inicialmente estudado por Chihara *et al.* (1970), que demonstraram seu elevado potencial antitumoral relacionado aos outros polissacarídeos de fungos. Ela é capaz de elevar os níveis de expressão gênica da IL-1 α e IL-1 β , citocinas que agem em diversos alvos, como células B e T e monócitos, além de induzir a produção de outras citocinas como o TNF- α (LIU *et al.*, 1999). A lentinana obteve sucesso na sobrevida de pacientes com câncer, especialmente os portadores de câncer de estômago e cóloretal (FURUE & KITO, 1981; TAGUCHI, 1985). Em um estudo aleatório em pacientes tratados com um quimioterápico (tegafur) isolado, ou uma combinação do quimioterápico com o polissacarídeo lentinana, observou-se que houve um aumento significativo nas taxas de sobrevida no grupo de pacientes tratados com a combinação do quimioterápico e a lentinana: 19,5% sobreviveram mais de um ano, 10,4% mais de dois anos e 6,5% sobreviveram mais de três anos. Foram observados apenas raros efeitos adversos. A lentinana, quando usada em conjunto com agentes quimioterápicos, tem a capacidade de reduzir drasticamente os efeitos indesejáveis da quimioterapia, como náuseas, dores, perda de cabelo e imunodepressão (DABA & EZERONYE, 2003).

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

Um polissacarídeo ligado a proteínas (PSK) isolado a partir do fungo *Coriolus versicolor* no Japão exibe um marcante efeito antitumoral contra tumores alogênicos como Sarcoma 180 e carcinoma de Ehrlich em animais experimentais, quando administrado tanto por via oral ou intraperitoneal (KOBAYASHI *et al.*, 1993). Ele age estimulando a ativação de

células T e induzindo a expressão gênica de algumas citocinas como IFN- γ , IL-2, TNF- α , IL-1, IL-8 e IL-6 *in vitro* e *in vivo* (KATO *et al.*, 1995). Quando o PSK é injetado na massa de um tumor gástrico humano anteriormente à cirurgia, ele torna as células T ao redor do local capazes de se infiltrar no tumor e desenvolver uma elevada capacidade citotóxica contra ele. Estes resultados foram encontrados com a administração durante 14 dias do PSK a pacientes com câncer na bexiga (MIZUTANI & YOSHIDA, 1991).

Na China, um polissacarídeo ligado a peptídeos (PSP), similar ao PSK, também isolado de *Coriolus versicolor*, apresentou semelhantemente uma ampla e potente atividade antitumoral, inibindo tumores de Ehrlich, leucemia PS33 e leucemia monocítica (YANG *et al.*, 1992). Ele também age como um modificador da resposta biológica, estimulando a ativação de células T e induzindo a produção de IFN- γ e IL-2 (YANG & YUN, 1999).

Outros polissacarídeos β -glucanos com propriedades antitumorais foram isolados dos fungos *Grifola frondosa* (OKAZAKI *et al.*, 1995), *Isaria farinosa* (JIANG *et al.*, 2006), *Pleurotus tuberregium* (TAO *et al.*, 2006) e *Sclerotinia sclerotiorum* (BORCHERS *et al.*, 1999), assim como dos líquens *Cetraria islandica* (INGOLFSDOTTIR *et al.*, 1994) e *Thamnolia subuliformis* (OLAFSDOTTIR *et al.*, 1999). Também polissacarídeos α -glucanos sulfatados isolados de *Lentinus edodes* (ZHANG & CHEUNG, 2002) e de *Poria cocos* (HUANG *et al.*, 2006) têm sido estudados e apresentam também atividade antitumoral.

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

Essas respostas biológicas promovidas pelos polissacarídeos estão relacionadas com o padrão de expressão e os eventos moleculares que são acionados pelos seus respectivos receptores e proteínas às quais eles se ligam. Esses receptores e proteínas são derivados do sistema imune inato. Os polissacarídeos se ligam aos receptores de reconhecimento de padrão (PRRs), como os receptores *Toll-like* (TLRs), receptores *scavenger* (SRs), receptores β -

glucanos, receptor do complemento do tipo 3 (CR3), receptor de manose e proteínas do plasma das vias do complemento.

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

As células mielóides, que têm um importante papel tanto no sistema imune inato quanto o adquirido, são o principal alvo dos polissacarídeos modificadores da resposta biológica (ESTRADA *et al.*, 1997; LEE *et al.*, 2001). Os efeitos estimulatórios dos polissacarídeos sobre os macrófagos (uma das principais células mielóides) são o aumento da fagocitose (STUART *et al.*, 1997), da produção de espécies reativas de oxigênio (LIM *et al.*, 2004), da expressão de marcadores da ativação, como o receptor Fc (MATSUMOTO & YAMADA, 1995), e da secreção de citocinas (ESTRADA *et al.*, 1997; KODAMA *et al.*, 2004). Polissacarídeos modificadores da resposta biológica têm então a capacidade de melhorar a função efetora dos macrófagos, a capacidade de processar antígenos e de modular a imunidade adquirida através da secreção de citocinas, apresentação de antígenos e expressão de moléculas de adesão celular. A ativação direta de outras células imunes como as células *natural killer* (NK) e linfócitos são consideradas como um evento secundário (LEUNG *et al.*, 2006).

Polissacarídeos modificadores da resposta biológica são geralmente fortes mitogênicos. Macrófagos, Linfócitos T e B e células NK proliferam em resposta à estimulação com esses polissacarídeos, que é mediada através da ligação do polissacarídeo ao

seu receptor correspondente. Essa ativação mitogênica é caracterizada pelo uso de proteínas quinases (MAPKs) nos eventos de sinalização intracelular (GARCIA-LORA *et al.*, 2003; HAN *et al.*, 2003). Este pode ser um fenômeno comum a todas as células imune que podem ser estimuladas por polissacarídeos.

Outro mecanismo imunomodulatório dos polissacarídeos é o de ser anti-apoptótico. Hwang *et al.* (2003) demonstrou que polissacarídeos isolados de *Artemisia iwayomogi* têm a capacidade de suprimir a apoptose em esplenócitos de camundongos *in vitro* e *in vivo*. Além da ativação celular, os polissacarídeos acionam vias do complemento do sistema imune. Estudos demonstram que polissacarídeos que contém manano, pectina ou β -glucanos agem através das vias do complemento (GLOVSKY *et al.*, 1983; MICHAELSEN *et al.*, 2000). Esta auxilia a defesa contra patógenos de forma direta ou indiretamente através da ativação de macrófagos. Os mecanismos pelo quais os polissacarídeos agem estão resumidos na Figura 3.

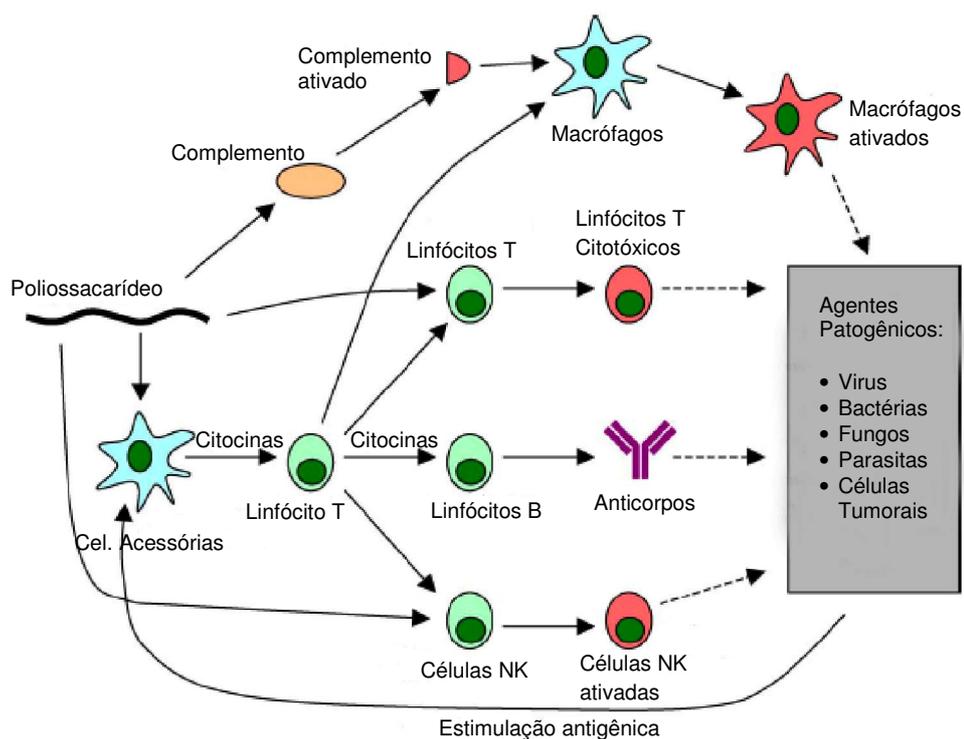


Figura 3 – Ilustração esquemática do mecanismo proposto para ativação de células imunes por polissacarídeos modificadores da resposta biológica (modificados de LEUNG *et al.*, 2006).

1.3. Algas como fonte de produtos bioativos

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

A utilização das algas no comércio global é uma indústria que gera bilhões de dólares. O maior uso delas é através de cultura de espécies em cativeiro para obtenção de agar, carrageninas e alginatos. Dentre estes, os hidrocolóides têm maior significância comercial, devido às suas propriedades de formar gel, reter água e emulsificar (RENN, 1997). Nos anos 50, as propriedades medicinais das algas eram restritas à medicina tradicional e popular (LINCOLN *et al.*, 1991). Entretanto, os organismos marinhos passaram a ser pesquisados pelas suas propriedades biológicas ou farmacológicas, sendo as algas uma fonte de aproximadamente 35% dos compostos químicos descobertos entre os anos de 1977 a 1987, seguido de esponjas (29%) e cnidários (22%) (IRELAN *et al.*, 1993).

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

Alguns polissacarídeos de algas vermelhas possuem atividades antivirais contra viroses responsáveis por doenças humanas infecciosas. As mais evidentes são *Aghardhiella tenera* e *Nothogenia fastigiata*. Polissacarídeos sulfatados isolados tanto de *A. tenera* (WITVROUW *et al.*, 1994) quanto de *N. fastigiata* (DAMONTE *et al.*, 1994; KOLENDER *et al.*, 1995) foram testados contra o vírus HIV, vírus da Herpes do tipo 1 e 2 e vírus sincicial respiratório. Estes apresentaram atividade durante o primeiro estágio de replicação do RNA viral, quando o vírus entra na superfície da célula (DE CLERCQ, 1996). Um requerimento

importante para a utilização de uma substância como composto farmacológico em humanos é que ela tenha baixa toxicidade em células de mamíferos e a maioria dos polissacarídeos de algas, inclusive destas duas espécies possuem essa característica. Polissacarídeos sulfatados de *Schizymenia pacifica* (NAKASHIMA *et al.*, 1987) inibem a enzima transcriptase reversa do vírus HIV, enquanto os de *Gracilaria corticata* agem em vírus da Herpes do tipo 1 e 2 (MAZUMDER *et al.*, 2002). Substâncias isoladas de *Gigartina skottsbergii* (CARLLUCI *et al.*, 1999) e *Stenogramme interrupta* (CÁRCERES *et al.*, 2000) também apresentaram atividade antiviral.

Fucanos são polissacarídeos sulfatados encontrados abundantemente no espaço extracelular e na matriz mucilagínosa de algas. Fucanos de *Fucus vesiculosus* e *Ascophyllum nodosum* foram patenteados como substâncias anticoagulantes. Eles possuem ainda atividade antitrombótica, mediada por inibidores da coagulação como cofator II e antitrombina III (CHURCH *et al.*, 1989; COLLIEC *et al.*, 1991) e inibem a interação inicial do esperma com o óvulo humano, sendo um candidato potencial para o desenvolvimento de fármacos microbicidas vaginais com propriedades contraceptivas (OEHNINGER *et al.*, 1991). Galactanas sulfatadas de *Botryocladia occidentalis* apresentaram um interessante efeito que produzia uma ação anticoagulante em baixas doses e, quando a dose era aumentada, induzia a agregação plaquetária (FARIAS *et al.*, 2001).

Muitos polissacarídeos sulfatados de algas apresentam propriedades citotóxicas. Os fucanos possuem atividade antitumoral, anticâncer, antimetástase e fibrinolítica quando estudados em camundongos (COOMBE *et al.*, 1987; MARUYAMA *et al.*, 1987), além de reduzirem a proliferação celular (RELIGA *et al.*, 2000). Fucanos isolados da alga parda *Sargassum thunbergii* apresentaram atividade antitumoral e antimetastática provavelmente devido sua ação imunoestimulante e imunomoduladora (ITOH *et al.*, 1995). Essas ações antitumorais parecem estar relacionados com a quantidade dos grupos sulfatados na molécula e com sua posição (KOYANAGI *et al.*, 2003). Estudos ressaltam a importância do peso molecular, da distribuição dos monossacarídeos constituintes e das cargas presentes como influentes no potencial antitumoral dos polissacarídeos (ZHANG *et al.*, 2007). Assim, a adição de grupos sulfatos em polissacarídeos que são insolúveis em água, tornando-os assim solúveis, é capaz de aumentar a sua atividade antitumoral (HUANG *et al.*, 2006).

Carragenina é um termo coletivo para um grupo de polissacarídeos sulfatados, compostos por galactanos, extraídos de algas vermelhas. Dependendo do número e posição

dos grupos sulfatos, pode ser dividido em diferentes tipos, como as κ -carrageninas, ι -carrageninas, ou λ -carrageninas (JI, 1997). Estudos com λ -carrageninas de diferentes pesos moleculares isoladas de *Chondrus ocellatus* demonstraram que elas apresentavam atividade antitumoral e imunoestimulante e que os polissacarídeos que tinham menor peso molecular eram os que apresentavam uma maior taxa inibitória do tumor (ZHOU *et al.*, 2004). Yuan *et al.* (2005) verificou que κ -carrageninas de *Kappaphycus striatum* também possuem atividade antitumoral em animais implantados com o tumor sarcoma-180 e que essa ação se deve provavelmente à sua atividade imunomoduladora. Ogata *et al.* (1999) verificou que as carrageninas são altamente pró-inflamatórias em camundongos, induzindo a produção de TNF- α por leucócitos em resposta ao lipopolissacarídeo bacteriano.

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

Além destes, outros polissacarídeos apresentando atividade antitumoral e imunoestimulante foram isolados das algas *Porphyra yezoensis* (YOSHIZAWA *et al.*, 1993), *Gracilaria verrucosa* (YOSHIZAWA *et al.*, 1996), *Marginisporum crassissimum* (HIROISHI *et al.*, 2001), *Sargassum vulgare* (SOUSA *et al.*, 2006) e *Hijikia fusiforme* (OKAI *et al.*, 1997).

Segundo Hoek *et al.* (1995), existem aproximadamente 5.500 espécies de algas vermelhas (Rhodophyta). A alga *Champia feldmannii* Diaz-Pifferer 1977 (Figura 4) pertence à ordem Rhodymeniales, família Lomentariaceae. As espécies pertencentes ao gênero *Champia* crescem em tufos, sendo epífitas de outras algas. Apresentam coloração rósea-cárnea, translúcidas, com ramos cilíndricos e segmentados (JOLY, 1965). No litoral brasileiro ela pode ser encontrada no Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Bahia, Espírito Santo e Rio de Janeiro.

Poucos estudos têm sido realizados com essa alga. Apenas recentemente Assreuy *et al.* (2008) começou a estudar algumas propriedades biológicas de polissacarídeos sulfatados de *C. feldmannii*, avaliando modelos experimentais de inflamação, coagulação e nocicepção. O

polissacarídeo sulfatado isolado desta alga apresentou um efeito pró-inflamatório, causando edemas com pico de atividade após 1 hora de administração, além de aumentar a permeabilidade vascular. Foi observado também um aumento do número de leucócitos na cavidade peritoneal de ratos, acompanhada por uma migração de neutrófilos. Além disso, este polissacarídeo apresentou atividade anticoagulante e antinociceptiva. O presente trabalho busca estudar um pouco mais sobre as propriedades biológicas do polissacarídeo sulfatado isolado da alga *C. feldmannii*, com ênfase na atividade antitumoral.



Figura 4 - Fotografia da alga *Champia feldmannii*.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Verificar o potencial antitumoral e imunestimulante, bem como a toxicidade do polissacarídeo sulfatado isolado da macroalga *Champia feldmannii*.

2.2. Específicos

- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* do polissacarídeo em células tumorais.

- Avaliar o potencial antitumoral *in vivo* do polissacarídeo em camundongos transplantados com tumor Sarcoma 180.

- Avaliar a atividade imunestimulatória do polissacarídeo, através da formação de edema, produção de anticorpos e ativação de macrófagos.

- Determinar a toxicidade do polissacarídeo sobre alguns órgãos de camundongos, como o baço, fígado e rins, através dos exames histopatológico, hematológico e bioquímico do animal tratado com o polissacarídeo.

- Examinar o grau de nefrotoxicidade em sistema de perfusão renal e leito mesentérico isolados de ratos.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Materiais utilizados

3.1.1. Equipamentos

- Agitador de placa, MLW modelo Thys 2
- Agitador vortex, AD8850
- Balança analítica, GEHAKA AG200
- Balança para pesar animais, Filizola
- Banho-Maria, MOD. 105 DI DELLTA
- Centrífuga centimicro, FANEM Modelo 212
- Centrífuga de lâminas, Shandon Shouthern Cytospin
- Centrífuga de placas Eppendorf, Modelo Centrifuge 5403
- Centrífuga excelsa Baby I, FANEM Modelo 206
- Contador manual, Division of Bexton, Dickinson and Company
- Destilador de água
- Espectrofotômetro de placas, DTX 880 multimode detector, Beckman Coulter
- Fisiógrafo, Narco BioSystems
- Fluxo laminar, VECO
- Fotômetro de chama, 443 IL
- HTS (*High throuput screeing* biomek 3000), Beckman Coulter
- Incubadora de células (CO₂ Water-Jacket Incubator), NUAIRES TS Autoflow
- Microscópio óptico, Metripex Hungray PZO-Labimex Modelo Studar lab
- Microscópio óptico de inversão, Nikon Diaphot
- Micrótomo – SLEE - MANZ BR1

- Osmômetro de pressão a vapor, 5100c - WESCOR
- Pipetas automáticas, Gilson
- Pletismômetro, UGO BASILI
- Transdutor, Statham P23, Gould

3.1.2. Reagentes

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

- Soro fetal bovino (SFB), Cultilab

3.1.3. Fármacos

- Carragenina, FMC
- 5 – Fluorouracil, Sigma
- Gentamicina, Novafarma
- Zimosan, Sigma

3.1.4. Células

As células utilizadas no ensaio de citotoxicidade estão listadas quanto ao tipo histológico e origem na tabela 1. Todas as linhagens são pertencentes ao Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará.

Tabela 1 - Linhagens tumorais utilizadas no ensaio de citotoxicidade *in vitro*.

Linhagem	Tipo Histológico	Origem
HL-60	Leucemia promielocítica	humano
HCT-8	Carcinoma de cólon	humano
MDA- MB435	Melanoma	humano
SF-295	Carcinoma do sistema nervoso	humano

3.2. Coleta e limpeza do material

A alga marinha vermelha *Champia feldmannii* foi coletada na Praia do Pacheco, Município de Caucaia - Ceará, durante as marés de sizígia. Em seguida, transportada em saco plástico até o laboratório, sendo cuidadosamente separada das epífitas e lavada com água destilada para a retirada de impurezas. Após a limpeza, a alga foi desidratada à luz solar e cortada em pequenos pedaços para, posteriormente, ser submetida ao processo de extração.

3.3. Extração dos polissacarídeos

A extração foi realizada a partir do tecido seco, previamente cortado e hidratado com 100 mL de tampão acetato de sódio 0,1M, pH 5,0 + EDTA 5mM + cisteína 5mM. Em seguida, adicionou-se 6,8 mL de uma solução de papaína (30 mg/mL), sendo a mistura incubada a 60 °C por 24 horas.

Após esse período, a mistura foi filtrada e centrifugada (14.000 rpm; 20 min; 4°C), separando-se o resíduo do sobrenadante. Ao sobrenadante, foram adicionados 6,4 mL de solução à 10% de cloreto de cetilpiridino (CPC) para precipitar os polissacarídeos sulfatados por 24 horas, à temperatura ambiente. Após a precipitação, os polissacarídeos sulfatados foram centrifugados, descartando-se o sobrenadante. O precipitado foi lavado com 200 mL de CPC 0,05% e, posteriormente, dissolvido em 70 mL de uma solução de NaCl 2M:etanol (100:15; v:v). Em seguida, os polissacarídeos foram novamente precipitados com a adição de 122 mL de etanol absoluto, por 24 horas a 4°C.

Finalmente, os polissacarídeos sulfatados foram lavados duas vezes com 200 mL de etanol 80% e uma vez com 122 mL de etanol absoluto, sendo levados à estufa a 60°C para secagem, obtendo-se os polissacarídeos sulfatados (Figura 5).

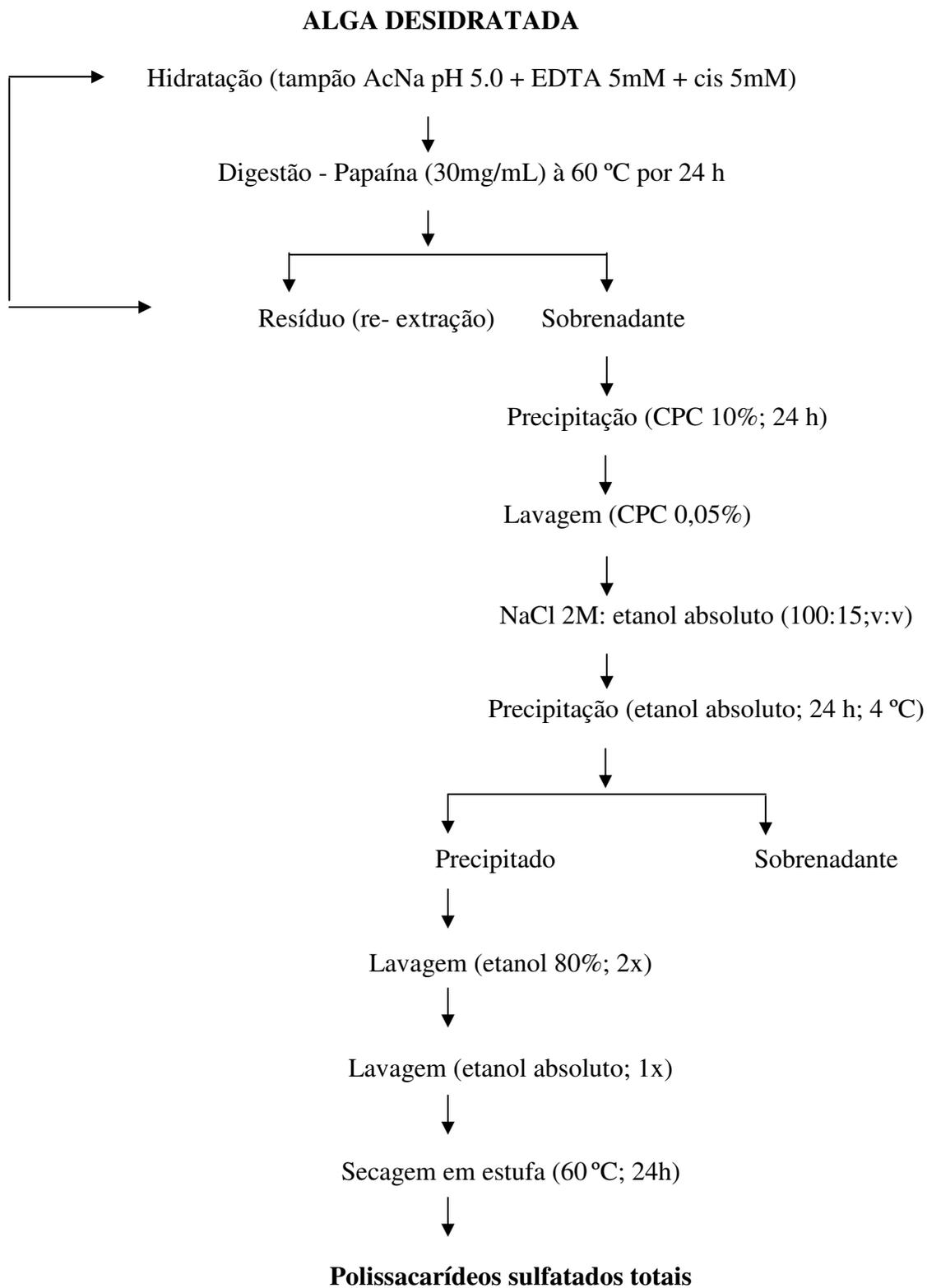


Figura 5 - Fluxograma de extração de polissacarídeos sulfatados.

3.4. Fracionamento dos polissacarídeos sulfatados

O extrato bruto foi submetido a uma cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose. A coluna foi equilibrada com tampão acetato de sódio 0,1M, pH 5,0 + EDTA 5mM + cisteína 5mM e o fluxo mantido em 60mL/h. Em todas as cromatografias, foi aplicada uma amostra de 1 mL de uma solução contendo 1 mg/mL de extrato bruto de polissacarídeos. A eluição da coluna foi realizada, passo a passo, com o tampão de equilíbrio contendo cloreto de sódio na concentração de 0,2 a 2 M. O rendimento foi de 36,2%.

3.5. Atividade citotóxica *in vitro*

3.5.1. Ensaio do MTT

Este ensaio pode ser utilizado para determinar citotoxicidade, proliferação e ativação celular. É uma análise colorimétrica que quantifica indiretamente as células viáveis, baseada na redução do sal 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazolium bromida (MTT), um composto de cor amarela, a formazan, de coloração púrpura, pelos substratos celulares NADH, NADPH e Succinato (MOSSMAN, 1983). No presente trabalho, este ensaio foi utilizado para monitoramento da atividade do polissacarídeo sulfatado isolado de *C. feldmannii* (Cf-PLS) em diferentes linhagens celulares tumorais (HL-60 - leucemia promielocítica, HCT-8 – carcinoma de cólon, SF-295 – glioblastoma e MDA-MB-435 – melanoma).

3.5.1.1. Manutenção das Células

As células foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (75cm², volume de 250mL); o meio de cultura RPMI 1640 foi utilizado, complementando com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos. As células foram incubadas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂, sendo observado o crescimento celular com ajuda de microscópio de inversão a cada 24 horas. Quando necessário, as células eram repicadas em meio de cultura novo, em uma concentração de 0,5-1,0 x 10⁶ células/mL.

3.5.1.2. Procedimento Experimental

As células em suspensão foram plaqueadas em multiplacas de 96 cavidades numa densidade de 3×10^5 células/mL. A substância teste foi incubada durante 72 horas juntamente com a suspensão de células em concentrações que variam de 0,5 a 100 $\mu\text{g/mL}$. Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas (1500 rpm/15 min), e o sobrenadante descartado. Cada cavidade recebeu 200 μL da solução de MTT a 0,5 mg/mL, sendo reincubada por mais 3 horas, em estufa a 37°C e 5% CO₂. Após esse período, as placas foram novamente centrifugadas (3000 rpm/10min), o sobrenadante desprezado e o precipitado ressuspendido em 150 μL de solução salina. Para a quantificação do sal reduzido nas células vivas, as absorvâncias foram lidas com o auxílio do fluorímetro, no comprimento de onda de 550nm.

3.5.1.3. Análise dos Dados

O experimento foi analisado segundo suas médias e respectivos erros-padrão.

3.6. Estudo da atividade antitumoral *in vivo*

3.6.1. Obtenção e manutenção dos animais

Os testes foram realizados utilizando camundongos (*Mus musculus* Swiss) fêmeas pesando entre 25-30g oriundos do biotério central da Universidade Federal do Ceará, mantidos com água e alimento *ad libitum*. O manejo deles procurou seguir todos os princípios éticos, de forma a amenizar ao máximo o sofrimento dos animais. Foi utilizado o tumor Sarcoma 180.

O animal de manutenção foi anestesiado com éter etílico e sacrificado por meio de deslocamento cervical. O procedimento asséptico foi feito com álcool iodado e coletado o líquido ascítico da cavidade abdominal, sendo preparada uma suspensão de células com 5,0 mL de solução de Ringer lactato, 0,2 mL de gentamicina (5 mg/mL) e 0,5 mL do líquido ascítico para posterior contagem das células. Os animais receptores foram inoculados com 2×10^6 células/0,5 mL na região intraperitoneal.

3.6.2. Procedimento experimental

Foram injetadas 2×10^6 células/0,5 mL na região axilar esquerda em 6 grupos de camundongos, cada um com 8 animais. Após 24h de inoculação do tumor, foi iniciado o tratamento durante 7 dias consecutivos, utilizando 10 e 25 mg/Kg/dia dos polissacarídeos, 10mg/Kg/dia dos polissacarídeos associados a 10mg/Kg/dia de 5-Fluorouracil (5-FU), 10 mg/Kg de 5-Fluorouracil para o controle positivo e solução salina para o controle negativo. Todos os grupos foram tratados pela via intraperitoneal. Após 24h do término do tratamento os animais foram sacrificados e retirados os tumores, rins, fígado e baço para pesagem e análise histológica. O percentual de inibição do crescimento tumoral (IT) foi calculado pela fórmula: $IT (\%) = [(A-B)/A] \times 100$, onde A é a média dos pesos dos tumores no grupo controle e B, a média dos pesos dos tumores nos animais tratados.

3.6.3. Análise dos dados.

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média de n animais. Para verificação de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Student Newman Keuls ($p < 0,05$).

3.6.4. Análise morfológica e histopatológica

A técnica usada nessa análise foi a da coloração por hematoxilina e eosina (H/E), que permite diferenciar o citoplasma do núcleo e assim, analisar as estruturas celulares e identificar possíveis alterações que possam estar ocorrendo. Essa análise morfológica e histopatológica pode então fornecer dados para sugerir os efeitos tóxicos causados pela droga.

3.6.4.1. Procedimento experimental

Após o sacrifício dos animais, foram retirados e pesados o fígado, baço, rins e tumor, os quais foram armazenados em formol 10% e em seguida seccionado em pedaços pequenos para posterior preparação das lâminas. O material foi fixado em formol 10% por um período de 24 horas, em seguida desparafinado em xilol por 15 minutos, e desidratado em concentrações crescentes de álcool até 70%, com o mergulho rápido das lâminas, sendo

posteriormente lavadas em água destilada até ser removido todo o álcool. Em seguida, as lâminas foram coradas com hematoxilina 0,1%.

3.6.4.2. Análise dos dados

As lâminas contendo as células coradas foram levadas ao microscópio para avaliação de suas características morfológicas e comparadas ao controle (não-tratadas).

3.6.5. Determinação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos

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

3.6.5.1. Procedimento experimental

Após 24 horas do término do tratamento, o sangue foi coletado do plexo orbital, imediatamente antes do sacrifício dos animais. Em seguida, foram colocados 20 μ L de sangue em 380 μ L de solução de Turk para contagem total de leucócitos em câmara de Neubauer em microscópio ótico. Para a contagem diferencial de leucócitos foram feitas lâminas do sangue, que foram submetidas à contagem em microscópio ótico.

Para análise bioquímica foram utilizados kits da LABTEST® sistemas para diagnóstico, seguindo-se a metodologia descrita por este fabricante.

3.6.5.2. Análise dos dados

Os efeitos nos parâmetros hematológicos e bioquímicos foram avaliados utilizando o programa Prisma versão 4.0 (GraphPad Software). Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média.

3.7. Atividade Imunoestimulatória

3.7.1. Atividade edematogênica

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

3.7.1.1. Procedimento experimental

O volume da pata traseira esquerda de cada animal foi medido usando um pletismômetro antes da injeção do estímulo inflamatório (tempo zero). Em seguida, foi injetado 0,1 ml do estímulo por via sub-plantar nos animais nessa mesma pata. O grupo controle recebeu salina estéril, como controle positivo foi usado a carragenina (300µg/pata) e os grupos do polissacarídeo receberam 500, 1000 e 1500µg/pata (n=6). O volume da pata foi avaliado após 30 minutos, 1, 2, 3 e 4 horas da injeção do polissacarídeo, usando o mesmo pletismômetro. Foram utilizados esses tempos de medição já que o pico do edema induzido pela carragenina ocorre na 3ª hora após a injeção desse estímulo e ela também é um polissacarídeo obtido de alga. O edema foi calculado como a variação de volume, isto é, a diferença entre o volume em um determinado tempo após o estímulo e o volume da pata antes do estímulo inflamatório (tempo zero).

3.7.1.2. Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média de n animais. Para verificação de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls ($p < 0,05$).

3.7.2. Imunização subcutânea

A imunização subcutânea em camundongos foi realizada para avaliar a ação imunoadjuvante e imunoestimulante do polissacarídeo, através da quantificação de anticorpos totais (Ig total) e específicos (IgE, IgG1 e IgG2a) presentes no soro do animal imunizado.

3.7.2.1. Procedimento experimental

Quatro grupos de 8 camundongos *Mus musculus* Swiss foram imunizados subcutaneamente com salina, Cf-PLS (40 mg/kg), ovalbumina (2 mg/kg), ou ovalbumina (2 mg/kg) mais o Cf-PLS (40 mg/kg). Os camundongos tiveram o sangue colhido do plexo retro-orbital para obtenção do soro antes da imunização e após 7, 14 e 21 dias. Os anticorpos totais e específicos foram detectados por reação enzimática através do ensaio de imunoabsorbância (ELISA). A fim de avaliar a capacidade do Cf-PLS de elevar a resposta induzida pela ovalbumina (OVA), anticorpos totais (Ig) contra o grupo imunizado apenas com a OVA ou com a OVA mais o Cf-PLS foram determinados utilizando-se placas contendo 50 µg/poço de OVA. Para avaliar as propriedades imunoestimulantes do Cf-PLS, os anticorpos IgE, IgG1 e IgG2a, contra o grupo imunizado com o Cf-PLS, foram determinados usando placas contendo 50 µg/poço de Cf-PLS. As placas foram incubadas por 1h a 37°C e lavadas com 0,05% de PBS-tween por três vezes. As placas foram em seguida bloqueadas com leite desnatado 5% em 10mM de PBS, pH 7,2 e NaCl 0,9% por 2h a 37°C. Em seguida as placas foram lavadas e adicionou-se 100 µL do soro diluído em PBS e foi re-incubada por 2h a 37°C. As placas foram novamente lavadas com PBS-Tween 0,05% e tratadas com imunoglobulinas conjugadas antimouse rabbit (100 µL/poço, diluição final 1:1000) por 2h à temperatura ambiente. As placas foram então lavadas três vezes com PBS-Tween. A reação foi desenvolvida pela adição de orto-fenilenidiamina seguida de incubação por 20min a 37°C. O resultado da intensidade da coloração foi lido a 450nm.

3.7.2.2. Análise dos dados

As leituras foram analisadas no programa Prisma 4.0 através do teste de análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls ($p < 0,05$).

3.7.3. Ativação de macrófagos *in vitro*

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

Para a obtenção dos macrófagos, os camundongos foram inoculados com 2 mL de tioglicolato 3% envelhecido a fim de estimular os macrófagos periféricos. Três dias depois os animais foram sacrificados por asfixia, com éter etílico em câmara de vidro. Em seguida foi feita assepsia com álcool 70% e a cavidade peritoneal foi lavada com 5 mL de meio de cultura RPMI completo. Após uma leve massagem foi feita uma incisão com bisturi para coleta do líquido com seringas de 3 mL. Posteriormente, as células foram centrifugadas a 1.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o “pellet” de células foi ressuspensão em meio RPMI completo. A contagem de células foi realizada em câmara de Neubauer, e a seguir, as células foram plaqueadas em placa de cultura estéril com 1 mL por poço e colocadas para aderir durante uma hora a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Após esse período o polissacarídeo foi incubado nas concentrações de 1, 10 e 100 µg/mL durante 1h. Como controle negativo, foi utilizado salina e como controle positivo, o zimosan 10 µg/mL. Em seguida a placa foi lavada, para retirada da droga, e adicionado mais 2 mL de meio RPMI completo para uma última incubação de 3h, onde depois foi retirado o sobrenadante utilizado nos testes seguintes. Todo o procedimento foi cuidadosamente elaborado de forma aprotogênica.

3.7.4. Tratamento de Sarcoma-180 com sobrenadante de macrófagos ativados

Este teste busca avaliar a capacidade da substância teste em induzir a ativação de macrófagos em cultura, que irá liberar no seu sobrenadante substâncias como citocinas, como por exemplo, TNF- α e IL-1. Essas substâncias presentes no sobrenadante seriam capazes de ativar outros macrófagos e inibir o crescimento tumoral em camundongos transplantados com Sarcoma-180.

3.7.4.1. Procedimento experimental

Foram injetadas 2×10^6 células/0,5 mL na região axilar esquerda nos grupos de camundongos fêmeas Swiss, cada um com 8 animais. Após 24h de inoculação do tumor, foi

iniciado o tratamento durante 7 dias consecutivos, utilizando 1mL do sobrenadante dos macrófagos ativados com 10 e 100 µg/mL de Cf-PLS ou com zimosan (10 µg/mL) para o controle positivo e solução salina para o controle negativo. Todos os grupos foram tratados por via intraperitoneal. Após 24h do término do tratamento os animais foram sacrificados e retirados os tumores para pesagem. O percentual de inibição do crescimento tumoral (IT) foi calculado pela fórmula: $IT (\%) = [(A-B)/A] \times 100$, onde A é a média dos pesos dos tumores no grupo controle e B, a média dos pesos dos tumores nos animais tratados.

3.7.4.2. Análise dos dados.

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média de n animais. Para verificação de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls ($p < 0,05$).

3.7.5. Migração de neutrófilos

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

3.7.5.1. Procedimento experimental

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

Do líquido colhido, 20µL foram diluídos em 380 µL de solução de Turk (1:20 v/v) e utilizados para contagem total de células em câmara de Neubauer. Para contagem diferencial de células, 80 µL do exsudato foram colocados em citocentrífuga (2800 rpm/ 10 min). Em

seguida, as lâminas foram coradas com corante hematoxilina/eosina (HE). A contagem foi realizada em microscópio óptico, com objetiva de imersão (aumento de 100x). Foram contadas 100 células por lâmina e o número total de neutrófilos foi estimado calculando-se as percentagens com relação ao número total de leucócitos encontrados.

3.7.5.2. Análise dos dados

Os dados foram avaliados através do teste de análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls ($p < 0,05$).

3.7.6. Produção de NO

Devido ao tempo de meia vida do óxido nítrico ser muito curto, a determinação da produção deste radical por macrófagos é mensurada através formação do nitrito (NO^{2-}), um produto de degradação estável e não volátil. A dosagem de nitrito foi realizada pelo método de Griess, no qual o princípio de reação é baseado na formação de um azo composto. Neste método, o nitrito primeiramente reage com a sulfanilamida em meio ácido para formar um composto intermediário, o sal de diazônio. Em seguida, este sal reage com N-naftil-etilenodiamina (NED) formando um composto azo estável de coloração púrpura, podendo assim ser analisado em espectrofotômetro em comprimento de onda de 550 nm (GREEN *et al.*, 1982; SUN *et al.*, 2003).

3.7.6.1. Procedimento experimental

Neste trabalho foi utilizado o seguinte protocolo para a dosagem de nitrito: o reagente de Griess foi preparado pela mistura de duas soluções na proporção 1:1, imediatamente antes do uso. A primeira solução era constituída por N-naftil-etilenodiamino 0,1% (p/v) em ácido orto-fosfórico 5% (v/v) e a outra solução por sulfonamina paminobenzeno 1% (p/v) em ácido fosfórico 5% (v/v) (GREEN *et al.*, 1982). Em uma placa de 96 poços foram colocados 100 μL do sobrenadante dos macrófagos previamente estimulados com salina, zimosan ou Cf-PLS nas concentrações de 1, 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$. Em seguida adicionou-se em cada poço 100 μL do reagente de Griess. Após dez minutos, a absorbância foi medida em 550 nm e comparado com uma curva padrão de NaNO_2 .

3.7.6.2. Análise dos dados

Os dados foram avaliados através do teste de análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls ($p < 0,05$).

3.8. Perfusão de rim isolado

3.8.1. Obtenção e manutenção dos animais

Os testes foram realizados utilizando ratos Wistar adultos e machos, pesando entre 250-300g oriundos do biotério central da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram mantidos em jejum 8 a 12 horas antes dos experimentos, com água *ad libitum*. O manejo deles procurou seguir todos os princípios éticos, de forma a amenizar ao máximo o sofrimento dos animais.

3.8.2. Sistema de perfusão

A técnica utilizada para avaliar os mecanismos de controle da função renal usa um sistema de perfusão de rim isolado com recirculação (FONTELES *et al.*, 1983) com dois subsistemas, um *in situ* e outro em circuito fechado, para perfusão *in vitro*, ambos mantidos à temperatura de 37°C. O sistema utilizado permite a manutenção constante dos parâmetros funcionais renais, com o uso de albumina na solução perfusora, mantendo constantes as substâncias dialisáveis, e com oxigenação adaptada ao próprio sistema (Figura 6).

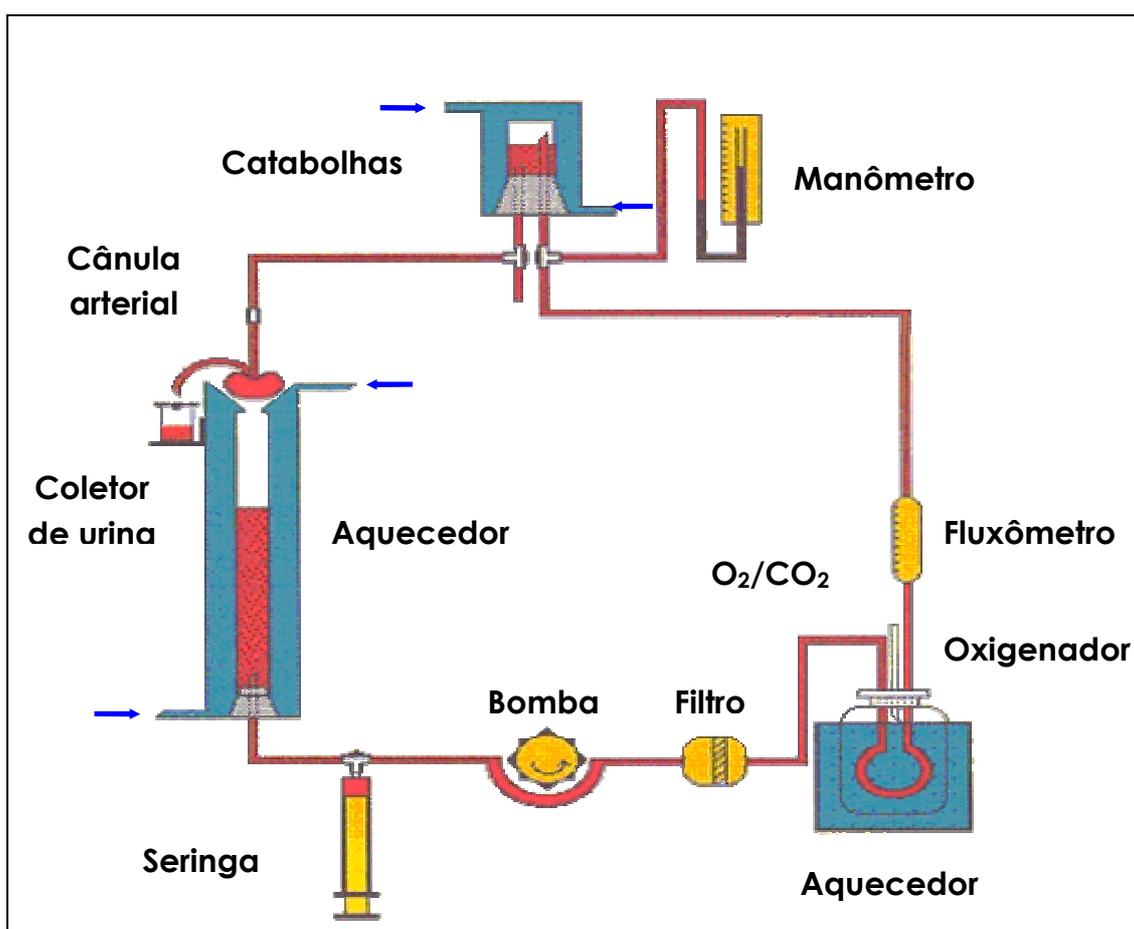


Figura 6: Desenho esquemático do sistema de perfusão de rim isolado (LAFAVET).

3.8.2.1. Calibração do sistema

O sistema foi calibrado sempre antes do início dos experimentos. Foi avaliado em cada uma das bombas a pressão de perfusão (PP) em mmHg, o fluxo urinário (mL/min) e o volume de urina coletado em um minuto (mL/min). Os resultados estão demonstrados nas figuras 7, 8 e 9.

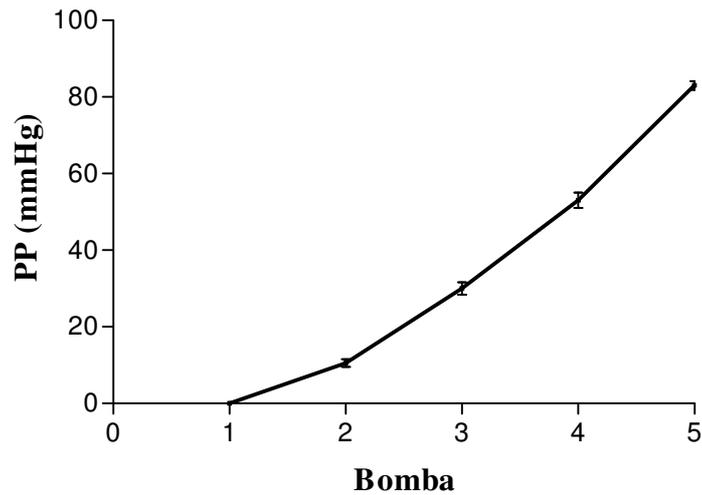


Figura 7: Valores de pressão de perfusão (PP) registrados durante a calibração do sistema (n=6).

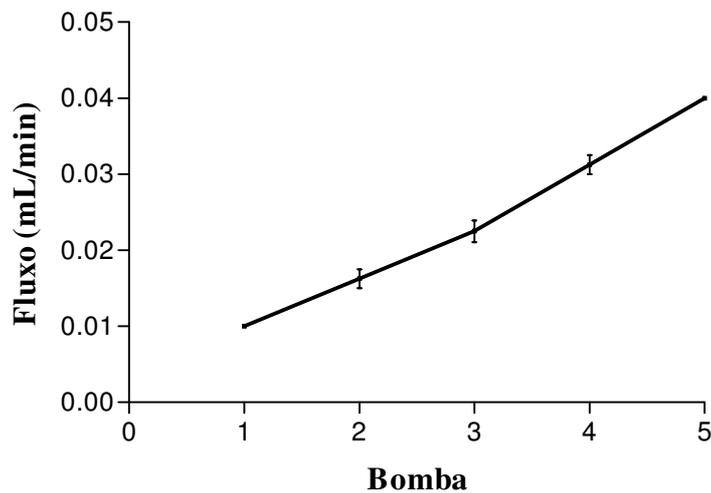


Figura 8: Valores registrados pelo Fluxômetro (L/h) durante a calibração do sistema (n=6).

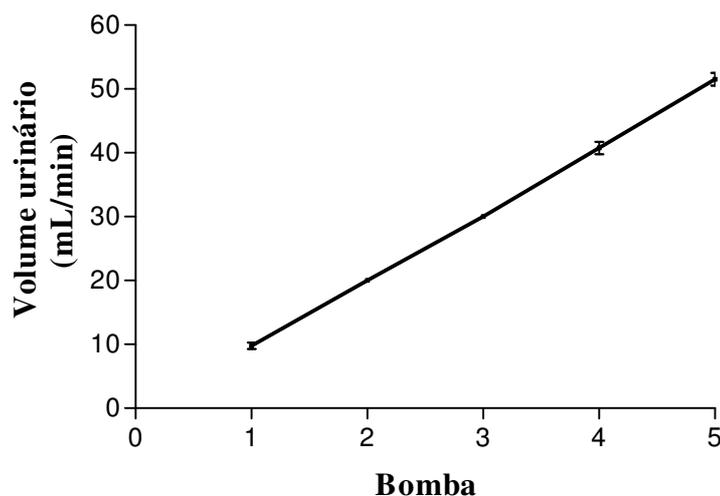


Figura 9: Valores de volume urinário (mL/min) registrados durante a calibração do sistema (n=6).

3.8.2.2. Solução perfusora

A solução perfusora utilizada foi Krebs-Henseleit, contendo 114,0mM de NaCl; 4,96mM de KCl; 1,24mM de KH_2PO_4 ; 0,5mM de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 24,99mM de NaHCO_3 ; 2,10mM de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 3,60mM de glicose, adicionada de albumina a 6g%, e dialisada por 48 horas antes do experimento para retirar substâncias contaminantes como citrato, piruvato e lactato (HANSON & BALLARD, 1968).

3.8.2.3. Técnica cirúrgica

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico na dose 50 mg/Kg. Em seguida a veia femoral foi isolada e foi administrado 100 mg de manitol, um diurético, para facilitar a fixação da cânula ao ureter.

Após assepsia da parede abdominal, foi feita uma incisão mediana e duas incisões perpendiculares à linha alba, para permitir uma melhor observação das estruturas anatômicas.

Em seguida a artéria mesentérica superior foi identificada e dissecada, assim como o ureter e a glândula supra-renal. O rim direito foi desencapsulado e a glândula supra-renal isolada. A cânula arterial renal foi introduzida na artéria mesentérica superior até alcançar a artéria renal, onde foi feita sua fixação (Figura 10).

Logo no início do procedimento cirúrgico, uma parte da solução já oxigenada (40 mL) foi desviada para o sistema de perfusão *in situ*, para poder perfundir o rim ainda *in vivo*, a fim de evitar isquemia ao órgão. O rim foi então transportado para o sistema de perfusão *in vitro*, sem a interrupção do fluxo.

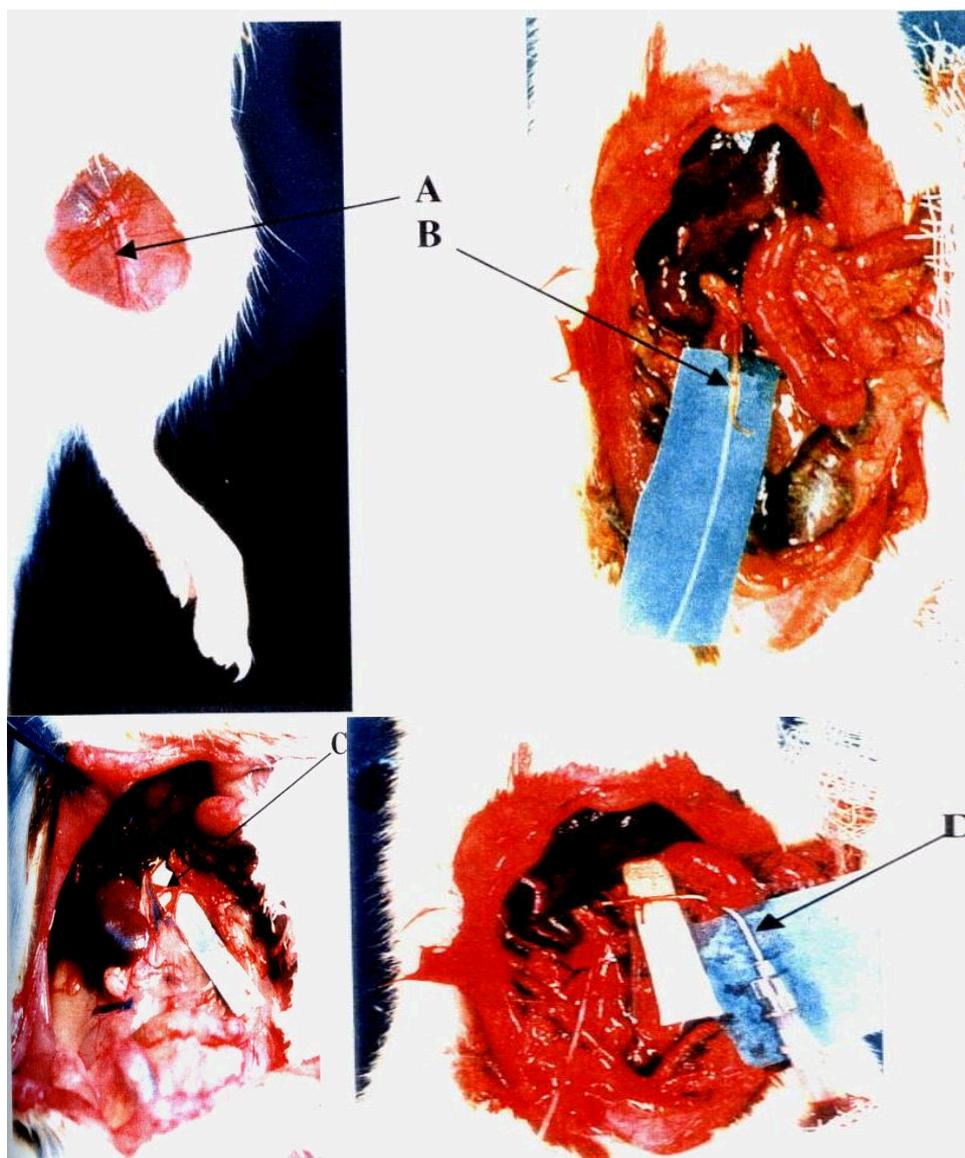


Figura 10: Procedimento cirúrgico para retirada de rim isolado de rato. A: isolamento da artéria femoral; B: isolamento e fixação da cânula ao ureter; C: isolamento das artérias mesentérica e renal; D: cânula fixada à artéria renal (LFAVET-UFC).

3.8.2.4. Procedimento experimental

Os experimentos foram iniciados após a estabilização e adaptação do órgão às novas condições. Os primeiros 30 minutos foram utilizados como controle interno do experimento. Após esse período inicial, adicionou-se Cf-PLS na concentração de 10 µg/mL (n=6 por dose). A cada cinco minutos foram registrados a pressão de perfusão em um manômetro, e o fluxo de perfusão através de um fluxômetro, por um período total de 120 minutos. As amostras de urina e perfusato foram coletadas a cada dez minutos, e em seguida congeladas a -20°C, para posterior dosagem de sódio, potássio, cloreto, inulina e osmolaridade, importantes na determinação dos parâmetros da função renal.

3.8.2.5. Análises bioquímicas

Nas amostras de urina e perfusato foram realizadas dosagens de sódio e potássio pelo método de fotometria de chama. As dosagens de cloreto foram realizadas utilizando o kit de dosagem do fabricante (Labtest). A inulina presente no perfusato e na urina foi determinada por hidrólise direta, conforme Walser *et al.*, 1955; Fonteles *et al.*, 1983, com algumas modificações. A osmolaridade das amostras de urina e de perfusato foi medida através de osmômetro de pressão a vapor. Os testes bioquímicos para determinação de uréia e creatinina foram realizados por técnica enzimático-colorimétrica, de acordo com as recomendações do fabricante (Labtest). Todos os testes bioquímicos foram realizados no Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Ceará e na Unidade de Pesquisas Clínicas.

3.8.2.6. Cálculos de parâmetros funcionais renais

A tabela 2 apresenta as fórmulas utilizadas para determinação dos parâmetros funcionais renais (MARTINEZ-MALDONADO *et al.*, 1978).

Tabela 2: Cálculos para determinação de parâmetros funcionais renais.

<p>1. FU (mL.g⁻¹.min⁻¹) = Fluxo Urinário FU = Peso do volume urinário/ Peso do rim esquerdo x 10</p>
<p>2. PP (mmHg) = Pressão de perfusão * Obtida diretamente através da análise em manômetro de mercúrio.</p>
<p>3. FPR (mL.g⁻¹.min⁻¹) = Fluxo plasmático renal ou fluxo de perfusão * Fluxo registrado a cada 10min/ intervalo de tempo x Peso do rim.</p>
<p>4. RVR (mmHg/mL.g⁻¹.min⁻¹) = Resistência vascular renal RVR = PP (mmHg) / FPR</p>
<p>5. RFG (mL.g⁻¹.min⁻¹) = Ritmo de filtração glomerular RFG = DOU_{in}/ DOP_{in} x FU, sendo DOU_{in} = Densidade ótica da inulina na urina e DOP_{in} = Densidade ótica da inulina no perfusato</p>
<p>6. FNa⁺ (μEq.g⁻¹.min⁻¹) = Sódio filtrado FNa⁺ = RFG x PNa⁺, onde PNa⁺ = Concentração de sódio no perfusato</p>
<p>7. ENa⁺ (μEq.g⁻¹.min⁻¹) = Sódio excretado ENa⁺ = FU x UNa⁺, onde UNa⁺ = Concentração de sódio na urina</p>
<p>8. TNa⁺ (μEq.g⁻¹.min⁻¹) = Sódio transportado TNa⁺ = FNa⁺ - ENa⁺</p>
<p>9. %TNa⁺ = Percentual de sódio transportado %TNa⁺ = TNa⁺ x 100/FNa⁺</p>
<p>10. Cosm (mL.g⁻¹.min⁻¹) = Clearance osmótico Cosm = (U_{osm} / P_{osm}) x FU, onde U_{osm} = Osmolaridade Urinária e P_{osm} = Osmolaridade do perfusato</p>
<p>11. FK⁺ (μEq.g⁻¹.min⁻¹) = Potássio filtrado FK⁺ = RFG x PK⁺, onde PK⁺ = Concentração de potássio no perfusato</p>
<p>12. EK⁺ (μEq.g⁻¹.min⁻¹) = potássio excretado EK⁺ = FU x UK⁺, onde UK⁺ = Concentração de potássio na urina</p>
<p>13. TK⁺ (μEq.g⁻¹.min⁻¹) = potássio transportado TK⁺ = FK⁺ - EK⁺</p>
<p>14. %TK⁺ = Percentual de potássio transportado %TK⁺ = TK⁺ x 100/FK⁺</p>
<p>15. TCl⁻ (μEq.g⁻¹.min⁻¹) = Cloreto transportado TCl⁻ = FCl⁻ - ECl⁻</p>
<p>16. %TCl⁻ = Percentual de cloreto transportado %TCl⁻ = TCl⁻ x 100/FCl⁻</p>

3.8.2.7. Estudo histológico

Ao final de cada experimento foi retirado um fragmento longitudinal do rim direito (perfundido) e do rim esquerdo (não perfundido), os quais foram armazenados em formol 10% para posterior exame histológico. Os fragmentos foram desidratados e diafanizados, e em seguida cortados em espessuras de 5 μ m, para serem feitas as lâminas. Estas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) e analisadas em microscópio ótico. Para controle dos rins perfundidos, foi feita também uma análise destes com apenas solução de Krebs-Henseleit modificada.

3.9. Perfusão de leito vascular isolado

O sistema de perfusão do leito vascular isolado é um método utilizado para avaliar se a substância teste possui alguma atividade diretamente nos vasos sanguíneos.

3.9.1. Procedimento experimental

O experimento seguiu a metodologia descrita por McGregor (1965). Ratos Wistar machos, pesando entre 280-350g foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/Kg). Após terem seus abdomens abertos, a artéria mesentérica superior foi isolada e canulada com uma cânula de polietileno (PE20). O intestino foi separado do leito mesentérico e em seguida o mesentério foi perfundido em sistema aberto (Figura 11), com solução de Krebs-Henseleit, contendo: 114,0mM de NaCl; 4,96mM de KCl; 1,24mM de KH₂PO₄; 0,5mM de MgSO₄.7H₂O; 24,99mM de NaHCO₃; 2,10mM de CaCl₂.2H₂O e 3,60mM de glicose. A solução foi mantida a 37°C e o leito perfundido a um fluxo constante (4 mL/min), enquanto a variação de pressão foi mensurada pela média das pressões de perfusão através de um transdutor conectado ao sistema. As variações na pressão de perfusão foram registradas continuamente por um fisiógrafo quatro-canais. Com isso foi avaliado o efeito vascular do Cf-PLS isolado de *Champia feldmannii* (10 μ g/mL/min; n=6), infundido a uma taxa constante de 0,1mL/min, comparado com a infusão do veículo sozinho.

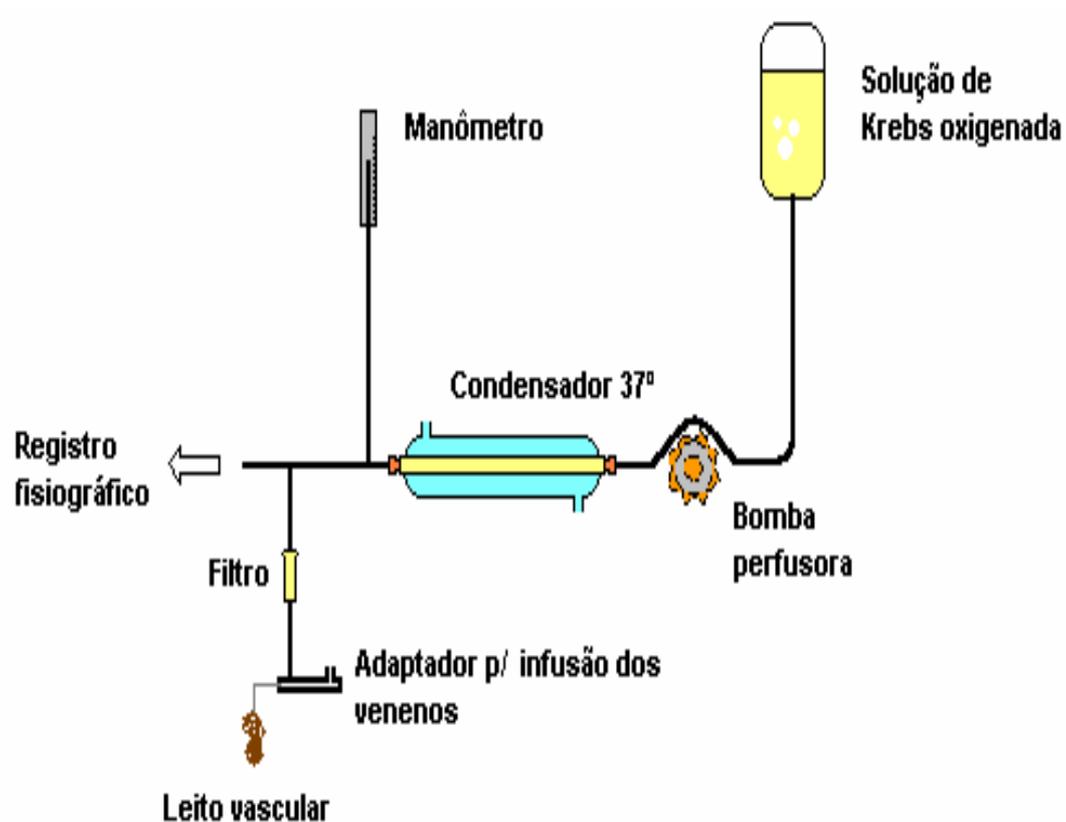


Figura 11: Desenho esquemático do sistema de perfusão de leito vascular mesentérico (LFAVET-UFC).

3.9.2. Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média de seis experimentos em cada grupo. Para verificação de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por teste t de Student ou análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Atividade citotóxica *in vitro*

O polissacarídeo sulfatado isolado de *Champia feldmannii* não apresentou atividade citotóxica *in vitro* contra as células das linhagens tumorais HL-60, HCT-8, MDA- MB435 e SF-295 através do método do MTT até a maior concentração testada (25 µg/mL).

4.2. Estudo da atividade antitumoral *in vivo*

4.2.1. Inibição tumoral

A atividade antitumoral *in vivo* foi determinada utilizando-se o modelo experimental Sarcoma 180. A massa úmida dos tumores dos animais controle (salina) foi de $2,16 \pm 0,21$ g. O grupo controle positivo, tratado com o 5-Fluorouracil na dose de 10 mg/Kg/dia, apresentou a média da massa úmida dos tumores em $1,11 \pm 0,22$ g. Nos animais tratados com Cf-PLS, as massas foram de $1,10 \pm 0,10$ g para a dose de 25 mg/Kg/dia e de $1,12 \pm 0,18$ g para os animais tratados com a menor dose, de 10 mg/Kg/dia. A massa do tumor foi de $0,68 \pm 0,17$ g no grupo onde houve uma combinação de Cf-PLS com o 5-Fluorouracil, ambos na dose de 10 mg/Kg/dia. Todas essas inibições foram significativas ($p < 0,05$). Nos animais tratados com o 5-Fluorouracil a inibição tumoral foi de 48,66%. Os percentuais de inibição tumoral para o Cf-PLS foram de 48,16% e 48,62% nas doses de 10 e 25 mg/Kg/dia respectivamente. Já no tratamento do Cf-PLS combinado com o 5-Fluorouracil, ambos na dose de 10 mg/Kg/dia, o percentual de inibição foi de 68,32% (Figura 12).

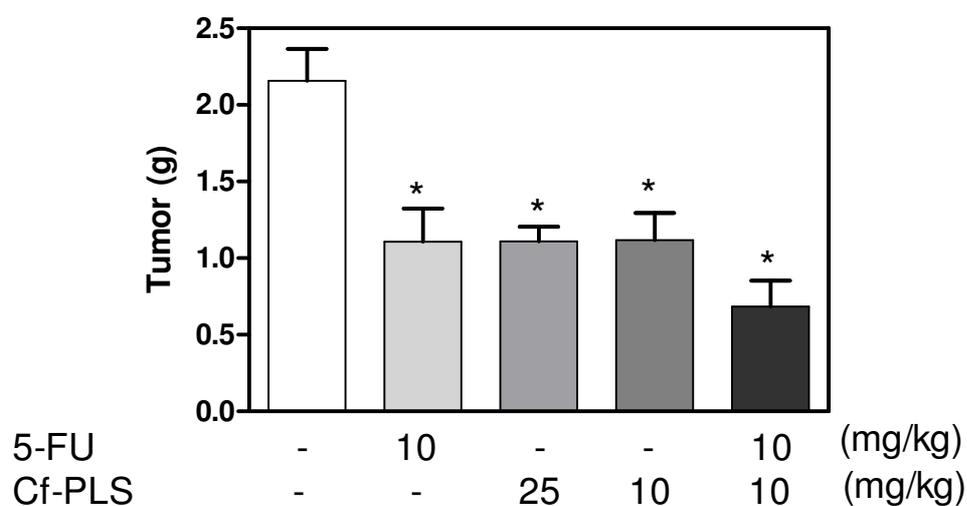


Figura 12 - Efeito do polissacarídeo sulfatado isolado da alga *Champia feldmannii* (Cf-PLS) sobre a massa tumoral de camundongos transplantados com Sarcoma 180. O controle negativo foi tratado com o veículo para diluir a droga (salina). O 5-Fluorouracil (10 mg/Kg/dia) foi usado como controle positivo (5-FU). Os dados apresentam a média \pm E.P.M. * ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo salina por ANOVA seguido por Newman-Keuls ($n = 8$).

4.2.2. Análise morfológica e histopatológica

Após o tratamento com Cf-PLS, os pesos dos rins e fígados não mostraram diferenças significantes em nenhuma das doses utilizadas quando comparados com o grupo controle, enquanto os pesos dos baços dos animais tratados com Cf-PLS nas duas doses (10 e 25 mg/Kg/dia) mostraram um aumento percentual significativo, de 91,7% e 105% respectivamente ($p < 0,05$) (Tabela 3).

As análises histopatológicas dos tumores retirados de camundongos tanto do grupo dos animais com o tumor tratados com salina, como dos outros grupos analisados mostraram neoplasia maligna constituída por células redondas e ovaladas, pleomórficas, com anisocariose e bi-nucleação em escasso estroma. Há áreas de necrose de coagulação nos grupos tratados com Cf-PLS e no caso do grupo Cf-PLS combinado com o 5-Fluorouracil houve invasão celular (Figura 13).

As análises histopatológicas dos fígados revelaram a presença de congestão portal e da veia centrolobular no grupo tratado com o 5-FU, além de hiperplasia das células de Kupffer e intensa tumefação dos hepatócitos, com focos discretos de esteatose em microgotas. Nos grupos tratados com Cf-PLS, houve a presença de alterações passíveis de reversão representadas por tumefação dos hepatócitos, hiperplasia das células de Kupffer, focos inflamatórios e algumas raras áreas de hemorragias. Entretanto, essas alterações foram similares ao do grupo controle e são consideradas reversíveis (Figura 14).

Com relação aos rins, as análises demonstraram moderada tumefação do epitélio tubular, glomérulos preservados e evidenciação dos capilares dos glomérulos no grupo controle. Já nos grupos Cf-PLS, houve hemorragia glomerular e tubular na menor dose, e focos de necrose tubular aguda na maior dose, além de cilindrohialino. A hemorragia também foi encontrada nos grupos tratados com a combinação de Cf-PLS com o 5-FU e no grupo tratado com o 5-FU isolado. Essas alterações, entretanto, são passíveis de reversão (Figura 15).

Nas análises dos baços, os folículos linfóides estavam evidentes e haviam megacariócitos ao longo da amostra no grupo com tumor tratado com salina. O grupo tratado com 5-FU apresentou baços de tamanho menor que os do controle negativo e, nos grupos tratados com Cf-PLS, o tamanho dos baços estava aumentado. Na dose de 25 mg/Kg/dia os megacariócitos estavam em maior número e, por vezes, em agregados (Figura 16).

Tabela 3 - Efeito do polissacarídeo sulfatado isolado da alga *Champia feldmannii* (Cf-PLS) em camundongos transplantados com tumor Sarcoma-180.

	Droga	Dose (mg/kg/dia)	Fígado (g/100g peso corpóreo)	Baço (g/100g peso corpóreo)	Rins (g/100g peso corpóreo)	n
Animais saudáveis	Salina	-	4,59 ± 0,19	0,18 ± 0,03	1,46 ± 0,05	
Animais transplantados com tumor S180	Salina	-	5,10 ± 0,53	0,60 ± 0,29 ^a	1,02 ± 0,04	16
	5-FU	10	5,14 ± 0,66	0,68 ± 0,31 ^a	1,06 ± 0,31	8
	Cf-PLS	25	5,65 ± 0,14	1,23 ± 0,09 ^{a,b}	1,13 ± 0,03	8
	Cf-PLS	10	4,62 ± 0,32	1,15 ± 0,36 ^{a,b}	1,21 ± 0,15	8
	Cf-PLS + 5-FU	10	4,80 ± 0,33	0,71 ± 0,15 ^a	1,05 ± 0,15	8

Dados apresentam a média ± E.P.M. a, (p<0,05) quando comparado com o grupo de animais saudáveis por ANOVA seguido por Newman-Keuls. b, (p<0,05) quando comparado com animais transplantados com o tumor e tratados com salina por ANOVA seguido por Newman-Keuls.

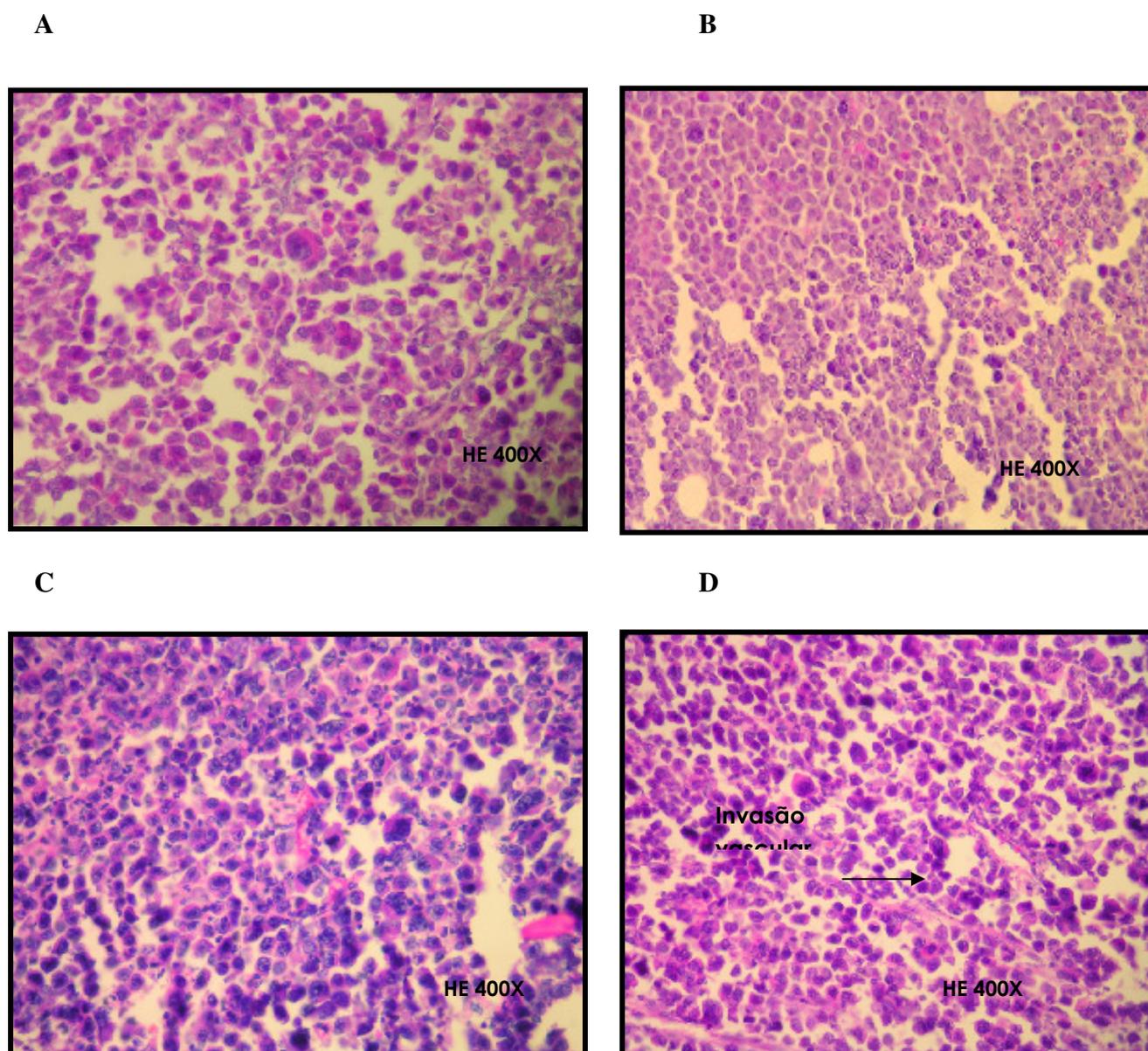


Figura 13 - Microfotografias de cortes histológicos (400X) de tumores de camundongos transplantados com células tumorais de Sarcoma 180. A- grupo controle (salina); B- 5-FU (10 mg/Kg/dia); C- Cf-PLS (10 mg/Kg/dia); D- Cf-PLS + 5-FU (10 mg/Kg/dia).

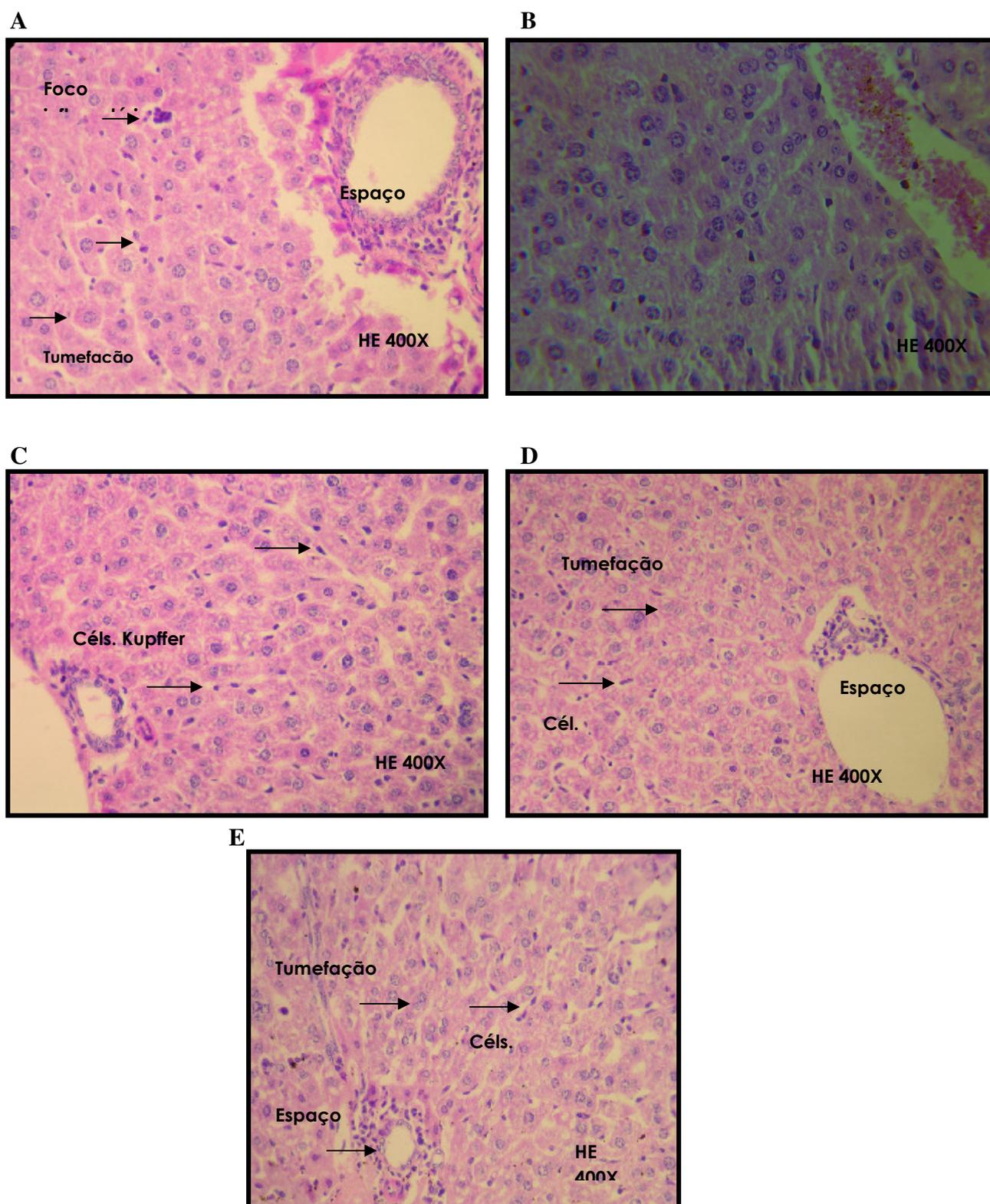


Figura 14 - Microfotografias de cortes histológicos (400X) de fígados de camundongos transplantados com células tumorais de Sarcoma 180. A- grupo controle (salina); B- 5-FU (10 mg/Kg/dia); C- Cf-PLS (10 mg/Kg/dia); D- Cf-PLS + 5-FU (10 mg/Kg/dia); E- Cf-PLS (25 mg/Kg/dia).

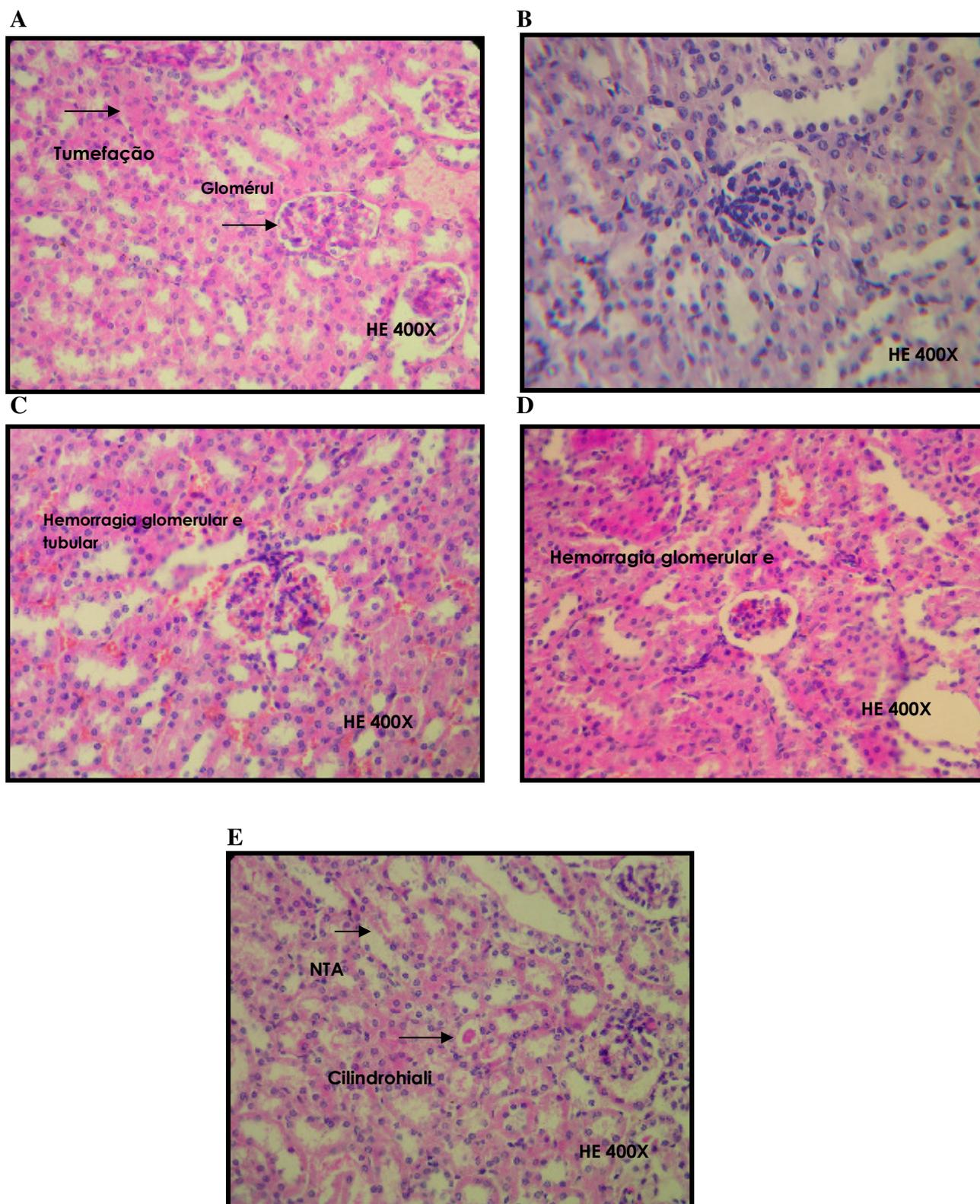


Figura 15 - Microfotografias de cortes histológicos (400X) de rins de camundongos transplantados com células tumorais de Sarcoma 180. A- grupo controle (salina); B- 5-FU (10 mg/Kg/dia); C- Cf-PLS (10 mg/Kg/dia); D- Cf-PLS + 5-FU (10 mg/Kg/dia); E- Cf-PLS (25 mg/Kg/dia).

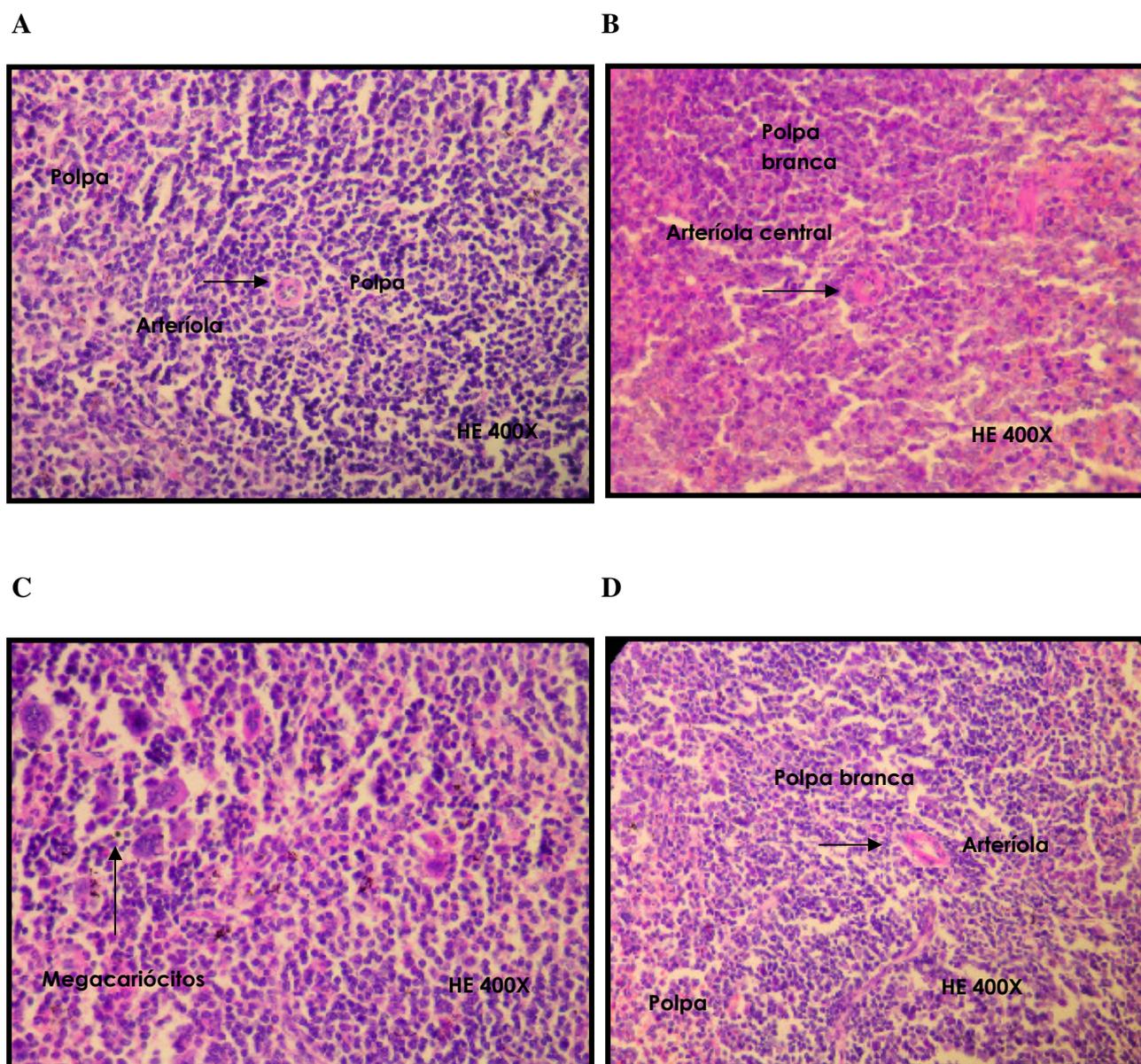


Figura 16 - Microfotografias de cortes histológicos (400X) de baços de camundongos transplantados com células tumorais de Sarcoma 180. A- grupo controle (salina); B- 5-FU (10 mg/Kg/dia); C- Cf-PLS (25 mg/Kg/dia); D- Cf-PLS + 5-FU (10 mg/Kg/dia).

4.2.3. Determinação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos

Foi realizada a análise bioquímica do sangue dos camundongos transplantados com o tumor Sarcoma 180 e observou-se que os animais tratados com Cf-PLS nas duas doses, os animais tratados com o 5-FU e os do tratamento combinado Cf-PLS + 5-FU não apresentaram alterações nos níveis séricos dos indicadores de função renal analisados, nesse caso, creatinina e uréia, em relação ao grupo controle. Com relação aos níveis séricos da enzima hepática alanina aminotransferase (ALT), também não houve nenhuma alteração significativa em nenhum dos grupos analisados (Tabela 4).

A partir da análise hematológica (Tabela 5), observou-se que o número de leucócitos totais foi fortemente diminuído no grupo tratado com o 5-FU (10mg/Kg/dia) quando comparado com o grupo controle experimental.

Os animais tratados com Cf-PLS em ambas as doses de 10 e 25mg/Kg/dia apresentaram um expressivo aumento no número de leucócitos totais em relação ao grupo tratado com o 5-FU (10mg/Kg/dia). Esta leucopenia causada pelo quimioterápico é revertida quando este é administrado juntamente com Cf-PLS.

Observa-se que o número de linfócitos nos animais tratados com apenas salina e nos animais tratados com o 5-FU diminui significativamente em relação aos animais saudáveis, enquanto o número de neutrófilos aumenta. O tratamento com Cf-PLS também normalizou este quadro.

Tabela 4- Efeito do polissacarídeo sulfatado isolado da alga *Champia feldmannii* (Cf-PLS) sobre os parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos transplantados com tumor S180. ALT = Alanina aminotransferase.

	Substância	Dose (mg/kg/dia)	Creatinina (mg/dL)	Urea (mg/dL)	ALT (UI/L)
Animais saudáveis	Salina	-	0,14 ± 0,02	34,10 ± 6,20	52,10 ± 9,30
	Salina	-	0,09 ± 0,01	32,83 ± 2,32	33,50 ± 4,08
Animais transplantados com S180	5-FU	10	0,07 ± 0,01	32,94 ± 2,55	27,70 ± 1,63
	Cf-PLS	25	0,06 ± 0,01	32,50 ± 2,48	27,48 ± 2,77
	Cf-PLS	10	0,07 ± 0,03	28,50 ± 1,32	30,25 ± 5,57
	Cf-PLS + 5-FU	10 + 10	0,07 ± 0,01	34,75 ± 3,68	28,50 ± 2,90
	Cf-PLS	10	0,07 ± 0,03	28,50 ± 1,32	30,25 ± 5,57

Os dados correspondem à média ± E.P.M. de cinco animais.

Tabela 5 - Efeito do polissacarídeo sulfatado isolado da alga *Champia feldmannii* (Cf-PLS) sobre as alterações hematológicas de sangue periférico de camundongo transplantado com tumor S180.

	Substância	Dose (mg/kg/dia)	Leucócitos totais (10 ³ cel./μL)	Contagem diferencial (%)			
				Linfócitos	Neutrófilo	Monócito	Eosinófilo
Animais saudáveis	Salina	-	5,66 ± 0,52	67,8	26,2	5,3	0,7
	Salina	-	8,18 ± 0,53	43,5 ^c	51,4 ^c	4,2	0,9
Animais transplantados com S180	5-FU	10	3,59 ± 0,29 ^a	53,9 ^c	38,7 ^c	6,1	1,3
	Cf-PLS	25	12,03 ± 1,52 ^b	68,0	22,2	8,8	0,8
	Cf-PLS	10	7,28 ± 0,55 ^b	69,0	23,4	6,8	0,8
	Cf-PLS	10 + 10	6,18 ± 1,36 ^b	69,2	25,2	4,8	0,6
	+ 5-FU						

a, $p < 0,05$ para os leucócitos totais comparados com o grupo salina com tumor. b, $p < 0,05$ para os leucócitos totais comparados com o grupo 5-FU. c, $p < 0,05$ para a contagem diferencial comparado com os animais saudáveis por ANOVA seguido por Bonferroni. Os dados correspondem à média ± E.P.M. de cinco animais.

4.3. Atividade imunoestimulatória

4.3.1. Atividade edematogênica

O teste do edema de pata foi baseado na capacidade da substância teste de induzir aumento de volume na pata traseira do animal (edema). Os resultados revelaram que a administração de Cf-PLS é capaz de causar formação de edema em ratos a partir da menor dose utilizada (500 µg/pata), de forma dose-dependente ($p < 0,05$). O seu pico de ação acontece após a 2ª hora e começa a diminuir a partir da 3ª hora após a sua administração. O controle positivo utilizado, a carragenina, tem o seu pico de ação a partir da 3ª hora (Figura 17).

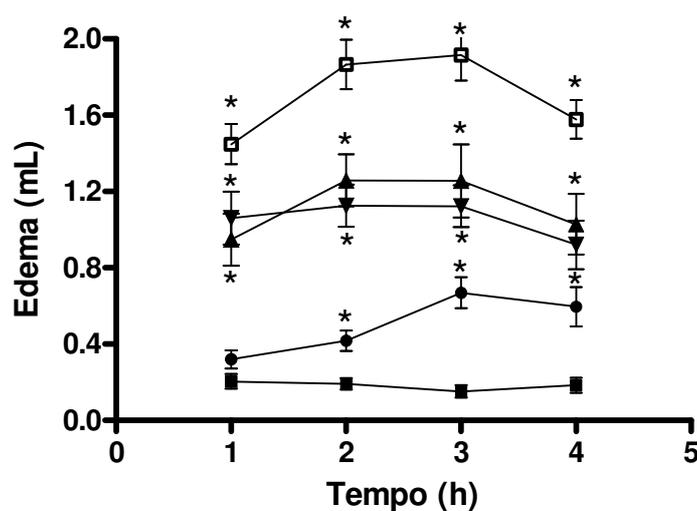
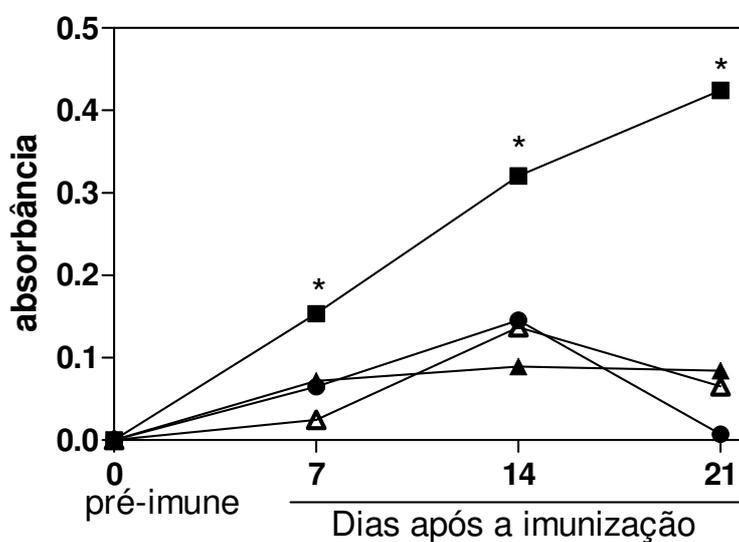


Figura 17 - Efeito do polissacarídeo sulfatado isolado da alga *Champia feldmannii* (Cf-PLS) sobre a formação de edema em ratos. O controle negativo foi tratado com salina estéril (■), enquanto a carragenina foi usada como controle positivo na dose de 300 µg/pata (●). Cf-PLS foi administrado nas doses de 500 µg/pata (▼), 1000 µg/pata (▲) e 1500 µg/pata (□). Os dados apresentam a média ± E.P.M. * ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo salina por ANOVA seguido por Newman-Keuls.

4.3.2. Imunização subcutânea

A fim de investigar os efeitos de Cf-PLS na resposta imune de camundongos imunizados com Cf-PLS ou OVA, foram determinados os anticorpos totais e específicos presentes no soro dos animais através do teste ELISA. Os resultados estão mostrados na Figura 18. O tratamento com Cf-PLS aumentou a produção de anticorpos específicos, observado com o aumento do Ig total ($p < 0,05$). Entretanto, a produção de IgE, Ig1 e Ig2a não foi modificada em animais tratados com Cf-PLS (Figura 18A). Além disso, Cf-PLS aumentou significativamente a produção de anticorpos totais específicos contra OVA no soro de animais tratados na dose de 40 mg/Kg, com relação ao grupo controle ($p < 0,05$, Figura 18B).

A



B

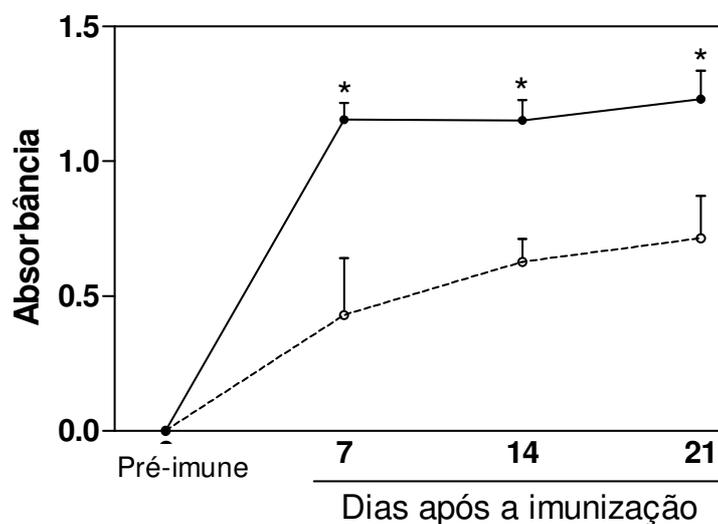


Figura 18 – A - Efeito do polissacarídeo sulfatado isolado de *Champia feldmannii* (Cf-PLS) na produção de anticorpos Ig total (■), IgE (●), IgG1 (▲) and IG2a (Δ). Os camundongos foram imunizados subcutaneamente com Cf-PLS (40 mg/kg). B – Efeito de Cf-PLS na produção de anticorpos específicos contra a ovalbumina (OVA). Os camundongos foram imunizados subcutaneamente com OVA (2 mg/kg, ○) ou OVA (2 mg/kg) + Cf-PLS (40 mg/kg, ●). O soro foi coletado antes da imunização e após 7, 14 e 21 dias após a imunização. Os anticorpos foram detectados por ELISA. Os dados apresentam a média \pm E.P.M. * ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo salina por ANOVA seguido por Newman-Keuls.

4.3.3. Tratamento de Sarcoma 180 com sobrenadante de macrófagos ativados

A fim de investigar os efeitos do sobrenadante de macrófagos ativados com Cf-PLS na inibição tumoral, 1 mL do sobrenadante foi administrado na cavidade peritoneal de camundongos contendo o tumor Sarcoma 180, durante 7 dias consecutivos. O sobrenadante de macrófagos incubados com Cf-PLS nas doses de 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$ não foi capaz de inibir significativamente o crescimento do tumor Sarcoma 180 em camundongos. O mesmo foi observado com o controle positivo utilizado, o zimosan (Figura 19).

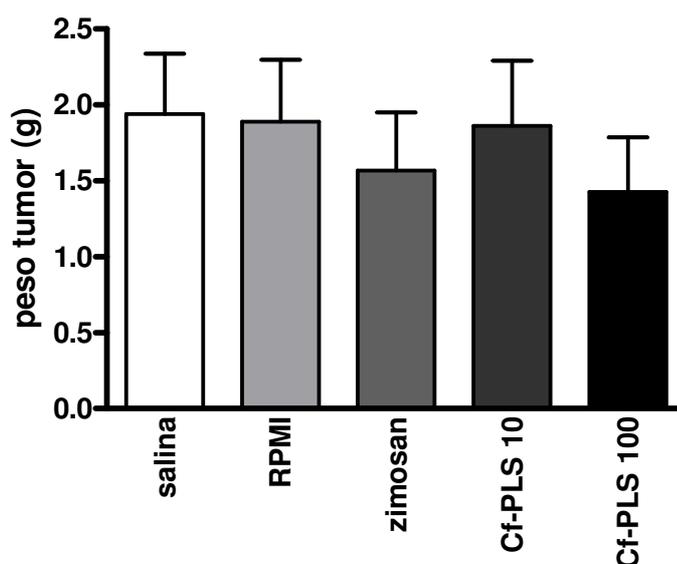


Figura 19 – Efeito do polissacarídeo sulfatado isolado da alga *Champia feldmannii* (Cf-PLS) sobre o tumor Sarcoma 180. O sobrenadante de macrófagos incubados com Cf-PLS (10, 100 $\mu\text{g/mL}$) foi injetado na cavidade peritoneal de camundongos contendo o tumor S-180. Salina e meio RPMI foram usados como controle negativo e zimosan como controle positivo. Os dados apresentam a média \pm E.P.M. de 6 animais.

4.3.4. Migração de neutrófilos

Avaliou-se o efeito do sobrenadante de macrófagos incubados com Cf-PLS na indução da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos. Os resultados demonstraram que o número de neutrófilos foi significativamente aumentado nos grupos de Cf-PLS, tanto na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ ($46,5 \times 10^4$ células/mL), como na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ ($121,5 \times 10^4$ células/mL), quando comparado com o grupo salina ($7,2 \times 10^4$ cell/mL). Este aumento na indução da migração também foi significativo com relação ao grupo controle positivo ($31,2 \times 10^4$ células/mL). Os dados estão representados na Figura 20.

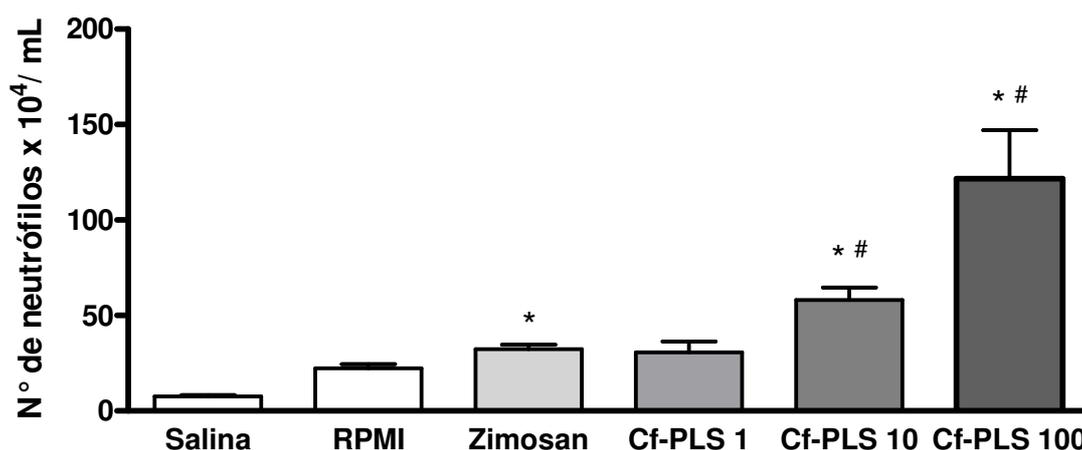


Figura 20 – Efeito do polissacarídeo sulfatado isolado da alga *Champia feldmannii* (Cf-PLS) sobre a migração de neutrófilos. O sobrenadante de macrófagos incubados com Cf-PLS (1, 10, 100 $\mu\text{g/mL}$) foi injetado na cavidade peritoneal de camundongos e em seguida foi feita a contagem do número de neutrófilos. Salina e meio RPMI foram usados como controle negativo e zimosan (10 $\mu\text{g/mL}$) como controle positivo. Os dados apresentam a média \pm E.P.M. * ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo salina e # ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo zimosan, por ANOVA seguido por Newman-Keuls.

4.3.5. Produção de NO

Foi avaliado o efeito de Cf-PLS na ativação de macrófagos, induzindo a liberação de NO no seu sobrenadante. Os resultados mostraram que não houve liberação de NO pelos macrófagos incubados com Cf-PLS no período e dose testados. O mesmo aconteceu com o controle positivo utilizado, zimosan, nas mesmas concentrações.

4.4. Perfusão de rim isolado

O experimento da perfusão no rim isolado de ratos foi realizado para avaliar os efeitos renais de Cf-PLS. No grupo tratado com o polissacarídeo (10 μ g/mL) foi observado aumento da pressão de perfusão ($_{PP}Cf-PLS_{30} = 98,5 \pm 3,3$; $_{PP}Cf-PLS_{90} = 134,1 \pm 9,5^*$; $_{PP}Cf-PLS_{120} = 150,2 \pm 10,1^*$ mmHg), da resistência vascular renal ($_{RVR}Cf-PLS_{30} = 3,6 \pm 0,3$; $_{RVR}Cf-PLS_{120} = 7,3 \pm 1,7^*$ mmHg/mL/g/min), do fluxo urinário ($_{FU}Cf-PLS_{30} = 0,15 \pm 0,01$; $_{FU}Cf-PLS_{90} = 0,28 \pm 0,03^*$; $_{FU}Cf-PLS_{120} = 0,42 \pm 0,03^*$ mL/g/min) e do ritmo de filtração glomerular ($_{RFG}Cf-PLS_{30} = 0,5 \pm 0,3$; $_{RFG}Cf-PLS_{90} = 0,95 \pm 1,1^*$; $_{RFG}Cf-PLS_{120} = 1,25 \pm 1,4^*$ mL/min/g). Houve aumento significativo da excreção de sódio, cloreto e potássio nos tempos de 90 e 120 minutos ($p < 0,05$). Não foi observada nenhuma alteração dos percentuais de transportes totais ou tubular proximais de sódio, cloreto e potássio ($p > 0,05$). Os resultados se encontram nas Figuras 21 a 33.

Com relação às análises histopatológicas, os rins tratados com Cf-PLS apresentaram uma deposição protéica moderada nos túbulos renais; nos glomérulos, houve discreta deposição de material protéica (Figura 34). Não foi visto nenhuma alteração nos interstícios ou nos vasos das lâminas observadas.

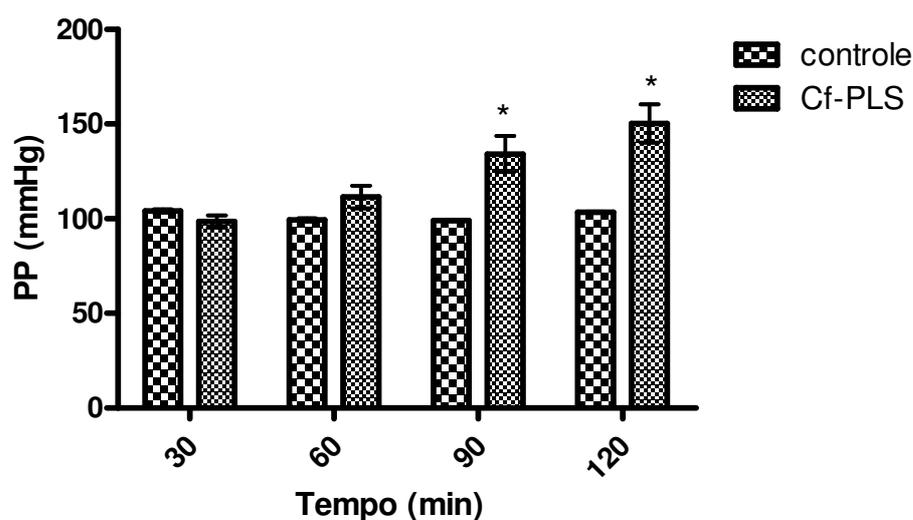


Figura 21 – Efeitos do polissacarídeo sulfatado isolado da alga *Champia feldmannii* (Cf-PLS) na Pressão de Perfusão (PP) em rim isolado. Cf-PLS foi adicionado ao sistema de perfusão de rim isolado na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$. Os dados apresentam a média \pm E.P.M. * ($p < 0,05$) quando comparado com o controle por ANOVA seguido por Bonferroni.

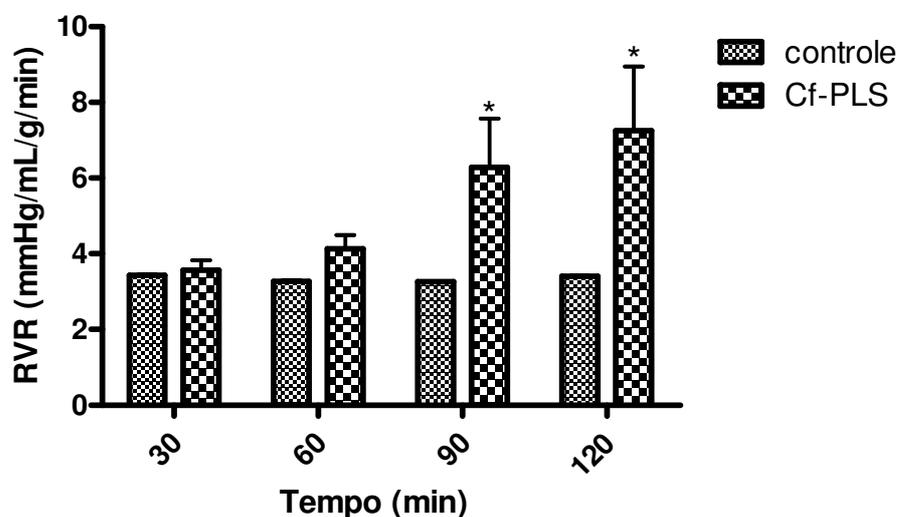


Figura 22 – Efeitos do polissacarídeo sulfatado isolado da alga *Champia feldmannii* (Cf-PLS) na Resistência Vascular Renal (RVR) em rim isolado. Cf-PLS foi adicionado ao sistema de perfusão de rim isolado na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$. Os dados apresentam a média \pm E.P.M. * ($p < 0,05$) quando comparado com o controle por ANOVA seguido por Bonferroni.

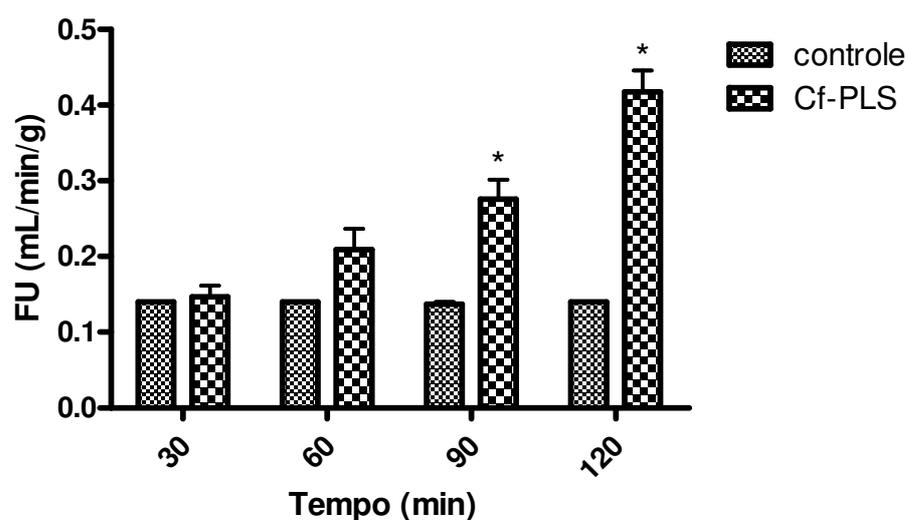


Figura 23 – Efeitos do polissacarídeo sulfatado isolado da alga *Champia feldmannii* (Cf-PLS) no Fluxo Urinário (FU) em rim isolado. Cf-PLS foi adicionado ao sistema de perfusão de rim isolado na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$. Os dados apresentam a média \pm E.P.M. * ($p < 0,05$) quando comparado com o controle por ANOVA seguido por Bonferroni.

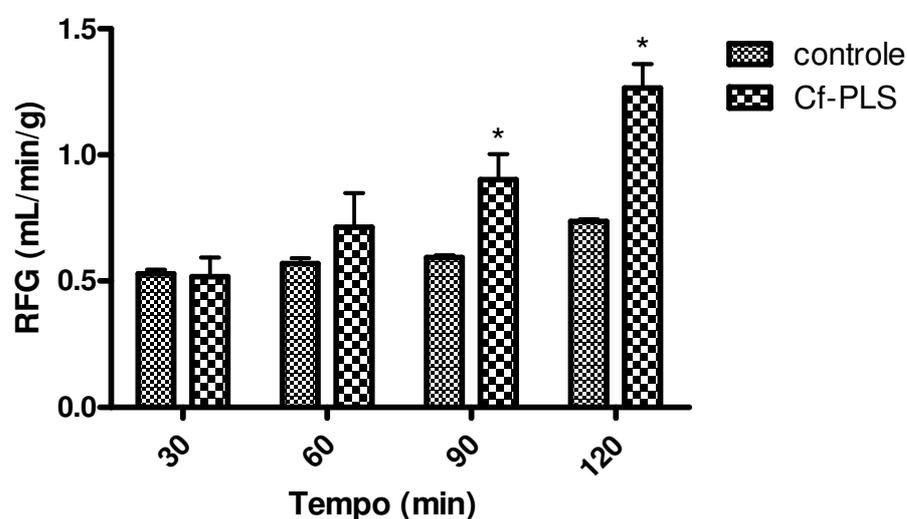


Figura 24 – Efeitos do polissacarídeo sulfatado isolado da alga *Champia feldmannii* (Cf-PLS) no Ritmo de Filtração Glomerular (RFG) em rim isolado. Cf-PLS foi adicionado ao sistema de perfusão de rim isolado na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$. Os dados apresentam a média \pm E.P.M. * ($p < 0,05$) quando comparado com o controle por ANOVA seguido por Bonferroni.

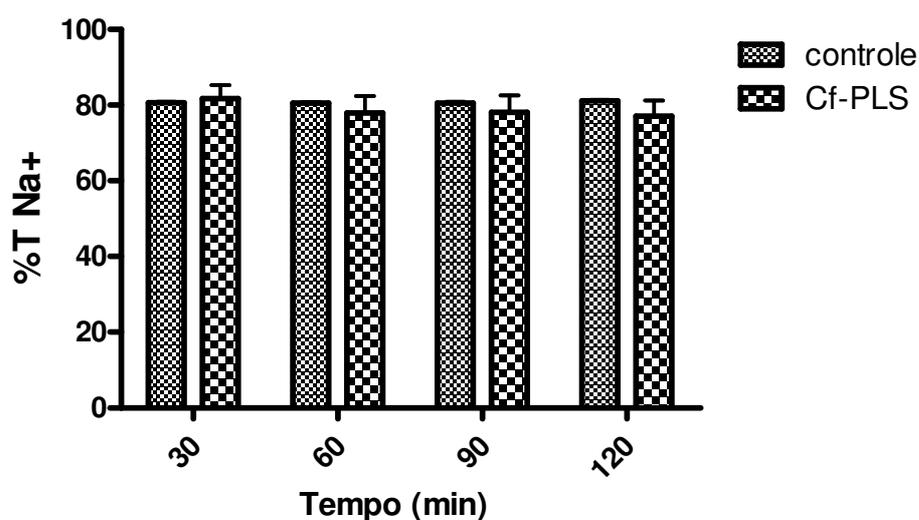


Figura 25 – Efeitos do polissacarídeo sulfatado isolado da alga *Champia feldmannii* (Cf-PLS) na Porcentagem de Transporte Tubular de Sódio (%T Na⁺) em rim isolado. Cf-PLS foi adicionado ao sistema de perfusão de rim isolado na concentração de 10 µg/mL. Os dados apresentam a média ± E.P.M.

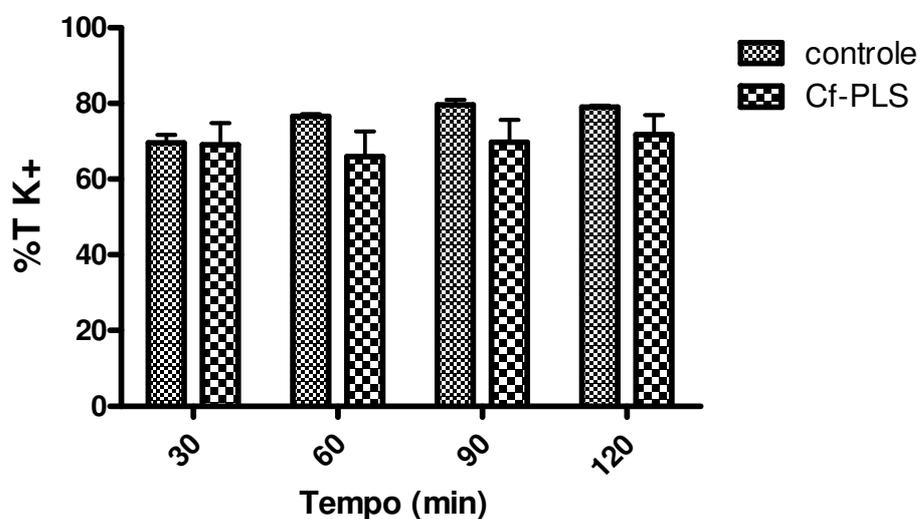


Figura 26 – Efeitos do polissacarídeo sulfatado isolado da alga *Champia feldmannii* (Cf-PLS) na Porcentagem de Transporte Tubular de Potássio (%T K⁺) em rim isolado. Cf-PLS foi adicionado ao sistema de perfusão de rim isolado na concentração de 10 µg/mL. Os dados apresentam a média ± E.P.M.

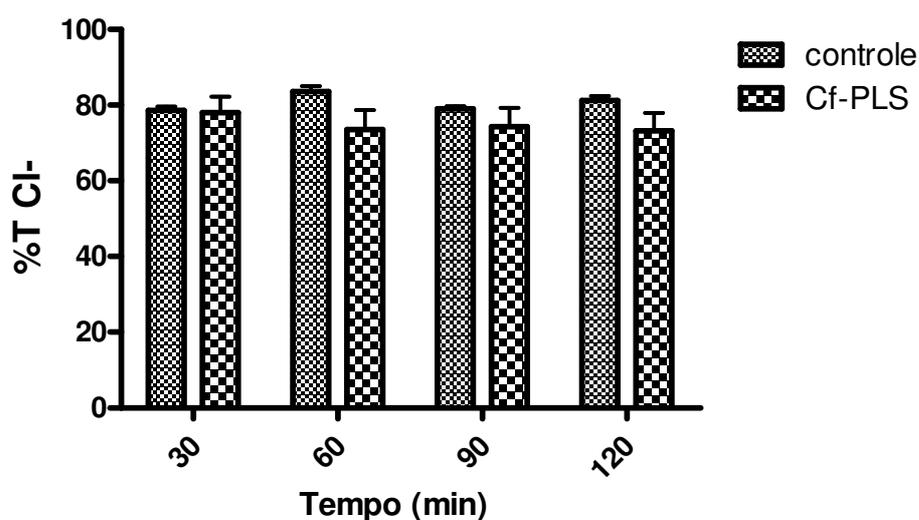


Figura 27 – Efeitos do polissacarídeo sulfatado isolado da alga *Champia feldmannii* (Cf-PLS) na Porcentagem de Transporte Tubular de Cloreto (%T Cl⁻) em rim isolado. Cf-PLS foi adicionado ao sistema de perfusão de rim isolado na concentração de 10 µg/mL. Os dados apresentam a média ± E.P.M.

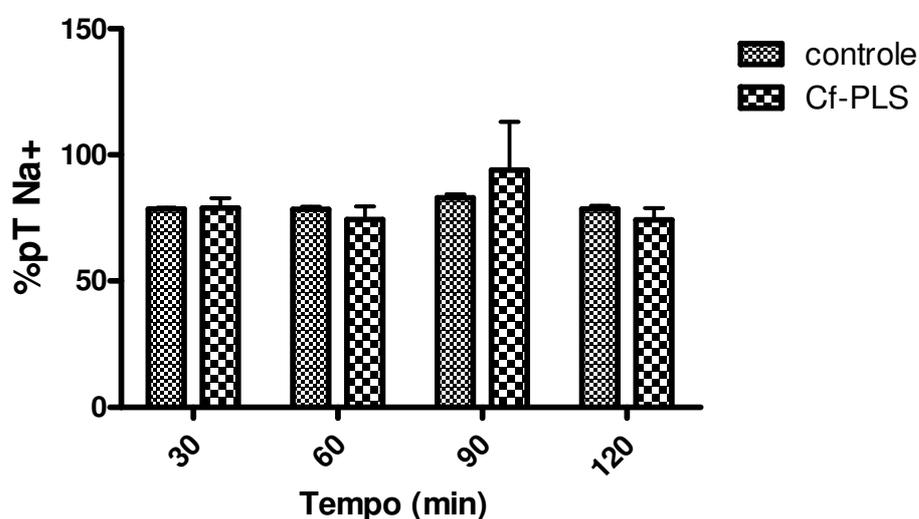


Figura 28 – Efeitos do polissacarídeo sulfatado isolado da alga *Champia feldmannii* (Cf-PLS) na Porcentagem de Transporte Tubular Proximal de Sódio (%pT Na⁺) em rim isolado. Cf-PLS foi adicionado ao sistema de perfusão de rim isolado na concentração de 10 µg/mL. Os dados apresentam a média ± E.P.M.

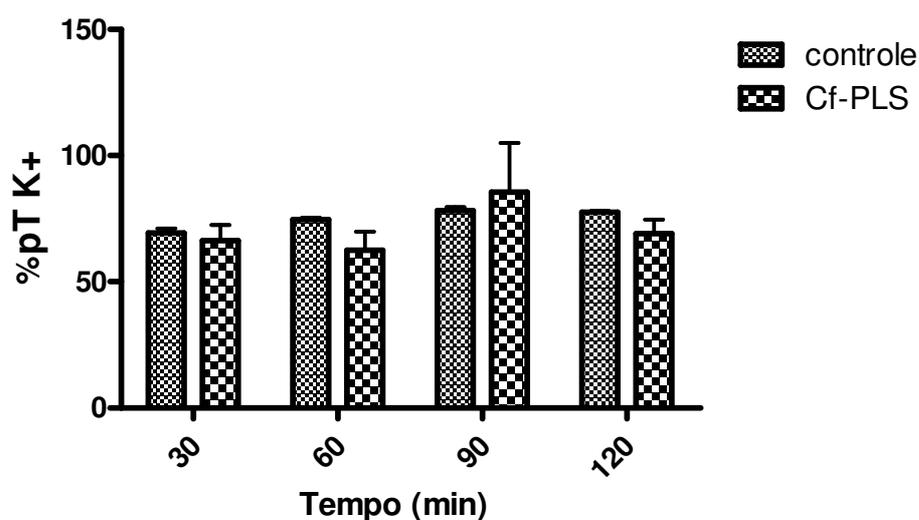


Figura 29 – Efeitos do polissacarídeo sulfatado isolado da alga *Champia feldmannii* (Cf-PLS) na Porcentagem de Transporte Tubular Proximal de Potássio (%pT K⁺) em rim isolado. Cf-PLS foi adicionado ao sistema de perfusão de rim isolado na concentração de 10 µg/mL. Os dados apresentam a média ± E.P.M.

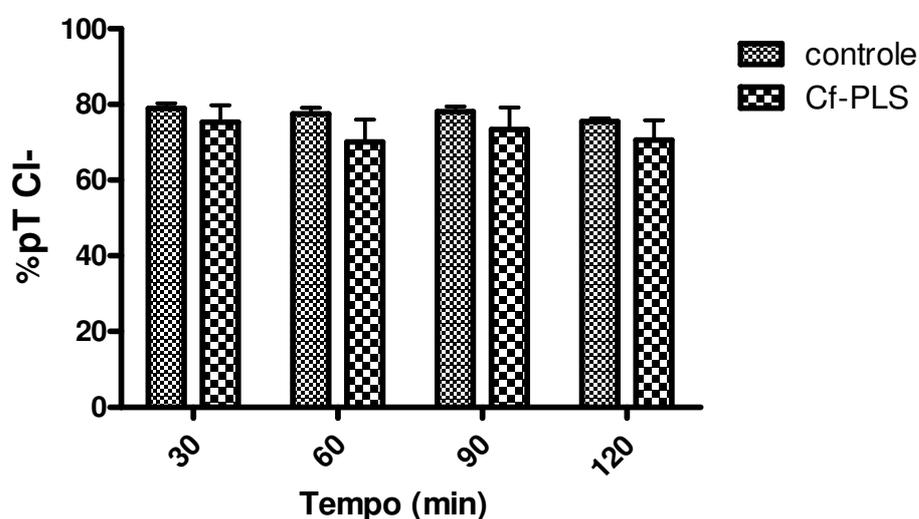


Figura 30 – Efeitos do polissacarídeo sulfatado isolado da alga *Champia feldmannii* (Cf-PLS) na Porcentagem de Transporte Tubular Proximal de Cloreto (%pT Cl⁻) em rim isolado. Cf-PLS foi adicionado ao sistema de perfusão de rim isolado na concentração de 10 µg/mL. Os dados apresentam a média ± E.P.M.

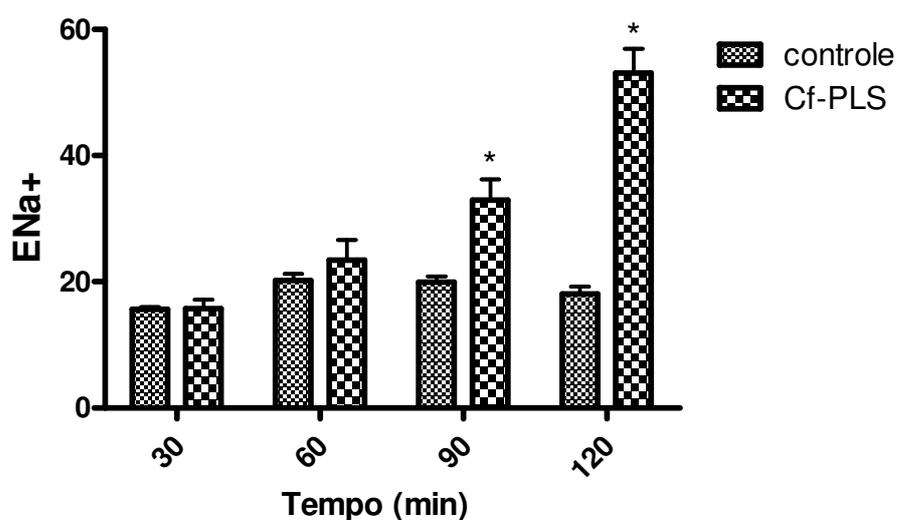


Figura 31 – Efeitos do polissacarídeo sulfatado isolado da alga *Champia feldmannii* (Cf-PLS) na Excreção de Sódio (ENa^+) em rim isolado. Cf-PLS foi adicionado ao sistema de perfusão de rim isolado na concentração de $10 \mu\text{g/mL}$. Os dados apresentam a média \pm E.P.M. * ($p < 0,05$) quando comparado com o controle por ANOVA seguido por Bonferroni.

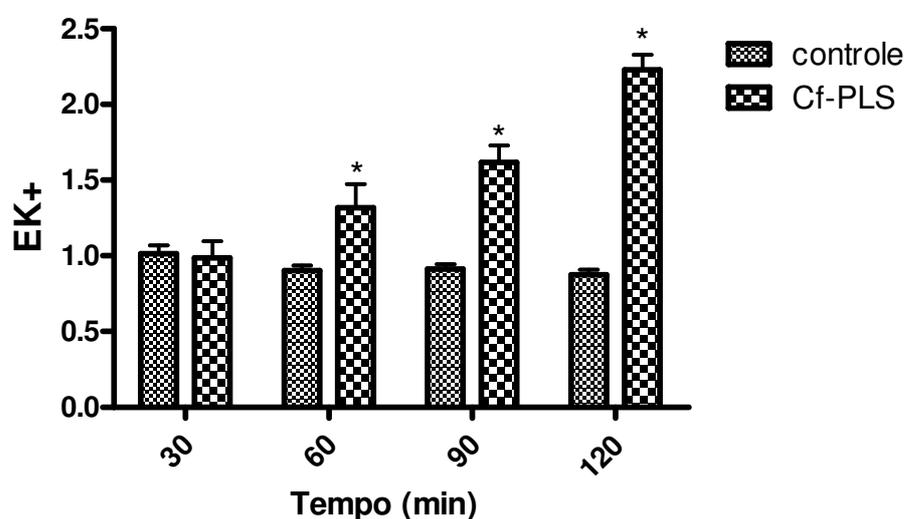


Figura 32 – Efeitos do polissacarídeo sulfatado isolado da alga *Champia feldmannii* (Cf-PLS) na Excreção de Potássio (EK^+) em rim isolado. Cf-PLS foi adicionado ao sistema de perfusão de rim isolado na concentração de $10 \mu\text{g/mL}$. Os dados apresentam a média \pm E.P.M. * ($p < 0,05$) quando comparado com o controle por ANOVA seguido por Bonferroni.

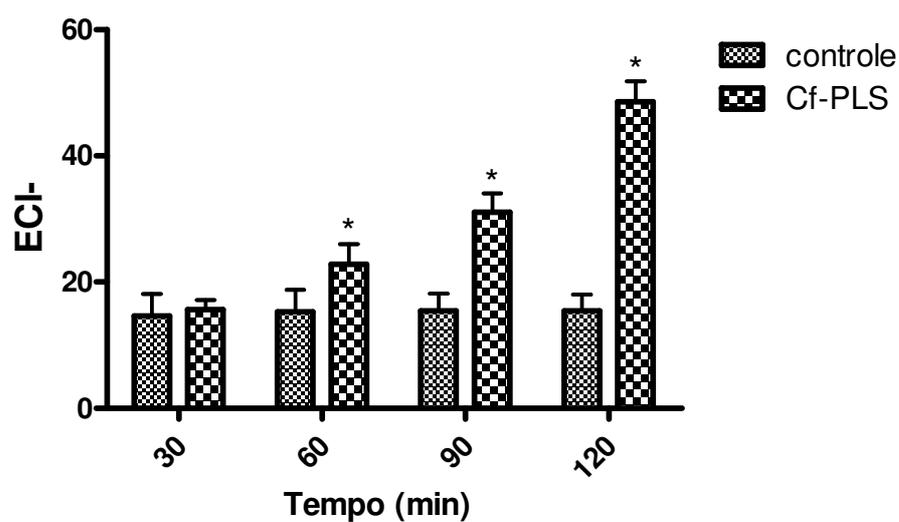
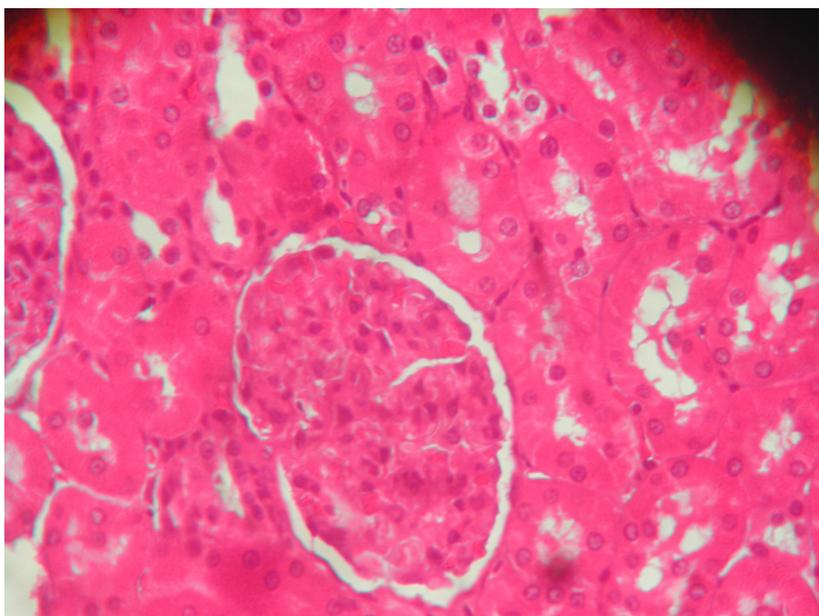


Figura 33 – Efeitos do polissacarídeo sulfatado isolado da alga *Champia feldmannii* (Cf-PLS) na Excreção de Cloreto (ECI⁻) em rim isolado. Cf-PLS foi adicionado ao sistema de perfusão de rim isolado na concentração de 10 µg/mL. Os dados apresentam a média ± E.P.M. * (p < 0,05) quando comparado com o controle por ANOVA seguido por Bonferroni.

A



B

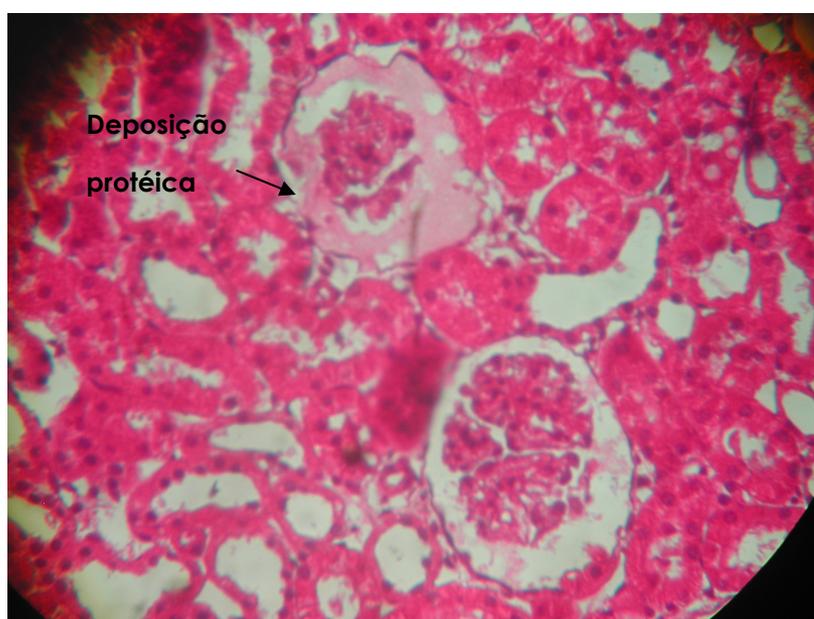


Figura 34 - Microfotografias dos cortes histológicos (400X) dos rins de ratos. A- grupo controle (rim esquerdo não perfundido); B- Cf-PLS (10 µg/mL).

4.5. Perfusão de leito vascular isolado

O experimento de leito vascular isolado de ratos foi realizado para avaliar os efeitos de Cf-PLS na pressão vascular. Cf-PLS não causou nenhuma alteração na pressão vascular do leito mesentérico, enquanto que a fenilefrina, utilizada como controle do experimento elevou a pressão a até 100 mmHg (Figura 35).

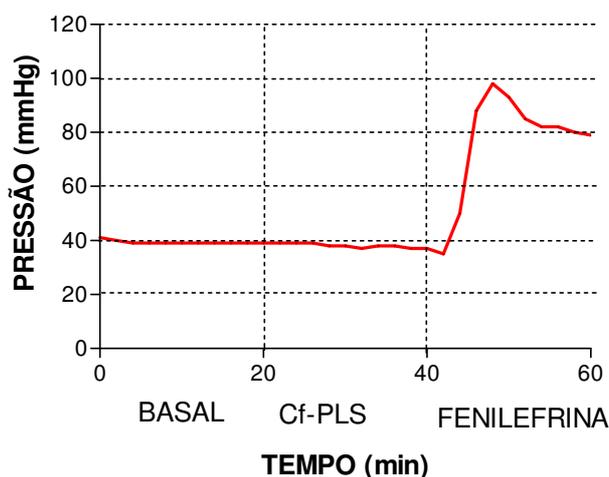


Figura 35 – Pressão de leito mesentérico no grupo tratado com o polissacarídeo sulfatado isolado da alga *Champia feldmannii* (Cf-PLS). Nos primeiros vinte minutos a pressão basal foi registrada como controle e após esse tempo Cf-PLS foi adicionado durante 20 minutos, a 10 $\mu\text{g/mL/min}$. Em seguida a fenilefrina foi utilizada como controle positivo, para verificar a eficácia do experimento.

Discussão

5. DISCUSSÃO

O potencial de algas marinhas como fonte de substâncias bioativas é um campo ainda pouco explorado. Apenas recentemente, a partir da década de 80, é que se tem começado a estudar as algas em busca de compostos com atividades biológicas e propriedades farmacológicas (SMIT, 2004).

Os polissacarídeos isolados de algas têm atraído uma grande atenção na área biomédica devido à grande variedade de propriedades terapêuticas apresentada aliada à relativa baixa toxicidade (TZIANABOS, 2000). Neste trabalho foi estudado o polissacarídeo sulfatado isolado da alga vermelha marinha *Champia feldmannii* (Cf-PLS), uma alga ainda pouco estudada, porém presente em boa parte do litoral brasileiro.

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

As análises *in vitro* foram realizadas para avaliar o efeito antiproliferativo dos polissacarídeos sobre quatro linhagens tumorais: HL-60, HCT-8, MDA-MB435 e SF-295. No teste *in vitro*, os resultados demonstraram que o polissacarídeo não apresentou nenhuma atividade citotóxica direta sobre as células tumorais nas concentrações testadas, obtendo um IC₅₀ maior do que 25µg/mL.

A ausência de citotoxicidade em modelos *in vitro* nos estudos com macromoléculas, incluindo os polissacarídeos, é comum na literatura. Entretanto, estudos têm demonstrado que, quando administrados no animal, muitos deles são capazes de inibir o crescimento tumoral (OOI & LIU, 2000; ZHOU *et al.*, 2004). Pode-se citar como exemplo, um polissacarídeo isolado do fungo *Ganoderma lucidum*, que não foi capaz de impedir a proliferação do tumor *in vitro*, mas quando administrado no animal com Sarcoma 180, foi capaz de inibir até 61,88% na maior dose utilizada, de 200 mg/kg (CAO & LIN, 2004). Os alginatos isolados da alga *Sargassum vulgare* também são inativos em modelos *in vitro*, mas

apresentam potente atividade antitumoral em modelos murinos tanto quando administrados por via intraperitoneal, quanto por via oral (Sousa *et al.*, 2007)

As análises *in vivo* foram realizadas utilizando-se o modelo experimental do Sarcoma 180. O Sarcoma 180 foi identificado no *Crocker Laboratory (Columbia University, New York)* em 1914. É um tumor de natureza sólida, inicialmente classificado como carcinoma mamário, por surgir espontaneamente na região axilar de camundongos. Em 1919, transformou-se na forma sarcomatosa e manteve-se sem alterações (SCHABEL *et al.*, 1977).

O tratamento com o Cf-PLS na dose de 25 mg/Kg/dia inibiu significativamente o tumor Sarcoma 180 transplantado nos camundongos (48,6%). Esta inibição também foi observada mesmo após uma diminuição da dose para 10 mg/Kg/dia, sendo ela de 48,16%. Esses resultados sugerem que na menor dose já observa-se o efeito máximo do polissacarídeo.

Na prática clínica a dose de um fármaco é um fator muito importante. Quanto menor a dose, menor a incidência de efeitos colaterais, o que aumenta consideravelmente a qualidade de vida do paciente. Com base no resultado anterior, a eficácia da associação do Cf-PLS com o 5-FU foi avaliada. O 5-Fluorouracil é um quimioterápico da classe dos agentes antimetabólicos análogos da pirimidina que, em última instância, levam a um bloqueio da timidilato sintase, sendo bastante utilizado na clínica (HARDMAN & LIMBIRD, 1996). Os animais tratados com o polissacarídeo na dose de 10 mg/Kg/dia associado ao 5-FU na mesma dose, tiveram a inibição do tumor elevada de forma significativa, em torno de 68,3%. Isso é um fato interessante, já que uma forma de aumentar a eficácia dos tratamentos contra o câncer é desenvolvendo melhores combinações dos fármacos quimioterápicos, aumentando assim a eficácia da terapia e reduzindo os efeitos colaterais indesejados (Morinaga *et al.*, 2003).

Muitos polissacarídeos sulfatados isolados de algas marinhas têm apresentado atividade antitumoral em modelos experimentais (Coombe *et al.*, 1987; Maruyama *et al.*, 1987; Kaeffer *et al.*, 1999; Saito *et al.*, 1992). Zhou *et al.* (2004) fizeram experimentos com uma galactana sulfatada isolada da alga vermelha *Condrus ocellatus*, a λ -carragenina, e observaram que amostras com diferentes pesos moleculares apresentavam atividade antitumoral em tumor Sarcoma 180. Esta era baixa quando a carragenina estava isolada (32% de inibição do tumor), mesmo que em altas doses (100mg/Kg/dia), porém aumentava quando em associação com o 5-FU, chegando a ter uma inibição de 63,8% na dose de 100mg/Kg/dia de carragenina associada a 25mg/Kg/dia de 5-FU. Esta galactana também foi capaz de melhorar a imunocompetência de animais tratados com o 5-FU. Esta capacidade foi avaliada

através do aumento no peso do baço e nos níveis de TNF- α nos camundongos transplantados com o tumor. No presente trabalho, observou-se percentual de inibição semelhante mesmo utilizando doses menores tanto do quimioterápico 5-FU (10mg/Kg), quanto do CF-PLS (10mg/Kg).

Outro estudo demonstrou que um polissacarídeo sulfatado, fucano, isolado de *Sargassum thunbergii*, também foi capaz de potencializar a ação do 5-FU, inibindo de forma significativa o número de metástases de pulmão em camundongos, através dos seus efeitos imunomodulatórios e imunoestimulantes (ITOH *et al.*, 1995).

Muitas das propriedades dos polissacarídeos modificadores da resposta biológica ainda não têm um mecanismo completamente conhecido, e ainda existem muitas controvérsias em volta da relação entre a estrutura e a atividade antitumoral desses polissacarídeos.

Koyanagi *et al.* (2003) avaliaram a influência do aumento de grupos sulfatados em fucano, um polissacarídeo isolado da alga marinha parda *Fucus vesiculosus*, nas suas propriedades antitumorais e anti-angiogênica. Os resultados demonstraram que tanto os fucanos naturais, quanto os que possuíam grupos sulfatados adicionados foram capazes de inibir o crescimento dos tumores Sarcoma 180, melanoma B16 e carcinoma de Lewis. Entretanto, essa atividade antitumoral foi aumentada na presença de grupos sulfatados.

Geralmente fatores que afetam a atividade biológica dos polissacarídeos são a sua solubilidade em água, o peso molecular, e a presença de grupos sulfatados. Experimentos realizados com polissacarídeos, onde sua solubilidade em água era aumentada ou grupos sulfatados eram adicionados, apresentaram um aumento da atividade antitumoral (HUANG *et al.*, 2006; TAO *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2002). Vale ressaltar que a caracterização química do Cf-PLS ainda não foi realizada, não sendo possível inferir sobre influências da sua estrutura na determinação da sua atividade biológica.

Acredita-se que os mecanismos pelos quais os polissacarídeos vegetais exerçam seus efeitos terapêuticos benéficos sejam através da potenciação da defesa do hospedeiro, induzindo uma melhora na sua imunidade (SCHEPETKIN & QUINN, 2006). Tem sido sugerido que os polissacarídeos isolados de algas também atuam dessa maneira, agindo como modificadores da resposta biológica. Eles estariam envolvidos na ativação de várias células, como macrófagos, neutrófilos, células T e células NK (LEUNG *et al.*, 2006).

No presente trabalho, o grupo dos animais inoculados com o tumor Sarcoma 180 e tratados com o 5-FU teve os baços diminuídos de tamanho, enquanto que os baços dos grupos

tratados com o polissacarídeo nas doses de 10 e 25mg/Kg/dia tiveram sua massa úmida bastante aumentada, apresentando também megacariócitos em maior número e por vezes agregados. Os megacariócitos são células precursoras sanguíneas, e sua presença em grande quantidade caracteriza uma proliferação do baço nestes grupos. Isso vem sugerir um efeito imune, já que o baço é um dos órgãos responsáveis pelo sistema imunológico. Camundongos transplantados com tumor Sarcoma 180 e tratados com λ -carragenina isolada de *Chondrus ocellatus* também apresentaram resultados semelhantes aos encontrados com Cf-PLS, tendo sua massa úmida do baço aumentada (ZHOU *et al.*, 2004).

Muitos quimioterápicos utilizados atualmente na clínica, inclusive o 5-FU são imunossupressores (TAKAGUCHI *et al.*, 2001). As análises hematológicas realizadas com o sangue dos camundongos transplantados com o Sarcoma 180 e tratados com o 5-FU revelaram um quadro de leucopenia quando comparado com o grupo com tumor tratado com salina. Na contagem diferencial de leucócitos, observa-se que o grupo inoculado com tumor tratado apenas com salina apresenta uma diminuição significativa no número de linfócitos, enquanto o número de neutrófilos aumenta em relação aos animais saudáveis. O mesmo acontece com a contagem de linfócitos e neutrófilos no grupo 5-FU em relação aos animais saudáveis, demonstrando uma imunossupressão.

Os grupos do polissacarídeo nas doses de 10 e 25 mg/Kg/dia apresentaram um nível normal de leucócitos e, no caso do grupo onde o polissacarídeo estava associado com o quimioterápico 5-FU, houve uma reversão do quadro de leucopenia apresentado pelo uso do quimioterápico isolado e a normalização dos níveis de linfócitos e neutrófilos, demonstrando que ele pode agir estimulando o sistema imune.

A inoculação do tumor causa por si só uma reação leucemóide em animais experimentais, a qual é caracterizada por granulocitose e esplenomegalia (KODAMA *et al.*, 1974; OKAWA *et al.*, 1992; SATO *et al.*, 2005). No presente trabalho, os animais que foram inoculados com o tumor Sarcoma 180 apresentaram um aumento do peso do baço, acompanhado por um aumento do número de granulócitos. De acordo com Okawa *et al.* (1992), pode-se observar um aumento da resistência do hospedeiro a infecções por fungos em animais transplantados com tumor, e a supressão da resposta imune que foi observada nos animais com tumor ou nos pacientes é geralmente causada pelo tratamento do câncer com a quimioterapia. Resultados semelhantes foram encontrados nos animais tratados com o 5-FU neste trabalho.

O tratamento com Cf-PLS foi capaz de induzir uma esplenomegalia, e elevou o número de leucócitos circulantes, enquanto a contagem diferencial de leucócitos foi semelhante a dos animais saudáveis. Outros polissacarídeos isolados de algas também são capazes de provocar as mesmas reações em animais transplantados com tumores, e essas alterações são geralmente relacionadas com suas propriedades imunoestimulantes (ITOH *et al.*, 1995; SOUSA *et al.*, 2007).

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

Assreuy *et al.* (2008) avaliaram os efeitos pró-inflamatórios de Cf-PLS, demonstrando que Cf-PLS é capaz de potencializar o edema causado por carragenina, dextran e zimosan, além de causar edema quando administrado isoladamente, nas doses de 100, 300 e 900 µg/kg. No presente trabalho foi utilizada essa mesma metodologia, obtendo-se resultados semelhantes. Entretanto as doses do presente estudo foram maiores do que o reportado na literatura, sendo que a menor dose utilizada seria correspondente a 2 mg/kg. Além disso, Assreuy *et al.* (2008) também avaliaram o efeito do Cf-PLS sobre a permeabilidade vascular e migração de neutrófilos, verificando que Cf-PLS aumenta a permeabilidade vascular quando injetado subcutaneamente na pata de animais e quando administrado peritonealmente causa migração de neutrófilos em ratos. Estes resultados indicam que Cf-PLS possui propriedades imunoestimulantes. Experimentos utilizando substâncias inibidoras sugeriram a participação de citocinas primárias, prostaglandinas e histamina nos efeitos pró-inflamatórios de Cf-PLS.

A fim de avaliar os efeitos imunoadjuvantes e imunoestimulantes de Cf-PLS, foi feita a análise de anticorpos específicos contra Cf-PLS ou OVA. O tratamento dos animais com o polissacarídeo sulfatado induziu a produção de anticorpos específicos e também aumentou a produção de anticorpos contra a OVA, corroborando com as hipóteses de ação imunoadjuvante e imunoestimulante de Cf-PLS.

Em vários estudos utilizando animais experimentais, demonstrou-se que extratos de algas marinhas apresentam compostos biologicamente ativos envolvidos com a resposta imune através do aumento da atividade fagocítica e secretória de macrófagos e indução da produção de ROS, NO e citocinas (TNF- α , IL-1 e IL-6) (YOSHIZAWA *et al.*, 1996; OKAI *et*

al., 1997). Entretanto, não se sabe muito sobre os mecanismos moleculares desta ativação por polissacarídeos.

A fim de avaliar a capacidade de Cf-PLS de ativar macrófagos, foram realizados experimentos com uma cultura primária de macrófagos retirados da cavidade peritoneal de camundongos. O sobrenadante dos macrófagos incubados com Cf-PLS não inibiu o crescimento do tumor Sarcoma 180 em camundongos. Cf-PLS também não induziu liberação de óxido nítrico quando incubado com a cultura primária de macrófagos. Apesar do zimosan ser um potente estimulante inflamatório, o sobrenadante dos macrófagos incubados com zimosan também não foi capaz de inibir o crescimento do tumor Sarcoma 180 ou de liberar NO de forma significativa. Isto sugere que a metodologia utilizada não é suficiente para explicar os mecanismos da atividade antitumoral do Cf-PLS. Além disso, Assreuy *et al.* (2008) verificaram que o pré-tratamento com L-NAME não foi capaz de inibir o edema causado por Cf-PLS, sugerindo que o seu efeito pró-inflamatório não está relacionado com a liberação de NO.

Os mecanismos de ação de cada polissacarídeo e os seus sítios de ligação podem variar. Assim, os efeitos destes compostos podem estar envolvidos com diferentes tipos de células, como as células hematopoiéticas, o sistema imune inato ou adquirido ou também as diversas vias de sinalização ou de liberação de citocinas.

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

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

Polissacarídeos sulfatados isolados da alga *Ulva rígida* agem em diversas vias da inflamação, aumentando a expressão gênica de várias citocinas, seus receptores, de óxido nítrico, prostaglandinas, e algumas enzimas, como a ciclooxigenase-2 e a óxido nítrico sintase-2 (LEIRO *et al.*, 2007). Estudos realizados por Itoh *et al.*, 1995, demonstraram que fucanos

isolados da alga parda *Sargassum vulgare* agem na via C3, aumentando a ligação dos produtos da clivagem da via C3 (C3b) nos seus respectivos receptores.

Outra forma que um composto pode agir causando inflamação é através da ativação de macrófagos, induzindo a liberação de um fator quimiotático de neutrófilos, que vai atrair os neutrófilos para o local da inflamação. Alencar *et al.*, 2007, verificaram que uma lectina isolada de *Vatairea macrocarpa* induz a liberação de um fator quimiotático de neutrófilos por macrófagos de forma tempo e dose-dependente. Acredita-se que esse mediador inflamatório seja provavelmente uma citocina, como o TNF- α . Inclusive, Assreuy *et al.* (2008) verificaram que, quando Cf-PLS é injetado em ratos, ele é capaz de aumentar a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal.

O presente trabalho demonstrou que, quando administrado o sobrenadante dos macrófagos incubados com Cf-PLS em camundongos saudáveis, há um aumento da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal destes camundongos, demonstrando que Cf-PLS é capaz de induzir também a liberação de um fator quimiotático de neutrófilos por macrófagos, justificando os resultados anteriores de Assreuy *et al.* (2008).

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

Este estudo também avaliou a integridade dos fígados e rins dos animais tratados com Cf-PLS através de análises bioquímicas e histopatológicas. As análises histopatológicas dos órgãos removidos dos animais tratados com 5-FU revelaram a presença de congestão portal e da veia, além de hiperplasia das células de Kupffer e intensa tumefação dos hepatócitos, com focos discretos de esteatose em microgotas, o que sugere a toxicidade desta droga (KUMMAR *et al.*, 2004). Um grande número de compostos químicos de diferentes classes e com variadas atividades farmacológicas levam a importantes lesões hepáticas (SCHEUER & LEFKOWITZ, 2000). Apesar disso, o fígado possui uma grande capacidade adaptativa e regenerativa.

Nos animais tratados com o polissacarídeo também houve alterações como hiperplasia das células de Kupffer, discreta tumefação celular de hepatócitos, congestão portal e da veia

centrolobular. As modificações observadas foram dose-dependentes. Entretanto, essas diferenças morfológicas são consideradas reversíveis, já que o tecido intersticial estava preservado.

Além disso, a análise bioquímica no sangue periférico dos camundongos transplantados com o tumor Sarcoma 180 revelou que os níveis de ALT, uma transaminase responsável pelo diagnóstico de danos hepáticos, estavam todos semelhantes ao controle salina, sugerindo uma função do fígado normal.

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

No presente estudo, a análise histopatológica dos rins demonstrou que, no grupo do Cf-PLS, observou-se hemorragia glomerular e tubular na menor dose e focos de necrose tubular aguda na maior dose, assim como a presença de cilindrohialino. Entretanto, a estrutura dos glomérulos estava preservada. Além disso, as alterações morfológicas encontradas foram diferentes das que estão associadas com a nefrotoxicidade causada por agregados de imunoglobulinas.

De acordo com Olsen & Solez (1994), pode ocorrer necrose do epitélio tubular renal como consequência da administração de diversas classes químicas, mas mesmo se houver um grande dano celular, a regeneração depende da integridade dos tecidos intersticiais. Alginatos isolados de *Sargassum vulgare* também induziram necrose do epitélio tubular renal em animais experimentais e esses efeitos foram considerados reversíveis (SOUSA *et al.*, 2007). Como nos rins dos animais tratados com o Cf-PLS observou-se uma preservação do tecido intersticial, com ausência de edema ou infiltração de linfócitos, há uma possibilidade de regeneração do dano, sendo então essas alterações também consideradas passíveis de reversão (CURRAN, 1990; OLSEN & SOLEZ, 1994).

Os níveis de creatinina e uréia, índices que podem diagnosticar uma possível insuficiência renal não foram alterados após o tratamento com Cf-PLS. Todavia, os níveis de

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

Em busca de um entendimento maior dos efeitos de Cf-PLS especificamente no rim, foi feito o experimento da perfusão em rins isolados de ratos, assim como o experimento do leito vascular mesentérico, para observar se os efeitos de Cf-PLS no rim poderiam estar relacionados a alterações vasculares. A dose utilizada nos testes foi de 10 µg/mL, escolhida de acordo com a maior dose utilizada nos experimentos antitumorais *in vivo*. Os resultados demonstraram que Cf-PLS tem uma ação direta na função do rim, causando um aumento da pressão de perfusão, da resistência vascular renal, do ritmo de filtração glomerular, do fluxo urinário e da excreção de sódio, cloreto e potássio. Não foi observada nenhuma alteração dos percentuais de transportes totais ou tubular proximais de sódio, cloreto ou potássio.

A pressão arterial renal pode variar entre 80 e 200 mmHg, mantendo o fluxo sanguíneo renal constante. As arteríolas aferentes e eferentes do rim possuem inervação simpática que provoca vasoconstrição através da estimulação de receptores adrenérgicos α -1. Um aumento na atividade simpática nas arteríolas aferentes leva a um aumento do fluxo sanguíneo renal, que eleva o ritmo de filtração glomerular (STRASSER *et al.*, 1992).

Alginatos isolados de *Sargassum vulgare* também causaram efeitos renais semelhantes aos efeitos causados por Cf-PLS (SOUSA *et al.*, 2008). Esse aumento na pressão de perfusão e na resistência vascular renal estaria relacionado a um efeito vascular direto, o que foi confirmado pelo efeito vasoconstrictor induzido pelos alginatos no leito vascular mesentérico. Entretanto, o mesmo não aconteceu com Cf-PLS, que não induziu uma vasoconstrição no leito vascular mesentérico. O aumento da pressão de perfusão de perfusão pode ter sido responsável por um aumento do fluxo urinário. Assim, não se pode afirmar que os efeitos encontrados no rim após o tratamento com Cf-PLS sejam devido a uma ação direta nos vasos sanguíneos.

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

As análises histopatológicas revelaram que os rins tratados com Cf-PLS apresentaram uma deposição protéica moderada nos túbulos renais e que nos glomérulos, houve uma discreta deposição de material protéico. Esse extravasamento de proteína que foi observado pode ser explicado pelo aumento da pressão de perfusão causado por Cf-PLS.

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

Conclusão

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou que o polissacarídeo sulfatado isolado da alga marinha vermelha *Champia feldmannii* (Cf-PLS) apresenta atividade antitumoral em camundongos transplantados com tumor Sarcoma 180. Os ensaios *in vitro* concluíram que esse potencial não está relacionado com uma atividade citotóxica direta. A partir das análises do peso dos baços, dos resultados hematológicos e dos experimentos com relação aos efeitos de Cf-PLS no sistema imune, pôde-se concluir que essa atividade antitumoral de Cf-PLS seja através de uma ação imunomoduladora, através da ativação de leucócitos.

Apesar de exibir um bom potencial antitumoral, os achados histopatológicos e a análise da função renal demonstraram que o Cf-PLS apresenta toxicidade, sendo o rim o principal órgão envolvido nesta toxicidade, entretanto, os efeitos observados são moderados e passíveis de reversão.

Além disso, a associação de Cf-PLS com o 5-FU mostrou ser uma importante estratégia terapêutica para redução da toxicidade do quimioterápico e melhora da resistência do hospedeiro, o que aumenta a eficácia do tratamento contra o câncer.

Referências
Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCAR, N.M.N.; ASSREUY, A.M.S.; HAVT, A.; BENEVIDES, R.G.; MOURA, T.R.; SOUSA, R.B.; RIBEIRO, R.; CUNHA, F.Q. & CAVADA, B. *Vatairea macrocarpa* (Leguminosae) lectin activates cultured macrophages to release chemotactic mediators. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, v. 374, p. 275-282, 2007.

ALEXANDROFF, A.B.; JACKSON, A.M.; O'DONNELL, M.A. & JAMES, K. BCG immunotherapy of bladder cancer: 20 years on. **Lancet**, v. 353, p. 1689-1694, 1999.

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

ASSREUY, A.M.S.; GOMES, D.M.; SILVA, M.S.J.; TORRES, V.M.; SIQUEIRA, R.C.L.; PIRES, A.F.; CRIDDLE, D.N.; ALENCAR, N.M.N.; CAVADA, B.S.; SAMPAIO, A.H. & FARIAS, W.R.L. Biological effects of a sulphated polysaccharide isolated from the marine red algae *Champia feldmannii*. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 31, p. 691-695, 2008.

BOLD, H.C. **O reino vegetal**. São Paulo: Edgard Blucher. 1988. 189p.

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

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

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

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

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

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

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

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

- CHIHARA, G.; HAMURO, J.; ARAI Y. & FUKUOKA, F. Fractionation and purification of polysaccharides with marked antitumour activity, especially Lentinan from *Lentinus edodes* (Bark) sing, an edible mushroom. **Cancer Res.**, v. 30, p. 2776-2781, 1970.
- CHOY, Y.; LEUNG, K.; CHO, C.; WONG, K. & PANK, K. Immunopharmacological studies of low molecular weight polysaccharides from *Angelica sinensis*. **Americ. J. Chin. Med.**, v. 22, p. 137-145, 1994.
- CHURCH, F.C.; MEADE, J.B.; TREANOR, R.E. & WHINNA, H.C. Antithrombin activity of fucoidan. **J. of Biol. Chem.**, v. 264, p. 3618-3623, 1989.
- COLLIEC, S.; FISCHER, A.M.; TAPON-BRETAUDIÈRE, J.; BOISSON, C.; DURAND, P. & JOZEFONVICZ, J. Anticoagulant properties of a fucoidan fraction. **Thromb. Res.**, v. 64, p. 143-154, 1991.
- COOMBE, D.R.; PARISH, C.R.; RAMSHAW, I.E. & SNOWDEN, J.M. Analysis of the inhibition of tumour metastasis by sulfated polysaccharides. **Inter. J. of Cancer**, v. 39, p. 82-88, 1987.
- COUNTER, C.M.; AVILION, A.A.; LEFEUVRE, C.E.; STEWART, N.G.; GREIDER, C.W.; HARLEY, C.B. & BACCHETTI, S. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. **EMBO J.**, v. 11, p. 1921-1929, 1992.
- CRAGG, G.M. & NEWMAN, D.J. Antineoplastic agents from natural sources: achievements and future directions. **Exp. Opin. Invest. Drugs.**, v. 9, p. 1 – 15, 2000.
- CURRAN, R. C. **Colon atlas of histopathology**, 3th ed. Oxford University Press, New York. 1990.
- DABA, A.S. & EZERONYE, O.U. Anti-cancer effect of polisaccharides isolated from higher basidiomycetes mushrooms. **Afric. J. of Biotech.**, v. 2, n. 12, p. 672-678, 2003.
- DAMONTE, E.B.; NEYTS, J.; PUJOL, C.A.; SNOECK, R.; ANDREI, G.; IKEDA, S.; WITVROUW, M.; REYMEN, D.; HAINES, H.; MATULEWICZ, M.C.; CERESO, A.; COTO, C.E. & DE CLERCQ, E. Antiviral activity of a sulfated polysaccharide from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*. **Biochem. Pharm.**, v. 47, p. 2187-2192, 1994.
- DAVIS, H.L.; WEERATNA, R.; WALDSCHMIDT, T.J.; TYGRET, L.; SCHORR, J. & KRIEG, A.M. CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. **J. Immunol.**, v. 160, p. 870-876, 1998.
- DE CLERCQ, E. Chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection: Anti-HIV agents targeted at early stages in the virus replicative cycle. **Biomed. Pharmacother.**, v. 50, p. 207-215, 1996.
- DEMEULE, B.; GURNY, R. & ARVINTE, T. Where disease pathogenesis meets protein formulation: renal deposition of immunoglobulin aggregates. **Europ. J. Pharm. Biopharm.**, v. 62, p. 121-130, 2006.
- DUDA, R.B.; YANG, H.; DOOLEY, D.D. & ABU-JAWDEH, G. Recombinant BCG therapy suppresses melanoma tumor growth. **Ann. Surg. Oncol.**, v. 2, p. 542-549, 1995.

- DUNN, G.P.; BRUCE, A.T.; IKEDA, H.; OLD, L.J. & SCHREIBER, R.D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. **Nat. Immunol.**, v. 3, p. 991–998, 2002.
- ESTRADA, A.; YUN, C.H.; VAN KESSEL, A.; LI, B.; HAUTA, S. & LAARVELD, B. Immunomodulatory activities of oat β -glucan *in vitro* and *in vivo*. **Microbiol. Immunol.**, v. 41, p. 991–998, 1997.
- FARIAS, W.R.L.; NAZARETH, R.A.; MOURÃO, P.A.S. Dual effects of sulfated D-galactans from the red algae *Botryocladia occidentalis* preventing thrombosis and inducing platelet aggregation. **Thromb. Haem.**, v. 86, p. 1540-1546, 2001.
- FEDI, P.; TRONICK, S.R. & AARONSON, S.A. **Growth factors**. In Cancer Medicine, J.F. Holland, R.C. Bast, D.L. Morton, E. Frei, D.W. Kufe & R.R., Weichselbaum, (Eds.) Baltimore, MD: Williams and Wilkins, 1997, p. 41-64.
- FOLKMAN, J. **Tumor angiogenesis**. In Cancer Medicine, J.F. Holland, R.C. Bast, D.L. Morton, E. Frei, D.W. Kufe, and R.R. Weichselbaum (Eds.) Baltimore, MD: Williams and Wilkins, 1997, p. 181–204.
- FONG, L. & ENGLEMAN, E.G. Dendritic cells in cancer immunotherapy. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 18, p. 245–73, 2000.
- FONG, L.; BROCKSTEDT, D.; BENIKE, C.; BREEN, J.K.; STRANG, G.; RUEGG, C.L. & ENGLEMA, E.G. Dendritic cell-based xenoantigen vaccination for prostate cancer immunotherapy. **J. Immunol.**, v. 167, p. 7150–7156, 2001.
- FONTELES, M. C.; COHEN, J. J.; BLACK, A. J. & WERTHEIM, S. J. Support of kidney function by long-chain fatty acids derived from renal tissue. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 244, p. 235-246, 1983.
- FORNELLI, F, MINERVINI, F. & LOGRIECO, A. Cytotoxicity of fungal metabolites to lepidopteran (*Spodoptera frugiperda*) cell line (SF-9). **J. Invert. Pathol.**, v. 85, p. 74-79, 2004.
- FOULDS, L. **The experimental study of tumor progression**. Volumes I-III. London: Academic press. 1954.
- FURUE, H. & KITO, I. Phase 111-study on Lentinan. **Japan. J. Cancer Chemot.**, v. 8, p. 944-960, 1981.
- GAO, Y.L.; HU, F.L.; ZHU, W. & LI, Y.H. Study on the antitumor activity of propolis and bee pollen and royal jelly. **J. Bee**, v. 7, p. 3-4, 2003.
- GARCIA-LORA, A.; MARTINEZ, M.; PEDRINACI, S. & GARRIDO, F. Different regulation of PKC isoenzymes and MAPK by PSK and IL-2 in the proliferative and cytotoxic activities of the NKL human natural killer cell line. **Cancer Immunol. Immunot.**, v. 52, p. 59–64, 2003.
- GIUSTI, R.M.; SHASTRI, K.A.; COHEN, M.H.; KEEGAN, P. & PAZDUR, R. FDA drug approval summary: panitumumab (Vectibix™). **Oncolog.**, v. 12, p. 577–583, 2007.

- GLOVSKY, M.M.; CORTES-HAENDCHEN, L.; GHEKIERE, L.; ALENTY, A.; WILLIAMS, D.L. & DI LUZIO, R. Effects of particulate β -1,3 glucan on human, rat, and guinea pig complement activity. **J. Reticuloendothel. Soc.**, v. 33, p. 401–413, 1983.
- GRENN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S. & TANNENBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite and [^{15}N nitrates] in biological fluids. **Analyt. Bioch.**, v. 126, p. 131-138, 1982.
- HADDEN, J.W. Immunodeficiency and cancer: prospects for correction. **Int. Immunopharm.**, v. 3, p. 1061-1071, 2003.
- HAN, S.B.; YOON, Y.D.; AHN, H.J.; LEE, H.S.; LEE, C.W.; YOON, W.K.; PARK, S.K. & KIM, H.M. Toll-like receptor-mediated activation of B cells and macrophages by polysaccharide isolated from cell culture of *Acanthopanax senticosus*. **Int. Immunopharm.**, v. 3, p. 1301–1312, 2003.
- HANAHAN, D., & FOLKMAN, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. **Cell**, v. 86, p. 353–364, 1996.
- HANAHAN, D. & WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, p. 57-70, 2000.
- HANSON, R.W. & BALLARD, F.J. Citrate, pyruvate, and lactate contaminants of commercial serum albumin. **J. of Lipid Res.**, v. 9, p. 667-668, 1968.
- HARDMAN, G. & LIMBIRD, L. **The pharmacological basis of therapeutics**. International edition, 9th ed., 1996.
- HARRIS, C.C. P53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic-an abridged historical perspective. **Carcinog.**, v. 17, p. 1187-1198, 1996.
- HAVT, A.; FONTELES, M.C. & MONTEIRO, H.S.A. The renal effects of *Bothrops jararacussu* venom and the role of PLA₂ and PAF. **Toxicon.**, v. 39, p. 1841-1846, 2001.
- HAYASHI, A.; GILLEN, A.C. & LOTT, J.R. Effects of daily oral administration of quercetin chalcone and modified citrus pectin on implanted colon-25 tumor growth in Balb-c mice. **Altern. Med. Rev.**, v. 5, p. 546-552, 2000.
- HEATH, W.R. & CARBONE, F.R. Cytotoxic T lymphocyte activation by crosspriming. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 11, p. 314-318, 1999.
- HEATH, W.R. & CARBONE, F.R. Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 1, p. 126-134, 2001.
- HIRAZUMI, A. & FURUSAWA, E. An immunomodulatory polysaccharide-rich substance from the fruit juice of *Morinda citrifolia* (Noni) with antitumour activity. **Phytoth. Res.**, v. 13, p. 380-387, 1999.
- HIROISHI, S.; SUGIE, K.; YOSHIDA, T.; MORITOMO, J.; TANIGUCHI Y.; IMAI S. & KUREBAYASHI, J. Antitumor effects of *Marginisporum crassissimum* (Rhodophyceae), a marine red alga. **Cancer Let.**, v. 167, p. 145–150, 2001.
- HOEK, C. VAN DEN; MANN, D.G. & JAHNS, H.M. **Algae: an introduction to phycology**. Cambridge University Press, 1995, 637 p.

- HRCKOWA, G. & VELEBNY, S. Treatment of *Toxocara canis* infections in mice with liposome-incorporated benzimidazole carbamates and immunomodulator glucan. **J. Helminth.**, v. 75, p. 141-146, 2001.
- HUANG, Q.; ZHANG, L.; CHEUNG, P.C.K. & TAN, X. Evaluation of sulfated α -glucans from *Poria cocos* mycelia as potential antitumor agent. **Carb. Polym.**, v. 64, p. 337-344, 2006.
- HWANG, J.S.; CHUNG, H.K.; BAE, E.K.; LEE, A.Y.; JI, H.J.; PARK, D.W.; JUNG, H.J.; CHO, C.W.; CHOI, H.J.; LEE, D.S.; LEE, K.R. & YOUN, H.J. The polysaccharide fraction AIP1 from *Artemisia iwayomogi* suppresses apoptotic death of the mouse spleen cells in culture. **Arch. Pharm. Res.**, v. 26, p. 294–300, 2003.
- IINUMA, T.; HOMMA, S.; NODA, T.; KUFU, D.; OHNO, T. & TODA, G. Prevention of gastrointestinal tumors based on adenomatous polyposis coli gene mutation by dendritic cell vaccine. **J. Clin. Invest.**, v. 113, p. 1307–1317, 2004.
- INGOLFSDOTTIR, K.; JURCIC, K.; FISCHER, B. & WAGNER, H. Immunologically active polysaccharide from *Cetraria islandica*. **Planta Med.**, v. 60, p. 527-531, 1994.
- IRELAN, C.M.; COPP, B.R.; FOSTER, M.P.; MCDONALD, L.A.; RADISKY, D.C. & SWERSEY, J.C. **Biomedical potential of marine natural products**. In Attaway, D. H., Zaborsky, O. R. (eds). Marine Biotechnology, v. 1, Pharmaceutical and Bioactive Natural Products, Plenum Press, New York, 1993, p. 1-43.
- ITOH, H.; NODA, H.; AMANO, H. & ITO, H. Immunological analysis of inhibition of lung metastases by fucoidan (GIV-A) prepared from Brown seaweed *Sargassum thunbergii*. **Anticanc. Res.**, v. 15, p. 1937-1948, 1995.
- IWASAKI, A. & MEDZHITOV, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses, **Nat. Immunol.**, v. 5, p. 987–995, 2004.
- JAKOB, T.; WALKER, P.S.; KRIEG, A.M.; UDEY, M.C. & VOGEL, J.C. Activation of cutaneous dendritic cells by CpG-containing oligodeoxynucleotides: a role for dendritic cells in the augmentation of Th1 responses by immunostimulatory DNA. **J. Immunol.**, v. 161, p. 3042-3049, 1998.
- JI, M.H. **Seaweed chemistry**. 3^a ed. Beijing: Science Press, 1997, p. 117-196.
- JIANG, Y.; JIANG, X.; WANG, P.; MOU, H.; HU X. & LIU, S. The antitumor and antioxidative activities of polysaccharides isolated from *Isaria farinosa* B05. **Microbiol. Res.**, v. 163, p. 424-430, 2006.
- JOLY, A.B. Flora marinha do litoral norte do estado de São Paulo e regiões circunvizinhas. **Bol. Fac. Filos., Ciênc. Letr. Univer. São Paulo**, v. 294, p. 1-393, 1965.
- JUNG, K.; HA, Y.; HA, S.K.; HAN, D.U.; KIM, D.W. & MOON, W.K. Antiviral effect of *Saccharomyces cerevisiae* β -glucan to swine influenza virus by increased production of interferon-gamma and nitric oxide. **J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health**, v. 51, p. 72-76, 2004.

KAEFFER, B.; BERNARD, C.; LAHAYE, M.; BLOTTIERE, H.M. & CHERBUT, C. Biological properties of ulvan, a new source of green seaweed sulfated polysaccharides, on cultured normal and cancerous colonic epithelial cells. **Plant. Med.**, v. 65, p. 527-531, 1999.

KAO, J.H. & CHEN, D.S. Recent updates in hepatitis vaccination and the prevention of hepatocellular carcinoma. **Int. J. Cancer**, v. 97, p. 269–271, 2002.

KATO, M.; HIROSE, K.; HAKOZAKI, M.; OHNO, M.; SAITO, Y.; IZUTANI, R.; NOGUCHI, J.; HORI, Y.; OKUMOTO, S.; KURODA, D.; NOMURA, H.; NISHIMATSU, S. & OHOYANAGI, H. Induction of gene expression for immunomodulating cytokines in peripheral blood mononuclear cells in response to orally administrated PSK, an immunomodulating protein-bound polysaccharide. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 40, p. 152–6, 1995.

KIM, K.; KIM, W.; HONG, S.; SHIN, H.; CHON, Y. & YANG, C. Antitumour, genotoxicity and anticlastogenic activities of polysaccharide from *Curcuma zedoaria*. **Molec. Cells**, v. 10, p. 392-398, 2000.

KIM, G.Y.; PARK, H.S.; NAM, B.H.; LEE, S.J. & LEE, J.D. Purification and characterization of acidic proteo-heteroglycan from the fruiting body of *Phellinus linteus* (Berk. & M. A. Curtis) Teng. **Bioresour. Technol.**, v. 89, p. 81–87, 2003.

KIMURA, Y.; MIZUNO, H.; SATAKE, K.; TAHARA, H. & TSUKUDA, M. Clinical evaluation of Sizofiran an assistant immunotherapy in treatment of head and neck cancer. **Acta Otolaryng.**, v. 511, p. 192 – 195, 1994.

KIMURA, Y.; IJIMA, S.; KATO, T.; TSUJIE, M.; NAOI, Y. & HAYASHI, T. Usefulness of TS-1 and lentinan combination immunochemotherapy in advanced or recurrent gastric cancer pilot study aiming at a randomized trial. **Gan. Kagaku Ryoho.**, v. 30, p. 1125–30, 2003.

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

KOBAYASHI, H.; MATSUNAGA, K. & FUJII, M. PSK as a chemopreventive agent. **Cancer Epidem., Biomark. & Prevent.**, v. 2, p. 271-276, 1993.

KODAMA, T.; SENDO, F. & KOBAYASHI, H. Leukemoid Reaction in BALB/c Mice Bearing Transplanted Tumors. **Cancer Res.**, v. 34, p. 176-180, 1974.

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

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

KOYANAGI, S.; TANIGAWA, N.; NAKAGAWA, H.; SOEDA, S. & SHIMENO, H. Oversulfation of fucoidan enhances its anti-angiogenic and antitumor activities. **Bioch. Pharm.**, v. 65, p. 173-179, 2003.

KUMMAR, V.; ABBAS, A. & FAUSTO, N. **Robbins & Cotran pathology basis of disease**, 7th ed. WB Saunders, China, 2004.

- LEE, J.K.; LEE, M.K.; YUN, Y.P.; KIM, Y.; KIM, J.S.; KIM, Y.S.; KIM, K.; HAN, S.S. & LEE, C.K. Acemannan purified from *Aloe vera* induces phenotypic and functional maturation of immature dendritic cells. **Int. Immunopharm.**, v. 1, p. 1275–1284, 2001.
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L. & COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 3ª ed. São Paulo: Sarvier, 2002, 975p.
- LEIRO, J.M.; CASTRO, R.; ARRANZ, J.A. & LAMAS, J. Immunomodulating activities of acidic sulphated polysaccharides obtained from the seaweed *Ulva rigida* C. Agardh. **Int. Immunopharm.**, v. 7, p. 879-888, 2007.
- LEUNG, M.Y.K.; LIU, C.; KOON, J.C.M. & FUNG, K.P. Polysaccharide biological response modifiers. **Immun. Let.**, v. 105, p. 101-114, 2006.
- LEVY, J.B. & PUSEY, C.D. Nephrotoxicity of intravenous immunoglobulin. **Q. J. Med.**, v. 93, p. 751-755, 2000.
- LI, W.; YAJIMA, T.; SAITO, K.; NISHIMURA, H.; FUSHIMI T.; OHSHIMA Y.; TSUKAMOTO, Y. & YOSHIKAI, Y. Immunostimulating properties of intragastrically administered Acetobacter-derived soluble branched (1,4)- β -d-glucans decrease murine susceptibility to *Listeria monocytogenes*. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 7005–7011, 2004.
- LIAO, H.F.; CHOU, C.J.; WU, S.H.; KHOO, K.H.; CHEN, C.F. & WANG, S.Y. Isolation and characterization of an active compound from black soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] and its effect on proliferation and differentiation of human leukemic U937 cells. **Anticanc. Drugs**, v. 12, p. 841-846, 2001.
- LIM, T.S.; NA, K.; CHOI, E.M.; CHUNG, J.Y. & HWANG, J.K. Immunomodulating activities of polysaccharides isolated from *Panax ginseng*. **J. Med. Food**, v. 7, p. 1–6, 2004.
- LINCOLN, R.A.; STRUPINSKI, K. & WALKER, J.M. Bioactive compounds from algae. **Life Chem. Rep.**, v. 8, p. 97-183, 1991.
- LINEHAN, S.A.; MARTINEZ-POMARES, L.; STAHL, P.D. & GORDON, S. Mannose receptor and its putative ligands in normal murine lymphoid and nonlymphoid organs: in situ expression of mannose receptor by selected macrophages, endothelial cells, perivascular microglia, and mesangial cells, but not dendritic cells. **J. Exp. Med.**, v. 189, p. 1961–1972, 1999.
- LIU, F.; OOI, V.E.C. & FUNG, M.C. Analysis of immunomodulating cytokine mRNAs in the mouse induced by mushroom polysaccharides. **Life Sci.**, v. 64, p. 1005-1011, 1999.
- LIU, C.; LEUNG, M.Y.K.; KOON, J.C.M.; ZHU, L.F.; HUI, Y.Z; YU, B. & FUNG, K.P. Macrophage activation by polysaccharide biological response modifier isolated from *Aloe vera* L. var. *chinensis* (Haw.) Berg. **Int. Immunopharm.**, v. 6, p. 1634-1641, 2006.
- LIU, C.; LIN, Q.; GAO, Y.; YE, L.; XING, Y. & XI, T. Characterization and antitumor activity of a polysaccharide from *Strongylocentrotus nudus* eggs. **Carboh. Polym.**, v. 67, p. 313-318, 2007.
- LOLLINI, P.L.; CAVALLO, F.; NANNI, P. & FORNI, G. Vaccines for tumour prevention. **Nat. Rev. Canc.**, v. 6, p. 204–216, 2006.

LOTHAR, B.; DANIEL, W.; HERMANN, M.; ELMAR, C.F.; WOLF-MEINHARD, B. & ARND, P. Structural and immunological properties of arabinogalactan polysaccharides from pollen of timothy grass (*Phleum pratense* L.). **Carboh. Res.**, v. 340, p. 657-663, 2005.

MALONEY D.G. Immunotherapy for non-Hodgkin's lymphoma: monoclonal antibodies and vaccines. **J. Clin. Oncol.**, v. 23, p. 6421-6428, 2005.

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

MAO, C.; KOUTSKY, L.A.; AULT, K.A.; WHEELER, C.M.; BROWN, D.R.; WILEY, D.J.; ALVAREZ, F.B.; BAUTISTA, O.M.; JANSEN, K.U. & BARR, E. Efficacy of human papillomavirus-16 vaccine to prevent cervical intraepithelial neoplasia: a randomized controlled trial. **Obstet. Gynecol.**, v. 107, p. 18-27, 2006.

MARTINEZ-MALDONADO, M.; STAVROULAKI-TSAPARA, A.; TSAPARAS, H.; SUKI, W.N. & EKNOYAN, G. Renal effects of lithium administration in rats: Alteration in water and electrolyte metabolism and the response to vasopressin and cyclicadenosine monophosphate during prolonged administration. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 86, p. 445-461, 1975.

MARTINS, A.; LIMA, A.; TOYAMA, M.; MARANGONI, S.; FONTELES, M. & MONTEIRO, H. Renal effects of supernatant from macrophages activated by *Crotalus durissus cacavella* venom: The role of phospholipase A₂ and cyclooxygenase. **Pharm. & Toxic.**, v. 92, p. 14-20, 2002.

MATSUMOTO, T. & YAMADA, H. Regulation of immune complexes binding of macrophages by pectic polysaccharide from *Bupleurum falcatum* L.: pharmacological evidence for the requirement of intracellular calcium/ calmodulin on Fc receptor up-regulation by bupleuran 2IIb. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 47, p. 152-156, 1995.

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

MCGREGOR, D.D. The effect of sympathetic nerve stimulation on vasoconstrictor responses in perfused mesenteric blood vessels of the rat. **J. Physiol.**, v. 177, p. 21-30, 1965.

MICHAELSEN, T.E.; GILJE, A.; SAMUELSEN, A.B.; HOGASEN, K. & PAULSEN, B.S. Interaction between human complement and a pectin type polysaccharide fraction, PMII, from the leaves of *Plantago major* L. **Scand. J. Immunol.**, v. 52, p. 483-490, 2000.

MINEV, B.; HIPPEL, J.; FIRAT, H.; SCHMIDT, J.D.; LANGLADE-DEMOYEN, P. & ZANETTI, M. Cytotoxic T cell immunity against telomerase reverse transcriptase in humans. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 97, p. 4796-4801, 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE **Estimativas 2008**: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2007, 94p.

- MIYAZAKI, K.; MIZUTANI, H.; KATABUCHI, H.; FUKUMA, K.; FUJISAKI, S. & OKAMURA, H. Activated (HLA-DR+) T- Lymphocyte subsets in cervical carcinoma and effects of radiotherapy and immunotherapy with sizofiran on cell mediated immunity and survival. **Gynec. Oncol.**, v. 56, p. 412-420, 1995.
- MIZUTANI, Y. & YOSHIDA, O. Activation by the protein-bound polysaccharide PSK (Krestin) of cytotoxic lymphocytes that act on fresh autologous tumor cells and T24 human urinary bladder transitional carcinoma cell line in patients with urinary bladder cancer. **J. Urol.**, v. 145, p. 1082–1087, 1991.
- MOLTO, L.M.; CARBALLIDO, J.; JURINCIC, C.; LAPENA, P.; MANZANO, L.; SALMERON, I.; KLIPPEL, K.F. & ALVAREZ-MON, M. Keyhole limpet hemocyanine can enhance the natural killer activity of patients with transitional cell carcinoma of the bladder. **Eur. Urol.**, v. 19, p. 74-78, 1991.
- MORINAGA, Y.; SUGA, Y.; EHARA, S.; HARADA, K.; NIHEI, Y. & SUZUKI, M. Combination effect of AC-7700, a novel combretastatin A-4 derivative, and cisplatin against murine and human tumors in vivo. **Cancer Sci.**, v. 94, p. 200–204, 2003.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Meth.**, v. 16, p. 55 – 63, 1983.
- NAHTA, R. & ESTEVA, F.J. Herceptin: mechanisms of action and resistance. **Cancer Let.**, v. 232, p. 123–138, 2006.
- NAKANO, H.; NAMATAME, K.; NEMOTO, H.; MOTOHASHI, H.; NISHIYAMA, K. & KUMADA K. A multi-institutional prospective study of lentinan in advanced gastric cancer patients with unresectable and recurrent diseases: effect on prolongation of survival and improvement of quality of life. **Hepatogastroent.**, v. 46, p. 2662–2668, 1999.
- NAKASHIMA, H.; KIDO, Y.; KOBAYASHI, N.; MOTOKI, Y.; NEUSHUL, M. & YAMOTO, N. Purification and characterization of an avian myeloblastosis and human immunodeficiency virus reverse transcriptase inhibitor, sulfated polysaccharides extracted from sea algae. **Antimicrob. Agents Chemot.**, v. 31, p. 1524-1528, 1987.
- NISHINO, T.; NISHIOKA, C.; URA, H. & NAGUMO, T. Isolation and partial characterization of a novel amino sugar-containing fucan sulfate from commercial *Fucus vesiculosus* fucoidan. **Carboh. Res.**, v. 255, p. 213-224, 1994.
- NOWELL, P.C. The clonal evolution of tumor cell populations. **Science**, v. 194, p. 23-28, 1976.
- OEHNINGER, S.; CLARK, G.F.; ACOSTA, A.A. & HODGEN, G.D. Nature of the inhibitory effect of complex saccharide moieties on the tight binding of human spermatozoa to the human zona pellucida. **Fertil. Steril.**, v. 55, p. 165-169, 1991.
- OGATA, M.; MATSUI, T.; KITA, T. & SHIGEMATSU, A. Carrageenan primes leukocytes to enhance lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 3284–3289, 1999.
- OHNISHI, M.; KIMURA, S.; YAMAZAKI, M.; OSHIMA, H.; MIZUNO, D.I.; ABE, S. & YAMAGUCHI, H. Anti-tumour activity of low-toxicity lipopolysaccharide of *Bordetella pertussis*. **Br. J. Cancer**, v. 69, p. 1038-1042, 1994.

- OHWADA, S.; KAWATE, S.; IKEYA, T.; YOKOMORI, T.; KUSABA, T.; ROPPONGI, T.; TAKAHASHI, T.; NAKAMURA, S.; KAWASHIMA, Y.; NAKAJIMA, T. & MORISHITA, Y. Adjuvant therapy with protein-bound polysaccharide K and tegafur uracil in patients with stage II or III colorectal cancer: randomized, controlled trial. **Dis. Colon Rectum**, v. 46, p. 1060–1068, 2003.
- OKAI, Y.; HIGASHI-OKAI, K.; ISHIZAKA, S. & YAMASHITA, U. Enhancing effect of polysaccharides from an edible brown alga, *Hijikia fusiforme* (Hijiki), on release of tumor necrosis factor-alpha from macrophages of endotoxin-nonresponder C3H/HeJ mice. **Nutr. Cancer**, v. 27, p. 74–79, 1997.
- OKAZAKI, M.; ADACHI, Y.; OHNO, N. & YADOMAE, T. Structure-activity relationship of (1→3)-β-D-glucans in the induction of cytokine production from macrophages, *in vitro*. **Biol. Pharmac. Bull.**, v. 18, p. 1320-1327, 1995.
- OLAFSDOTTIR, E.S.; INGOLFSDOTTIR, K.; BARSETT, H.; PAULSEN, B.S.; JURCIC, K. & WAGNER, H. Immunologically active (1→3)-(1→4)-alpha-D-glucan from *Cetraria islandica*. **Phytomed.**, v. 6, p. 33-39, 1999.
- OLSEN, S., & SOLEZ, K. **Acute tubular necrosis and toxic renal injury**. In: C.C. Tisher, & B.M. Brenner, *Renal Pathology: with clinical and functional correlations* (pp. 769-809). Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 1994.
- OOI, C.V. & LIU, F. Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes. **Current. Med. Chem.**, v. 7, p. 715-729, 2000.
- ORBACH, H.; TISHLER, M.; & SHOENFELD, Y. Intravenous immunoglobulin and the kidney- a two-edged sword. **Semin. Arthritis Rheum.**, v. 34, p. 593-601, 2004.
- PAULSEN, B.S. Plant polysaccharides with immunostimulatory activities. **Curr. Org. Chem.**, v. 5, p. 939-950, 2001.
- PANARES, R.L. & GARCIA, A.A. Bevacizumab in the management of solid tumors. **Exp. Rev. Anticanc. Ther.**, v. 7, p. 433–445, 2007.
- PEISER, L.; MUKHOPADHYAY, S. & GORDON, S. Scavenger receptors in innate immunity. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 14, p. 123–128, 2002.
- PRINS, R.M.; CRAFT, N.; BRUHN, K.W.; KHAN-FAROOQI, H.; KOYA, R.C.; STRIPECKE, R.; MILLER, J.F. & LIAU, L.M. THE TLR-7 AGONIST, IMIQUIMOD, ENHANCES DENDRITIC CELL SURVIVAL AND PROMOTES TUMOR antigen-specific T cell priming: relation to central nervous system antitumor immunity. **J. Immunol.**, v. 176, p. 157–164, 2006.
- PUGH, N. & PASCO, D.S. Characterization of human monocyte activation by a water soluble preparation of *Aphanizomenon flos-aquae*. **Phytomed.**, v. 8, p. 445-453, 2001.
- QUATAN, N.; SPICER, J.; PLUNKETT, T. & PANDHA, H. Cellular Immunotherapy for Cancer: Current Concepts and Clinical Perspectives Scientific Basis and Approaches for Therapeutic Cancer Vaccines: Part I. **Clin. Oncol.**, v. 16, p. 356-365, 2004.

- RAMON, G.; CHASSIGNEUX, A.; RICHO, R.; & GERBEAUX, C. Sodium nucleate, immunity adjuvant and stimulant. **C. R. Hebd. Seances. Acad. Sci.**, v. 235, p. 111-114, 1952.
- REDDY, S.T.; REHOR, A.; SCHMOEKEL, H.G.; HUBBELL, J.A. & SWARTZ, M.A. In vivo targeting of dendritic cells in lymph nodes with poly(propylene sulfide) nanoparticles. **J. Control Rel.**, v. 112, p. 26–34, 2006.
- RELIGA, P.; KAZI, M.; THYBERG, J.; GACIONG, Z.; SWEDENBORG, J.; HEDIN, U. Fucoidan inhibits smooth muscle cell proliferation and reduces mitogen-activated protein kinase activity. **Europ. J. Vasc. Endovasc. Surg.**, v. 20, p. 419-426, 2000.
- RENN, D.W. Biotechnology and the red seaweed polysaccharide industry: status, needs and prospects. **Tibtech.**, v. 15, p. 9-14, 1997.
- RESCIGNO, M.; AVOGADRI, F. & CURIGLIANO, G. Challenges and prospects of immunotherapy as cancer treatment. **Bioch. Bioph. Acta**, v. 1776, p. 108–123, 2007.
- ROSS, G.D. & VETVICKA, V. CR3 (CD11b, CD18): a phagocyte and NK cell membrane receptor with multiple ligand specificities and functions. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 92, p. 181–184, 1993.
- ROUND, E.F. **Biologia das Algas**. 2^a ed., Rio de Janeiro, 1973.
- RUIZ-BRAVO, A.; JIMENEZ-VALERA, M.; MORENO, E.; GUERRA, V. & RAMOS-CORMENZANA, A. Biological response modifier activity of an exopolysaccharide from *Paenibacillus jamilae* CP-7. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 8, p. 706-710, 2001.
- SAITO, K.; NISHIJIMA, M. & MIYAZAKI, T. Structure of a heterglycan isolated from the fungus *Omphalia lapidescens*. **Carboh. Res.**, v. 224, p. 209-217, 1992.
- SAKAGAMI, H.; IKEDA, M.; UNTEN, S.; TAKEDA, K.; MURAYAMA, J. & HAMADA, A. Antitumour activity of polysaccharide fractions from pine cone extract of *Pinus parviflora* Sieb. et Zucc. **Anticanc. Res.**, v. 7, p. 1153-1159, 1987.
- SAKURAI, T.; OHNO, N.; SUZUKI, I. & YADOMAE, T. Effect of soluble fungal (1→3)-β-D-glucan obtained from *Sclerotinia sclerotiorum* on alveolar macrophage activation. **Immunoph.**, v. 30, p. 157-166, 1995.
- SALGALLER, M.L. Prostate cancer immunotherapy at the dawn of the new millennium. **Expert. Op. Investig. Drugs**, v. 6, 9, p. 1217-1229, 2000.
- SASAKI, H.; KOBAYASHI, M.; POLLARD, R.B. & SUZUKI, F. Effects of Z-100, a *Mycobacterium-tuberculosis*-derived arabinomannan, on the LP-BM5 murine leukemia virus infection in mice. **Pathobiol.**, v. 69, p. 96-103, 2001.
- SCHEPETKIN, I.A.; FAULKNER, C.L.; NELSON-OVERTON, L.K.; WILEY, J.A. & QUINN, M.T. Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Juniperus scopolorum*. **Int. Immunoph.**, v. 5, p. 1783-1799, 2005.
- SCHEPETKIN, I.A. & QUINN, M.T. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. **Int. Immunoph.**, v. 6, p. 317-333, 2006.

- SCHEUER, P. J. & LEFKOWITZ, J.H. **Drugs and toxins**. In: Scheuer, P.J., Lefkowitz, J.H (Eds.), Liver biopsy interpretation, 6th ed. WB Saunders, London, 2000, p. 134-150.
- SCHULER, G.; SCHULER-THURNER, B.; STEINMAN, R.M. The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 15, p. 138–47, 2003.
- SHARON, N. & LIS, H. Carbohydrates in cell recognition. **Scient. Americ.**, p. 74-81, 1993.
- SHEPHERD, V.L.; TARNOWSKI, B.I. & MCLAUGHLIN, B.J. Isolation and characterization of a mannose receptor from human pigment epithelium. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 32, p. 1779–1784, 1991.
- SHIMIZU, K.; THOMAS, E.K.; GIEDLIN, M. & MULE, J.J. Enhancement of tumor lysate- and peptide-pulsed dendritic cell-based vaccines by the addition of foreign helper protein. **Cancer Res.**, v. 61, p. 2618-2624, 2001.
- SHOEMAKER, R. Antitumor drug screening with a human tumor colony forming assay (HTCFA). **Proc. Am. Assoc. Cancer Res.**, v. 25, p. 1292, 1984.
- SINGH, R.K., GUTMAN, M., BUCANA, C.D., SANCHEZ, R., LLANSA, N. & FIDLER, I.J. Interferons alpha and beta down-regulate the expression of basic fibroblast growth factor in human carcinomas. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, p. 4562–4566, 1995.
- SINGH, M. & O'HAGAN, D. Advances in vaccine adjuvants. **Nat. Biotechnol.**, v. 17, p. 1075-1081, 1999.
- SMIT, A.J. Medicinal and Pharmaceutical uses of seaweed natural products: a review. **J. Appl. Phycol.**, v. 16, p. 245-262, 2004.
- SONG, J.Y.; YANG, H.O.; PYO, S.N.; JUNG, I.S.; YI, S.Y. & YUN, Y.S. Immunomodulatory activity of protein-bound polysaccharide extracted from *Chelidonium majus*. **Arch. Pharmac. Res.**, v. 25, p. 158-164, 2002.
- SOUSA, A.P.A.; TORRES, M.R., PESSOA, C.; MORAES, M.O.; FILHO, F.D.R.; ALVES, A.P.N.N. & COSTA-LOTUFO, L.V. *In vivo* growth-inhibition of Sarcoma 180 tumor by alginates from brown seaweed *Sargassum vulgare*. **Carboh. Polym.**, v. 69, p. 7-13, 2006.
- SOUSA, A.P.A.; BARBOSA, P.S.F.; TORRES, M.R.; MARTINS, A.M.C.; MARTINS, R.D.; ALVES, R.S.; SOUSA, D.F.; ALVES, C.D.; COSTA-LOTUFO, L.V. & MONTEIRO, H.S.A. The renal effects of alginates isolated from brown seaweed *Sargassum vulgare*. **J. App. Toxicol.**, v. 28, p. 364-369, 2008.
- SPORN, M.B. The war on cancer. **Lancet**, v. 347, p. 1377–1381, 1996.
- STRASSER, S.; GUERON, M.; WHITE, R.; LIFSHITZ, M. & APTE, R. Interleukin-6 release following scorpion sting in children. **Toxicon.**, v. 34, p. 389-392, 1996.
- STUART, R.W.; LEFKOWITZ, D.L.; LINCOLN, J.A.; HOWARD, K.; GELDERMAN, M.P. & LEFKOWITZ, S.S. Upregulation of phagocytosis and candidicidal activity of macrophages exposed to the immunostimulant acemannan. **Int. J. Immunopharmacol.**, v. 19, p. 75–82, 1997.

- SUN, J.; ZHANG, X.; BRODERICK, M. & FEIN, H. Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess reaction assay. **Sensors.**, v. 3, p. 276-284, 2003.
- TAGUCHI, T.; FURUE, H.; KIMURA, T.; KONDO, T.; HATTORI, T.; ITOH, T. & OSAWA, N. End point results of phase III study of lentinan. **Japan. J. Cancer Chemot.**, v. 12, p. 366 – 380, 1985.
- TAKAGUCHI, N.; SAITO, N.; NUNOURA, M.; KOUDA, K.; ODA, K. & FURUYAMA, N. Use of 5-FU plus hyperbaric oxygen for treatment malignant tumors: evaluation of antitumor effect and measurement of 5-FU in individual organs. **Cancer Chemot. Pharmac.**, v. 47, p. 11-14, 2001.
- TAO, Y.; ZHANG, L. & CHEUNG, P.C.K. Physicochemical properties and antitumor activities of water-soluble native and sulfated hyperbranched mushroom polysaccharides. **Carboh. Res.**, v. 341, p. 2261-2269, 2006.
- TIMMERMAN, J.M.; CZERWINSKI, D.K.; DAVIS, T.A.; HSU, F.J.; BENIKE, C.; HAO, Z.M.; TAIDI, B.; RAJAPAKSA, R.; CASPAR, C.B.; OKADA, C.Y.; VAN BECKHOVEN, A.; LILES, T.M.; ENGLEMAN, E.G. & LEVY, R. Idiotypic-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immune responses in 35 patients. **Blood**, v. 99, p. 1517–1526, 2002.
- TZIANABOS, A.O. Polysaccharides immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biological function. **Clin. Microb. Rev.**, v. 13, p. 523-533, 2000.
- UTO, T.; WANG, X.; SATO, K.; HARAGUCHI, M.; AKAGI, T.; AKASHI, M. & BABA, M. Targeting of antigen to dendritic cells with poly(γ -glutamic acid) nanoparticles induces antigen-specific humoral and cellular immunity. **J. Immunol.**, v. 178, p. 2979–2986, 2007.
- VENDITI, J.M. The National Cancer Institute antitumor drug discovery program, current and future perspective: a commentary. **Cancer Treat. Rep.**, v. 67, p. 767, 1983.
- VOLPERT, O.V., DAMERON, K.M., & BOUCK, N. Sequential development of an angiogenic phenotype by human fibroblasts progressing to tumorigenicity. **Oncogene**, v. 14, p. 1495–1502, 1997.
- VONDERHEIDE, R.H.; HAHN, W.C.; SCHULTZE, J.L. & NADLER, L.M. The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. **Immunity**, v. 10, p. 673-679, 1999.
- WALSER, M.; DAVIDSON, D.G. & ORLOFF, J. The renal clearance of alkali-stable inulin. **J. Clin. Invest.**, v. 34, p. 1520–1523, 1955.
- WASSER, S.P. Medicinal mushrooms as a source of antitumour and immunomodulating polysaccharides. **App. Microb. Biotech.**, v. 60, p. 258-274, 2002.
- WECK, M.M.; GRUNEBACH, F.; WERTH, D.; SINZGER, C.; BRINGMANN, A. & BROSSART, P. TLR ligands differentially affect uptake and presentation of cellular antigens. **Blood**, v. 109, p. 3890–3894, 2007.

- WEINBERG, R.A. The retinoblastoma protein and cell cycle control. **Cell**, v. 81, p. 323-330, 1995.
- WILLMENT, J.A.; MARSHALL, A.S.; REID, D.M.; WILLIAMS, D.L.; WONG, S.Y.; GORDON, S. & BROWN, G.D. The human β -glucan receptor is widely expressed and functionally equivalent to murine Dectin-1 on primary cells. **Eur. J. Immunol.**, v. 35, p. 1539–1547, 2005.
- WITROW, M.; ESTE, J.A.; MATEU, M.Q.; REYMEN, D.; ANDREI, G.; SNOEK, R.; IKEDA, S.; PAUWELS, R.; BIANCHINI, N.V.; DESMYTER, J. & DE CLERCQ, E. Activity of a sulfated polysaccharide extracted from the red seaweed *Aghardhiella tenera* against human immunodeficiency virus and other enveloped viruses. **Antiv. Chem. Chemot.**, v. 5, p. 297-303, 1994.
- WYLLIE, A.H.; KERR, J.F. & CURRIE, A.R. Cell death: the significance of apoptosis. **Int. Rev. Cytol.**, v. 68, p. 251-306, 1980.
- XIA, J.; TANAKA, Y.; KOIDO, S.; LIU, C.; MUKHERJEE, P.; GENDLER, S.J. & GONG, J. Prevention of spontaneous breast carcinoma by prophylactic vaccination with dendritic/tumor fusion cells. **J. Immunol.**, v. 170, p. 1980–1986, 2003.
- YALIN, W.; ISHURD, O.; CUIRONG, S. & YUANJIANG, P. Structure analysis and antitumor activity of (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans (cordyglucans) from the mycelia of *Cordyceps sinensis*. **Planta Med.**, v. 71, p. 381-384, 2005.
- YANG, Q.; JONG, S.; LI, X.; ZHOU, J.; CHEN, R. & XU, L. Antitumour and immunomodulating activities of the polysaccharide-peptide (PSP) of *Coriolus versicolor*. **J. Immun. Immunoph.**, v. 12, p. 29-34, 1992.
- YANG, Q. & YUN, Z. **Polysaccharopeptide (PSP) and the general aspects of its research**. In: Yang Q, editor. *Advanced Research in PSP*, 1999. Hong Kong: Hong Kong Association for Health Care Ltd; p. 29–38, 1999.
- YANG, X.; GUO, D.; ZHANG, J. & WU, M. Characterization and antitumor activity of pollen polysaccharide. **Int. Immunopharmacol.**, v. 7, p. 427-434, 2007.
- YOSHIZAWA, Y.; ENOMOTO, A.; TODOH, H.; AMETANI, A. & KAMINOGAWA, S. Activation of murine macrophages by polysaccharide fractions from marine algae (*Porphyra yezoensis*). **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 57, p. 1862–1866, 1993.
- YOSHIZAWA, Y.; TSUNEHIRO, J.; NOMURA, K.; ITOH, M.; FUKUI, F., AMETANI, A. & KAMINOGAWA, S. *In vivo* macrophage-stimulation activity of the enzyme-degraded water-soluble polysaccharide fraction from a marine alga (*Gracilaria verrucosa*). **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 60, p. 1667–1671, 1996.
- YUAN, H.M. & SONG, J.M. Preparation, structural characterization and in vitro antitumor activity of kappa-carrageenan oligosaccharide fraction from *Kappaphycus striatum*. **J. Appl. Phycol.**, v. 17, p. 7-13, 2005.

YUN, C.H.; ESTRADA, A.; VAN KESSEL, A.; GAJADHAR, A.A.; REDMOND, M.J. & LAARVELD, B. β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 4) oat glucan enhances resistance to *Eimeria vermiformis* infection in immunosuppressed mice. **Int. J. Parasitol.**, v. 27, p. 329-337, 1997.

ZHANG, P. & CHEUNG, P.C.K. Evaluation of sulfated *Lentinus edodes* α - (1 \rightarrow 3)-D-glucan as a potential antitumor agent. **Biosci. Biotechnol. Bioch.**, v. 66, p. 1052-1056, 2002.

ZHANG, M.; CUI, S.W.; CHEUNG, P.C.K. & WANG, Q. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. **Trends Food Sci. Tech.**, v. 18, p. 4-19, 2007.

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