



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ALEXIA NATHÁLIA BRÍGIDO ASSEF

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTICÂNCER DE UMA FRAÇÃO
POLISSACARÍDICA SULFATADA EXTRAÍDA DA ALGA MARINHA PARDA**
Dictyota caribaea EM CAMUNDONGOS

FORTALEZA

2015

ALEXIA NATHÁLIA BRÍGIDO ASSEF

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTICÂNCER DE UMA FRAÇÃO
POLISSACARÍDICA SULFATADA EXTRAÍDA DA ALGA MARINHA PARDA
Dictyota caribaea EM CAMUNDONGOS**

Monografia apresentada ao Departamento de
Biologia da Universidade Federal do Ceará,
como requisito parcial à obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas. Área de
concentração: Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Diego Veras Wilke.

FORTALEZA

2015

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

-
- A863a Assef, Alexia Nathália Brígido.
Avaliação do potencial anticâncer de uma fração polissacarídica sulfatada extraída da alga marinha parda *Dictyota caribaea* em camundongos / Alexia Nathália Brígido Assef. – 2015.
73 f. : il., color.
- Monografia (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Biologia, Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2015.
Orientação: Prof. Dr. Diego Veras Wilke.
1. Alga marinha. 2. Ensaios de seleção de medicamentos antitumorais. 3. Polissacarídeos. I. Título.

CDD 570

ALEXIA NATHÁLIA BRÍGIDO ASSEF

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTICÂNCER DE UMA FRAÇÃO
POLISSACARÍDICA SULFATADA EXTRAÍDA DA ALGA MARINHA PARDA
Dictyota caribaea EM CAMUNDONGOS**

Monografia apresentada ao Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas. Área de concentração: Farmacologia.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Diego Veras Wilke (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profª. Dra. Ana de Fátima Fontenele Urano Carvalho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Aos meus avós, Neide e José Maria, por terem me ensinado o valor das coisas e mostrado que a vida é cheia de obstáculos, mas que com fé, dedicação e esforço é possível enfrentá-los.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado forças para realizar esse trabalho.

Ao professor Dr. Diego Veras Wilke, por ter aceito me orientar durante a graduação e estar sempre disposto a ensinar e dar conselhos para o meu conhecimento científico com entusiasmo e atenção.

À professora Letícia Veras Costa-Lotuf, por ter me dado a oportunidade de entrar para o Laboratório de Oncologia experimental (LOE) e por sempre passar confiança e positividade para todos os seus alunos.

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

À profa. Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves, pela paciência e disponibilidade em ajudar com os testes histopatológicos.

Aos alunos do LOE, Andréa, Sarah, Stefânio, Cássia e todos aqueles que estiveram dispostos em ajudar com meus experimentos tão cansativos.

Ao Dr. José Delano Barreto Marinho Filho, por ter me ensinado, com muita paciência, todos os procedimentos e técnicas quando cheguei ao LOE.

Ao professor Leonardo Cinelli, por ter cedido parte do material necessário para a realização desse trabalho e pela disponibilidade em discutir os métodos utilizados.

Ao professor Dr. Roberto César Lima, por, gentilmente, aceitar participar da minha banca de defesa.

À professora Ana de Fátima Fontenele Urano, pelos conhecimentos passados com empolgação durante as aulas da graduação e por aceitar participar da minha banca com prontidão.

Aos amigos do LaBBMar: Katharine, Kayanny e Carol, pela forte amizade construída durante esse tempo; pelas brincadeiras, alegrias compartilhadas e apoio incessante; Eve, Laris e Elthon, pelo carinho e amizade e por sempre estarem dispostos a ajudar e ensinar. A todos que compõem o LaBBMar, pelo companheirismo e pelos momentos de descontração.

Ao meu companheiro de todas as horas e aventuras, Felipe Barros, por estar presente nos momentos mais importantes da minha vida acadêmica e pessoal; pelas conversas e discussões produtivas e por partilhar do mesmo amor que eu pela ciência. Obrigada pelo apoio e carinho incondicionais dedicados a mim durante a minha formação, por acreditar sempre no meu sucesso e pelo amor compartilhado!

Aos meus avós/pais, Neide e José Maria, por terem me permitido chegar até aqui com seus ensinamentos, amor e cuidado; sempre desejando o melhor para mim e me mostrando que o caminho certo é o da dedicação naquilo que faz. Sem vocês eu não seria nada!!

À minha amiga/irmã, Vanessa da Costa (*in memmorian*), por ter feito parte da minha vida, partilhar dos mesmos gostos; pelos conselhos, carinho e amizade dedicados a mim durante a sua passagem por aqui e por torcer por mim em qualquer circunstância. Saudades!

Aos meus pais, Elianne e Eirton, pelo amor, imenso carinho e por acreditarem sempre no meu potencial, torcendo pelo meu sucesso.

Aos demais familiares e amigos que me apoiaram e torceram pelas minhas conquistas em todas as etapas da minha vida, principalmente na acadêmica.

“Se vi mais longe, foi por estar sobre ombros
de gigantes.”

(Isaac Newton)

RESUMO

O ambiente marinho é reconhecidamente uma fonte importante de produtos naturais. Nesse contexto, entre as principais fontes de bioprospecção de fármacos estão as algas marinhas, pelo fato de sintetizarem moléculas bioativas e atóxicas como os polissacarídeos sulfatados. As algas possuem uma alta concentração de polissacarídeos que podem apresentar atividade anticâncer. O câncer é um importante problema de saúde pública mundial, sendo as neoplasias malignas a segunda causa de mortes no mundo. Considerando a necessidade de novas abordagens para o tratamento do câncer, novos mecanismos de ação estão sendo explorados para o desenvolvimento de medicamentos no combate a essa doença. O presente trabalho visou avaliar o potencial antitumoral de uma fração polissacarídica sulfatada extraída da alga marinha parda *Dictyota caribaea* (DCA), utilizando modelos *in vitro* e *in vivo*. A citotoxicidade foi testada *in vitro* através do ensaio do MTT contra a linhagem HCT-116 (câncer de cólon) nas concentrações de 50 e 100 µg/mL. Para os ensaios *in vivo* foram utilizados camundongos Swiss fêmeas pesando entre 28 e 30 g provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (BIOCEN - UFC). O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa Animal (CEPA) (#NS50). Os animais foram divididos em três grupos (n= 8 por grupo) e, posteriormente, tratados durante sete dias com salina (grupo controle), DCA 25 mg/Kg/dia ou DCA 50 mg/Kg/dia; via intraperitoneal. Foi avaliada a toxicidade da DCA através das análises de parâmetros bioquímicos e hematológicos e de possíveis alterações histopatológicas. Uma amostra de sangue foi coletada para análise bioquímica e hematológica no oitavo dia após o transplante do tumor. Após eutanásia, foi realizada coleta, pesagem e análises histológicas do tumor, rins, fígado e baço dos animais tratados. A DCA não exibiu citotoxicidade, contudo o crescimento do tumor apresentou uma inibição *in vivo* de aproximadamente 51%. Os animais tratados com DCA apresentaram um aumento significativo do peso do baço e pequenas alterações nos demais órgãos. Além disso, a quantidade de monócitos foi reduzida, mas a contagem de total leucócitos não apresentou diferença entre os grupos da DCA e o controle. As análises bioquímicas de TGO e TGP dos animais tratados com DCA apresentaram alterações, porém a análise da ureia não demonstrou diferença entre o tratamento e o controle. A redução do número de monócitos ocorreu possivelmente devido a uma migração dos mesmos para o microambiente tumoral e, de modo geral, esses resultados sugerem que o efeito antitumoral da DCA pode estar relacionado a um efeito imunomodulador.

Palavras-chave: *Dictyota caribaea*; polissacarídeos sulfatados; efeito antitumoral

ABSTRACT

The marine environment is recognized as an important source of natural products. In this context, among the main sources of bioprospecting drugs are the seaweeds, because they synthesize bioactive and non-toxic molecules such as sulfated polysaccharides. Algae have a high concentration of polysaccharides which may have anticancer activity. Cancer is a major public health problem worldwide, and malignant neoplasms the second leading cause of death worldwide. Considering the need for new approaches to the treatment of cancer, new mechanisms of action are being exploited for the development of drugs to combat this disease. The present work aimed to evaluate the antitumor potential from a sulfated polysaccharide fraction extracted from brown seaweed *Dictyota caribaea* using models *in vitro* and *in vivo*. The cytotoxicity was tested *in vitro* by MTT assay against strain HCT-116 (colon cancer) at concentrations of 50 and 100 ug / ml. For *in vivo* assay Swiss female mice were used weighing between 28 and 30 g from the Central Animal Facility of the Federal University of Ceará (BIOCEN - UFC). This work was approved by the Animal Ethics Committee of the Federal University of Ceará (CEPA) (# NS50). Animals were divided into three groups (n = 8 per group) and subsequently treated for seven days with saline (control group), DCA 25 mg / kg / day or DCA 50 mg / kg / day (IP). Were also evaluated possible changes in biochemistry, hematological and histopathological parameters of organs (kidney, spleen and liver), as well as the tumor. A blood sample was collected for biochemical and hematological analysis at day 8 post tumor transplant. After euthanasia, the tumor and the organs (spleen, kidneys and liver) was collected, weighed and histologically analyzed. DCA did not exhibit cytotoxicity, however the tumor growth was inhibited by 51%. The animals treated with DCA showed a significant increase in spleen weight and small changes in other organs. Furthermore, the amount of monocytes was reduced, but the total leukocyte count showed no difference between the control and DCA groups. The biochemical analysis of SGO-T and SGP-T of the treated animals showed changes, but the analysis of urea showed no difference between treatment and control. The decreased circulating of monocytes could be related to the migration of this cells to the tumor microenvironment and, generally, these results suggest that the DCA antitumor effect could be related with an immunomodulating effect.

Keywords: *Dictyota caribaea*; sulfated polysaccharides; antitumoral effect.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura básica repetitiva de galactanas tipo agarana.....	19
Figura 2 – Fragmentos de estruturas de fucoidans.....	20
Figura 3 – Capacidades adquiridas por células neoplásicas, necessárias ao desenvolvimento de tumores malignos.....	22
Figura 4 – Número de publicações sobre polissacarídeos sulfatados com atividade antitumoral desde a década de 1970 até 2015.....	25
Figura 5 – Esquema resumindo o desenho experimental do trabalho.....	28
Figura 6 – Imagem da alga <i>Dictyota caribaea</i>	29
Figura 7 – Local de coleta da alga.....	29
Figura 8 – Fluxograma da extração dos PST.....	30
Figura 9 – Conversão do sal de MTT (coloração amarela) à formazan (coloração púrpura).....	32
Figura 10– Esquema do ensaio <i>in vivo</i>	32
Figura 11– Peso do tumor dos animais tratados com salina estéril ou DCA.....	37
Figura 12– Peso do baço, rins e fígado dos animais tratados com salina estéril ou DCA..	37
Figura 13– Efeito da DCA sobre parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos transplantados com Sarcoma 180.....	39
Figura 14– Efeito da DCA sobre parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos transplantados com Sarcoma 180.....	42
Figura 15– Fotomicrografia do corte histológico (400x) de tumor de camundongos transplantados com S-180.....	44
Figura 16– Fotomicrografia do corte histológico (400x) dos rins de camundongos transplantados com S-180.....	46
Figura 17– Fotomicrografia do corte histológico (400x) do fígado de camundongos transplantados com S-180.....	48
Figura 18– Fotomicrografia do corte histológico (400x) do baço de camundongos transplantados com S-180.....	50
Figura 19– Esquema dos resultados encontrados no presente trabalho.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeito da DCA nos parâmetros bioquímicos.....	39
Tabela 2 – Efeito da DCA nos parâmetros Hematológicos.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCL2,CXCL8	Quimiocinas
GAGS	Glicosaminoglicanos Sulfatados
MTT	sal 3-(4,5-dimetil-tiazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio bromida
RPMI	meio de cultura Roswell Park Memorial Institue
HCT-116	Linhagem de células de câncer de cólon humano
CO ₂	Dióxido de carbono
NADH	Dinucleotídio de nicotinamida e adenina
NADPH	Fosfato de dinucleotídio de nicotinamida e adenina
mL	Mililitro
µg	Micrograma
LOE	Laboratório de Oncologia Experimental
S-180	Sarcoma 180
Mg	Miligramas
DCA	Fração polissacarídica sulfatada extraída da alga <i>Dictyota caribaea</i>
IL-1, IL-6	Interleucinas
Kg	Quilogramas
EPM	Erro Padrão da Média
PS	Polissacarídeo Sulfatado
PST	Polissacarídeo Sulfatado Total
TNF	Fator de Necrose Tumoral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Produtos naturais marinhos	15
1.2	Algas	16
1.2.1	<i>Considerações gerais</i>	16
1.3	Polissacarídeos sulfatados	18
1.3.1	<i>Fucanas sulfatadas</i>	19
1.4	Câncer	20
1.5	Polissacarídeos modificadores da resposta biológica	24
1.6	Relevância e Justificativa	25
2	OBJETIVOS	27
2.1	Geral	27
2.2	Específicos	27
3	MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1	Obtenção da alga marinha <i>Dictyota caribaea</i>	28
3.2	Extração e fracionamento dos polissacarídeos sulfatados totais (PST)	30
3.3	Ensaio para avaliação do potencial antitumoral	31
3.3.1	<i>Cultura de células</i>	31
3.3.2	<i>Atividade antitumoral in vitro</i>	31
3.3.3	<i>Atividade antitumoral in vivo</i>	32
3.3.3.1	<i>Animais</i>	33
3.3.4	<i>Modelo Sarcoma 180</i>	33
3.3.4.1	<i>Manutenção do tumor sarcoma 180</i>	34
3.3.4.2	<i>Transplante do tumor S180 e tratamento dos animais</i>	33
3.3.5	<i>Análise estatística</i>	35
4	RESULTADOS	36
4.1	Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i>	36
4.2	Avaliação do potencial antitumoral <i>in vivo</i>	36
4.3	Avaliação dos parâmetros Bioquímicos e Hematológicos	38
4.4	Análise Histopatológica	43
5	DISCUSSÃO	52
6	CONCLUSÕES	57
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

1 INTRODUÇÃO

1.1 Produtos Naturais Marinhos

O ambiente marinho cobre 70% da superfície da terra e 95% da sua biosfera tropical representa 34 dos 36 filos existentes e fornece uma variedade fascinante de biodiversidade, sendo superior a do ambiente terrestre. Os organismos marinhos produzem uma diversidade de moléculas sem precedentes pela incorporação de elementos como bromo, que não estão prontamente disponíveis para espécies terrestres. As pressões ecológicas do ecossistema marinho, incluindo competição por espaço, predação e um alto nível de simbiose entre diferentes espécies, são parcialmente responsáveis pelo exclusivo metabolismo secundário dos organismos marinhos (KONIG *et al.*, 1994).

Os produtos naturais, que podem ser metabólitos secundários ou macromoléculas, podem pertencer às mais diferentes classes de substâncias orgânicas. Diversos organismos sintetizam esses compostos e têm grande importância adaptativa, pois os processos que envolvem os metabólitos secundários irão determinar o sucesso e aumento da biodiversidade dos ecossistemas (PEREIRA & SOARES-GOMES, 2002).

De todas as fontes naturais de fármacos, o ambiente marinho é certamente a última grande fronteira. Evitado por muito tempo, apenas recentemente, este ecossistema foi reconhecido como fonte de produtos naturais com potencial terapêutico importante (FENICAL, 1997; JIMENO *et al.*, 2004). Os primeiros registros da utilização de produtos isolados de organismos marinhos datam de 1600 a.C., quando os Fenícios utilizavam a secreção de moluscos para produzir um corante de roupas denominado "Púrpura de Tyrian" (FAULKNER, 1992). Dentre os organismos marinhos, as esponjas e as algas, além de fornecerem o maior número de produtos naturais marinhos conhecidos, deram origem a cerca de 65% das patentes importantes acerca de moléculas antitumorais e antivirais (BONGIORNI & PIETRA, 1996).

Nos últimos anos, as pesquisas químicas e farmacológicas de organismos marinhos têm contribuído de forma valiosa para a descoberta de novas substâncias com potenciais bioativos para fins terapêuticos (BLUNT *et al.*, 2007). Porém, a fauna marinha brasileira ainda é pouco explorada na pesquisa por produtos naturais novos ou taxonomicamente relevantes que possuam atividades biológicas (BERLINCK *et al.*, 2004)

As algas marinhas representam a base da cadeia alimentar nos oceanos e são responsáveis por uma boa parte da atividade fotossintética global. Sua distribuição depende da temperatura e salinidade da água, da disponibilidade de luz solar, das correntes oceânicas e das condições físicas e químicas afins (EL GAMAL, 2010).

1.2 Algas Marinhas

1.2.1 Considerações Gerais

O termo “alga” refere-se a uma grande variedade de organismos que são, na sua maioria, remotamente relacionados uns aos outros, o que indica se tratar de um grupo polifilético, que possui representantes nos Domínios Eubacteria e Eukarya. Além disso, as algas têm semelhantes funções biológicas com as plantas por serem também produtores primários, contudo não compartilham uma história evolutiva comum e sua bioquímica difere significativamente (STENGEL; CONNAN; POPPER, 2011). Atualmente as algas marinhas são classificadas como pertencentes ao reino protista. Elas estão divididas em três grandes grupos: algas verdes (Chlorophyta), algas pardas ou marrons (Phaeophyta) e algas vermelhas (Rhodophyta) (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

As algas verdes podem ser unicelulares ou pluricelulares, ocorrendo vastamente em água doce e do mar, mas também podem ser encontradas em uma ampla variedade de hábitat, como a superfície da neve, os troncos de árvores, o solo e em simbiose com fungos (constituindo os líquens), protozoários e celenterados. Apresentam o amido como polissacarídeo de reserva e sua parede celular é constituída de celulose (RAVEN *et al.*, 2007). Elas são consideradas o grupo a partir do qual as plantas evoluíram.

As algas pardas são pluricelulares e predominantemente marinhas. Compreendem as algas mais conspícuas das águas temperadas, boreais e polares, mas também são encontradas em regiões tropicais. Existem somente cerca de 1.500 espécies, que variam

de formas microscópicas até as maiores macroalgas, que podem chegar a 60 metros de comprimento e pesar mais de 300 quilogramas. Apresentam a laminarina como polissacarídeo de reserva e sua parede celular é constituída de celulose e algina. As algas vermelhas são pluricelulares, particularmente abundantes em águas tropicais quentes. Porém, o número de espécies marinhas excede a soma de espécies pertencentes às divisões Phaeophyta e Chlorophyta. As algas vermelhas possuem 4.000 a 6.000 espécies distribuídas em aproximadamente 680 gêneros, dentre os quais poucas são unicelulares (RAVEN *et al.*, 2007).

Algumas espécies de algas pardas e vermelhas participam de maneira bastante abrangente na vida cotidiana do homem, através dos coloides extraídos dos seus talos. Existem alguns produtos de importância econômica, como ácidos algínicos (alginatos), agaranas e carragenanas, os quais são usados como matéria prima em vários segmentos da indústria alimentícia, farmacêutica, de cosméticos, têxtil, de bebidas e de biotecnologia (VIDOTTI & ROLLEMBERG, 2004).

A atual aplicação de compostos químicos isolados de diversas classes de algas marinhas é de interesse crescente. Desde 1975, algumas pesquisas com algas começaram a surgir abordando toxinas, bioprodutos e ecologia química. Mais de 15.000 novos compostos tiveram sua estrutura química determinada. Os ficocoloides (ágar, alginato e carragenana) vêm sendo extraídos de algas marinhas para o uso nas indústrias farmacêutica, de cosmético e alimentícia. As propriedades físico-químicas distintas dos alginatos confere-lhes aplicações na indústria alimentícia como agentes gelificante e espessante (CARDOZO *et al.*, 2007); farmacêutica, como microsferas para a liberação de drogas (CHAN *et al.*, 2002) e nas indústrias de papel e têxtil como espessante de corantes (TURK; SCHNEIDER, 2000).

Muitos trabalhos foram publicados sobre compostos isolados de algas com atividade biológica, demonstrando assim, a sua capacidade de produzir metabólitos diferentes daqueles encontrados em espécies terrestres, possuindo alta complexidade e diversidade ilimitada de propriedades farmacológicas e/ou propriedades biológicas. Nas últimas décadas a ênfase passou da extração de bancos naturais para maricultura e cultivo controlado para, dessa maneira, produzir novos produtos em grande escala (CARDOZO *et al.*, 2007).

As algas são conhecidas por sua riqueza de polissacarídeos, proteínas, sais minerais e vitaminas e seu baixo teor lipídico, embora haja diferenças entre as espécies. A maior parte dos polissacarídeos de algas não é digerida pelos seres humanos, sendo desta forma considerada fibra alimentar (GÓMEZ-ORDÓÑEZ; JIMÉNEZ-ESCRIG; RUPÉREZ,

2010), outros são extraídos de algas marinhas para o uso em indústrias farmacêuticas, de cosméticos e de alimentos (TURK; SCHNEIDER, 2000; CHAN *et al.*, 2002; CARDOZO *et al.*, 2007). Além disso, podem oferecer inúmeros compostos químicos que têm revelado importantes resultados nas mais variadas aplicações biológicas e industriais (CARDOZO *et al.*, 2007). Dentre estes compostos, destacam-se os polissacarídeos sulfatados (PS).

1.3 Polissacarídeos Sulfatados

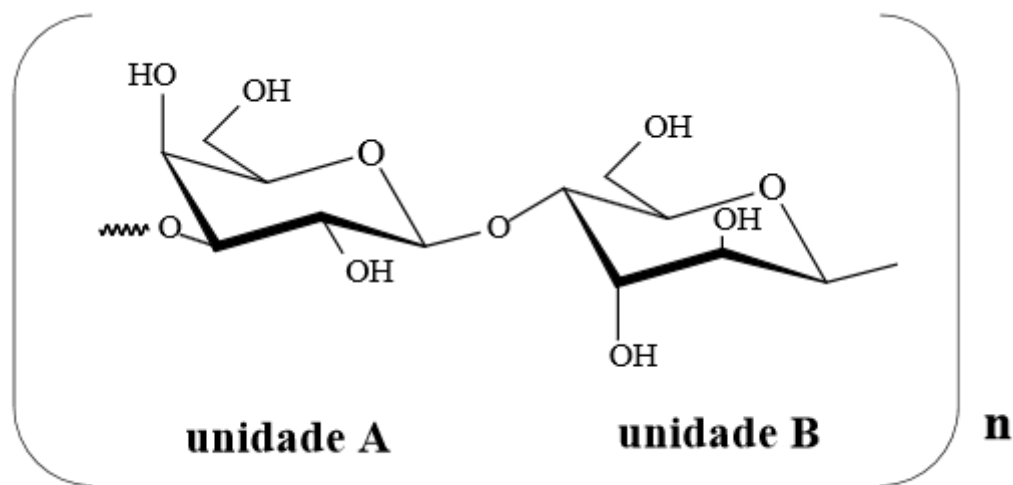
Os PS compreendem um grupo complexo de macromoléculas amplamente distribuídas entre os seres vivos e com uma gama de propriedades biológicas importantes (PAINTER, 1983). Estes polímeros apresentam grande variedade estrutural e caracterizam-se por apresentarem uma alta densidade de cargas negativas devido à presença de ésteres de sulfato e, em alguns casos, de resíduos de ácido hexurônico. Estes polímeros aniônicos são encontrados em organismos tão diversos quanto vertebrados, invertebrados e algas marinhas (MATHEWS, 1975).

O primeiro grupo de PS estudados foram os encontrados em animais. Nesses seres vivos os principais PS encontrados são os glicosaminoglicanos sulfatados (GAGS). Esses polímeros são polissacarídeos lineares com repetições de unidades dissacarídicas constituídas de um resíduo de açúcar não nitrogenado (ácido idurônico, ácido glucurônico, ou galactose) e de um resíduo de hexosamina (glucosamina ou galactosamina). Os GAGS se encontram ligados covalentemente a proteínas, formando um grupo de glicoconjugados complexos denominados de proteoglicanos (DIETRICH, 1984).

As algas marinhas são uma fonte abundante de PS. Diversos grupos já investigaram compostos dessa classe, tanto na elucidação da sua estrutura química, quanto na sua atividade biológica (PEREIRA *et al.*, 2005; FARIAS *et al.*, 2000). Estão presentes como estruturas complexas, altamente heterogêneas e muitas vezes ramificadas (Fig. 1) (MULLOY *et al.*, 1994), com diversas atividades biológicas importantes como antioxidante (SOUZA *et al.*, 2012; BARAHONA *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2012), anticoagulante (MULLOY *et al.*, 2000; CIANCIA *et al.*, 2010), anticâncer (LINS *et al.*, 2009; SITHRANGA BOOPATHY & KATHIRESAN, 2010), antiviral (BOUHLAL *et al.*, 2011; WIJESEKARA *et al.*, 2011; MOHSEN *et al.*, 2007), antialérgicas e antiinflamatórias (VO *et al.*, 2012). Os polissacarídeos das algas vermelhas são as galactanas, comercialmente conhecidas como ágar e carragenana;

das algas pardas são as fucanas; das algas verdes são heteropolissacarídeos que contêm galactose, xilose, arabinose, manose, ácido glicurônico ou glucose, predominando as arabino-galactanas (GUPTA, 2011; JIAO, 2011)

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



1.3.1 Fucanas sulfatadas

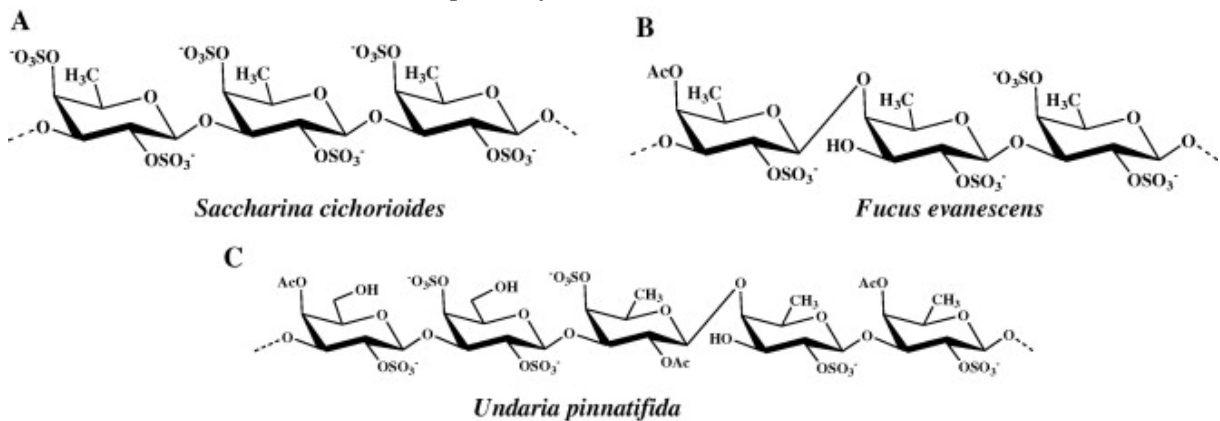
Nas algas pardas encontram-se polissacarídeos sulfatados que têm como principal característica a presença do monossacarídeo α-L-fucose sulfatada (ALBUQUERQUE *et al.*, 2004). O termo geral para determinar esses compostos é fucana. Porém, quando a fucana apresenta menos de 90% do monossacarídeo α-L-fucose elas são chamadas de fucoidanas ou heterofucanas (ROCHA *et al.*, 2006). A composição e estrutura de monossacarídeos de fucanas de algas se apresentam dependendo da espécie da alga, dos métodos de isolamento e purificação dos polissacarídeos e do período de coleta dessas algas (RIOUX *et al.*, 2010; SKRIPTSOVA *et al.*, 2010). As fucanas possuem frequentemente monossacarídeos como a fucose, D-xilose, D-galactose e D-tose e em menor quantidade D-manose e D-glucose (NISHINO *et al.*, 2000).

Recentemente, grupos de pesquisadores isolaram e determinaram as características estruturais de fucanas das algas pardas *Saccharina cichorioides*, *Fucus evanescens* e *Undaria pinnatifida* (ANASTYUK *et al.*, 2009; ANASTYUK *et al.*, 2010; VISHCHUK *et al.*, 2009; VISHCHUK *et al.*, 2011). Foi mostrado por eles que as fucanas

extraídas de *S. cichorioides* consistiam de resíduos de (1 → 3)- α -l-fucose, extraídas de *F. evanescens* continham (1 → 3)- e (1 → 4)- α -l-fucose alternados e extraídas de *U. pinnatifida* era constituída de (1 → 3)- e (1 → 4)- ligados a resíduos de α -l-fucose e β -d-galactose (Fig. 2). Essas observações também foram vistas em pesquisas de outros grupos (BILAN et al., 2002; SYNYTSYA et al., 2010).

Estudos anteriores indicaram que a presença de grupo sulfato (HAROUN-BOUHEDJA, ELLOUALI, SINQUIN, & BOISSON-VIDAL, 2000), a massa molecular (NISHINO et al., 1991; YANG et al., 2008), a composição monossacarídica e a estrutura da cadeia principal de fucanas (PATANKAR, OEHNINGER, BARNETT, WILLIAMS & CLARCK, 1993) tem uma enorme influência na sua atividade biológica. Desta forma, fucanas de baixa massa molecular (< 2000 Da), principalmente contendo resíduos de fucose e uma grande quantidade de grupos sulfato, possuem atividade antitumoral maior do que heterofucanas de alta massa molecular e com baixo grau de sulfatação (COLE & JAYSON, 2008; HAROUN-BOUHEDJA et al., 2000; KOYANAGI et al., 2003)

Figura 2: Fragmentos de estruturas de fucoidanas extradas de *Saccharina cichorioides* (A), *Fucus evanescens* (B), e *Undaria pinnatifida* (C).



1.4 Câncer

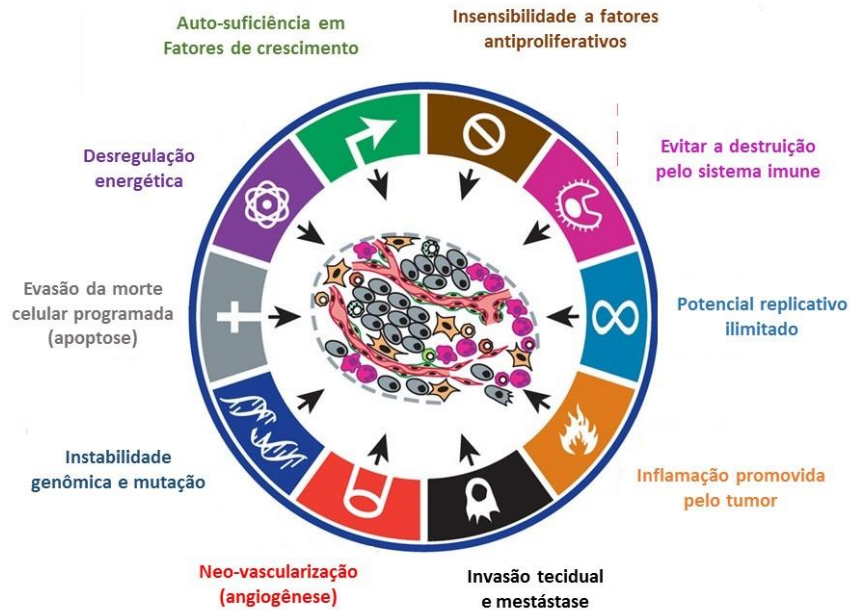
O câncer é a primeira causa de morte em países desenvolvidos e a segunda em países em desenvolvimento (JEMAL, 2011), sendo responsável por mais de seis milhões de óbitos a cada ano, representando cerca de 13% de todas as causas de morte no mundo. Embora as maiores taxas de incidência de câncer sejam encontradas em países desenvolvidos, dos dez milhões de casos novos anuais de câncer, cinco milhões e meio são diagnosticados

nos países em desenvolvimento (WHO, 2015). Em 2030, a carga global será maior que 21,7 milhões de novos casos de câncer e 13,2 milhões de mortes por câncer, devido ao envelhecimento da população, a redução da taxa de mortalidade infantil e de mortes por doenças infecciosas em países em desenvolvimento (International Agency for Research on Cancer – IARC, 2014). No Brasil, a estimativa é de mais de 576.580 novos casos de câncer em 2015 (Ministério da Saúde; INCA, 2014).

O câncer é um grupo de doenças que pode ser caracterizado por um crescimento e propagação descontrolados das células. Se essa propagação não for controlada, pode resultar em morte (American Cancer Society, 2008). A habilidade de invadir tecidos adjacentes e metastizar são características que definem o câncer. Após a transformação de células normais em células malignas por meio mutações genéticas que geram crescimento celular descontrolado, as células cancerosas proliferam-se rapidamente, invadem tecidos adjacentes e metastizam, ou seja, migram através da corrente sanguínea ou dos vasos linfáticos, estabelecendo tumores secundários em órgãos distantes do tumor primário (FIDLER,2003). Existem mais de 100 tipos diferentes de câncer, além de diversos subtipos dependendo do órgão afetado. Além disso os genótipos das células cancerígenas são uma manifestação de seis alterações essenciais na fisiologia da célula que resultam em defeitos nos circuitos regulatórios que são responsáveis pela proliferação celular normal e homeostase (Fig 3): auto-suficiência em fatores de crescimento; insensibilidade a fatores antiproliferativos; evasão da morte celular programada (apoptose); potencial replicativo ilimitado; neo-vascularização (angiogênese); invasão tecidual e metástase. Todas essas alterações representam a capacidade das células cancerígenas em burlar o sistema imune e conseguir se estabelecer nos diversos órgãos e tecidos do corpo (HANAHAN e WEINBERG (2000).

Na última década, Hanahan e Weinberg (2011) realizaram uma nova revisão bibliográfica e adicionaram quatro outras características importantes para a tumorigênese e potencialmente comuns à grande maioria dos cânceres (Fig 3): desregulação energética, evasão da destruição pelo sistema imune, inflamação e instabilidade genômica. Além disso, as células tumorais exibem uma outra dimensão de complexidade: elas contêm um repertório de células recrutadas, aparentemente normais que contribuem para a aquisição de traços característicos, criando o “microambiente tumoral”.

Figura 3: Capacidades adquiridas por células neoplásicas, necessárias ao desenvolvimento de tumores malignos. Adaptado de Hanahan e Weinberg (2011).



O câncer pode ser causado por fatores externos como tabagismo, infecção por microorganismos, dieta; e internos como mutações hereditárias, condições hormonais e imunológicas. Esses fatores podem agir em conjunto ou isoladamente causando o câncer. Muitos anos podem passar sem que o câncer seja detectado e isso prejudica no tratamento do mesmo (American cancer society, 2008). Diferentes estratégias terapêuticas, como quimioterapia, radioterapia e cirurgia têm sido utilizados para tratar os diversos tipos de câncer. Infelizmente, vários desses tratamentos trazem apenas poucos benefícios, além disso, há complicações indesejáveis a longo prazo e efeitos colaterais muitas vezes limitadores para o prosseguimento do tratamento (CHEVOLOT, 1999).

Os tumores primários, na maioria das vezes, são tratados pela combinação de terapias, incluindo cirurgia, radioterapia local e quimioterapia. Mesmo quando o tumor foi aparentemente eliminado, micrometástases de células tumorais dormentes (células tronco tumorais) frequentemente levam à reincidência do tumor e fracasso do tratamento. Para combater o câncer com a maior eficácia é necessário desenvolver estratégias eficientes para

matar as células tumorais pelo uso de agentes quimioterapêuticos e também tentar estimular uma resposta imune do hospedeiro para manter as possíveis células tumorais residuais sob controle (ZITVOGEL et al., 2008). Muitos procedimentos terapêuticos usados em oncologia atualmente podem diminuir a resposta imune contra tumores. Diversos quimioterápicos possuem importante efeito colateral imunossupressor tanto diretamente, pela morte ou inativação das células efectoras imunes que combatem tumores, quanto indiretamente, pela anergia ou paralisia do sistema imune (ZITVOGEL et al., 2008)

Vários mecanismos podem ser utilizados para aprimorar os resultados das terapias citotóxicas ou radioterápicas de combate ao câncer, como a produção de anticorpos monoclonais e outros imunomoduladores que ativam e maturam as células dendríticas e co-estimulam células T e outros linfócitos, além da inibição de moléculas derivadas de tumores capazes de desencadear anergia do sistema imune. Em adição, a terapia com imunoadjuvantes pode potencializar e sustentar a resposta imune antitumoral subsequente, evitando a reincidência do tumor neoplásico (HAYNES et al., 2008; ZITVOGEL et al., 2008).

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

A inflamação envolve uma resposta bem coordenada do sistema imune inato e adquirido após infecção ou injúria tecidual por fatores exógenos ou endógenos. Qualquer distúrbio na homeostase celular, como mutações genéticas que desregulam os mecanismos de apoptose, por exemplo, ativa as células da imunidade inata, que são a primeira linha de defesa do corpo (HUSSAIN; HARRIS, 2007). O microambiente tumoral é caracterizado pela infiltração de leucócitos como macrófagos (TAM, do inglês “tumor-associated macrophages”), neutrófilos, células dendríticas, eosinófilos, mastócitos e linfócitos, presença de polipeptídeos mensageiros da inflamação, representados pelas citocinas, como o fator de necrose tumoral (TNF), interleucinas (IL-1, IL-6), interferons, quimiocinas como CCL2 e CXCL8, mediadores citotóxicos incluindo espécies reativas de oxigênio (ERO's), proteases

serínicas e cisténicas e metaloproteinases (COUSSENS; WERB, 2002; COLOTTA et al., 2009).

1.5. Polissacarídeos modificadores da resposta biológica

Muitos artigos publicados indicam o potencial antitumoral de Polissacarídeos sulfatados (PS) tanto *in vivo* como *in vitro* (SILVA et al, 2005; PEREIRA et al, 2002; KOYANAGI et al, 2003). Os PS agem por vários mecanismos para impedir o crescimento, proliferação de células tumorais, induzem a apoptose de células cancerígenas, além de estimular o sistema imune do indivíduo (DIETRICH et al, 1995). Somando-se a isso, há também polissacarídeos que têm capacidade comprovada de modular a proliferação e migração de células endoteliais vasculares através da alteração da ligação de fatores de crescimento com seus receptores celulares, impedindo assim a angiogênese e desenvolvimento de metástases (ROCHA et al, 2001).

A busca por polissacarídeos como agentes antitumorais intensificou-se nas últimas décadas (Fig 4) devido à descoberta de suas propriedades terapêuticas e sua baixa toxicidade, diferente dos efeitos adversos causados pela quimioterapia e radioterapia (TZIANABOS, 2000; PAULSEN, 2001; SCHEPETKIN; QUINN, 2006). Muitas drogas potencialmente antitumorais apresentam consideráveis efeitos colaterais. A toxicidade dessas substâncias contra células normais limita o seu uso clínico. Assim, a descoberta de novas drogas ativas contra tumores com baixa toxicidade associada para células não tumorais e poucos efeitos colaterais se tornou um importante alvo da ciência biomédica (OOI; LIU, 2000). Atualmente 3 polissacarídeos (PSK ou Krestin, lentinana e esquizofilana) obtidos de fungos foram aprovados para uso no tratamento de neoplasias no Japão e na China (LEMIESZEK & RZESKI, 2012).

Figura 4. Número de publicações sobre polissacarídeos sulfatados com atividade antitumoral desde a década de 1970 até 2015. Resultados da busca no ScienceDirect utilizando as palavras-chave: "sulfated polysaccharides antitumor" no dia 24/05/2015.

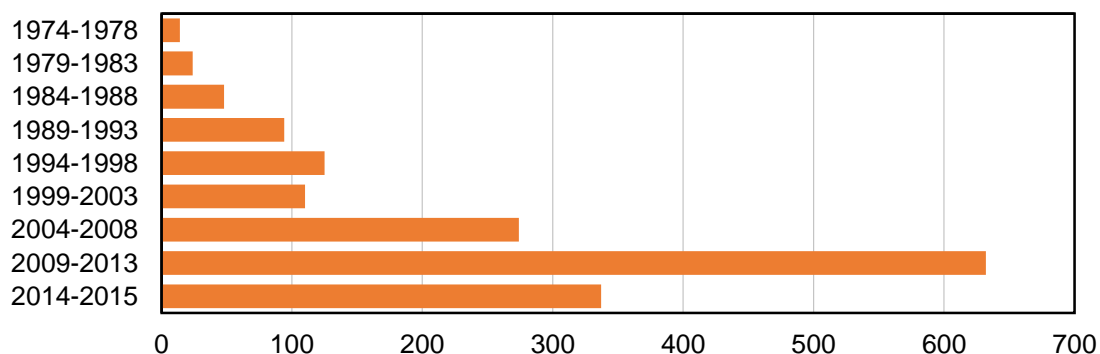
Embora os mecanismos de ação das atividades antitumoral e imunomodulatória dos polissacarídeos não estejam completamente esclarecidos, tais propriedades são atribuídas à ativação inespecífica do sistema imune do hospedeiro, com modulação do sistema complemento e estimulação de macrófagos (WANG et al.,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

Os estudos clínicos têm demonstrado que os polissacarídeos modificadores da resposta biológica são capazes de melhorar a qualidade de vida e prolongar a sobrevivência dos pacientes. Os parâmetros normalmente utilizados para avaliar a qualidade de vida são o apetite, sono, náuseas, vômitos, dores abdominais ou diarreias (KIMURA et al., 2003; NAKANO et al., 1999)

1.6. Relevâncias e Justificativa

A natureza tem sido uma fonte de medicamentos para a humanidade há milênios, e durante o século passado, muitos medicamentos úteis foram desenvolvidos a partir de fontes naturais (NEWMAN; GRAGG, 2010). A utilização dos recursos marinhos permaneceu adormecida até meados dos anos de 1960, quando pesquisadores dos Estados Unidos, Europa e Japão começaram a coletar, extrair e explorar a diversidade química da vida marinha (FENICAL, 2006). Desde então, têm sido realizados esforços em todo o mundo visando o isolamento de novos metabólitos de organismos marinhos (KELECOM, 2002).

Esses bioprodutos tornaram-se candidatos a novas drogas, e muitas moléculas se encontram no estágio pré-clínico e algumas já estão no mercado, como a citarabina (Aracytin®) usado para tratar leucemias, a ecteinascidina ou trabectedina (Yondelis®) utilizada em pacientes com sarcomas avançados de tecidos moles, a ômega-conotoxina ou



ziconotídeo (Prialt), usado para tratar dor neuropática crônica em pacientes refratários a morfina, e o mesilato de eribulina (Halaven) usado para tratar câncer de mama metastático (CRAGG & NEWMAN, 2013; HAEFNER, 2003). Embora muito promissores, quando se trata de PS, ainda não há exemplos obtidos de fonte marinha em estudos avançados para tratamento do câncer. Porém, com o aumento do interesse (Fig.1) no potencial antitumoral dos PS, é bem provável que esse cenário mude nos próximos anos.

A associação de polissacarídeos nos tratamentos minimiza os efeitos tóxicos provocados pela quimioterapia e pode ser mostrado experimentalmente em modelos *in vivo* (LINS *et al.*, 2010). Além disso os PS ainda têm a vantagem de poderem ser ativos por via oral em alguns casos, como mostrado pelo grupo do Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) da UFC (SOUSA *et al.*, 2007). Levando-se em consideração que o potencial farmacológico dos PS das algas faz parte de uma área de estudos ainda considerada pouco explorada, mas em franca e promissora expansão, mais estudos com esses compostos merecem ser avaliados. Além disso, a costa brasileira possui extensão continental e alta diversidade de espécies, principalmente de algas multicelulares, o que representa um grande potencial para a descoberta de novos fármacos.

Portanto, estudos para investigação da atividade biológica dos PS e seus mecanismos de ação, bem como a elucidação da estrutura destes compostos representa uma valiosa estratégia para que se possa gerar produtos biotecnológicos com aplicação direta na saúde humana.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o possível efeito antitumoral dos polissacarídeos sulfatados (PS) extraídos da alga marinha *Dictyota caribaea* utilizando modelos *in vitro* e *in vivo*.

2.2 Objetivos Específicos

- Isolar os PS da alga marinha *Dictyota caribaea* (DCA);
- Avaliar a possível atividade citotóxica *in vitro* da DCA contra linhagens de câncer de cólon (HCT-116);
- Avaliar o potencial antitumoral da DCA *in vivo* utilizando o modelo Sarcoma 180;
- Avaliar possível toxicidade através de análise histopatológica dos rins, fígado, baço e tumor dos animais tratados e dos parâmetros bioquímicos e hematológicos dos animais tratados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

As etapas do trabalho consistiram em coleta, identificação, extração e purificação de DCA, seguido dos ensaios *in vitro* e *in vivo* utilizando o modelo do Sarcoma 180 (S-180) (Fig 5).

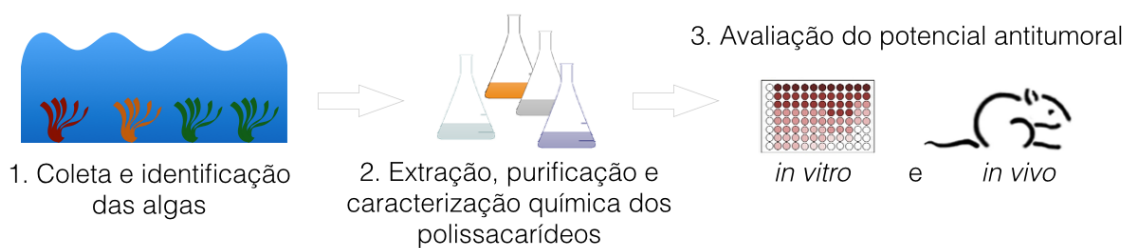


Figura 5. Esquema resumindo o desenho experimental do trabalho

3.1 Obtenção da alga marinha *Dictyota caribaea*

Amostras da espécie *D. caribaea* (Fig. 6) foram coletadas na Praia Vermelha, município de Macaé, Rio de Janeiro (Fig. 7). O material coletado foi levado para o Laboratório Integrado de Prospecção em Produtos Bioativos da Universidade Federal do Rio de Janeiro e o processamento e identificação realizados sob orientação do Prof. Dr. Leonardo Paes Cinelli. Após a limpeza da alga, realizou-se uma extração enzimática e, em seguida, o produto foi precipitado em crescentes concentrações de etanol. Os polissacarídeos totais e respectivas frações utilizadas foram enviados para o Laboratório de Oncologia Experimental do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará.

Figura 6. Imagem da alga *Dictyota caribaea*.



Divisão: Phaeophyta
Ordem: Dictyotales
Família: Dictyotaceae
Gênero: Dictyota
Espécie: *Dictyota caribaea*

Fonte: <http://macroalgae.org/portal/collections/individual/index.php?occid=87839>

Figura 7. Local de coleta da alga marinha

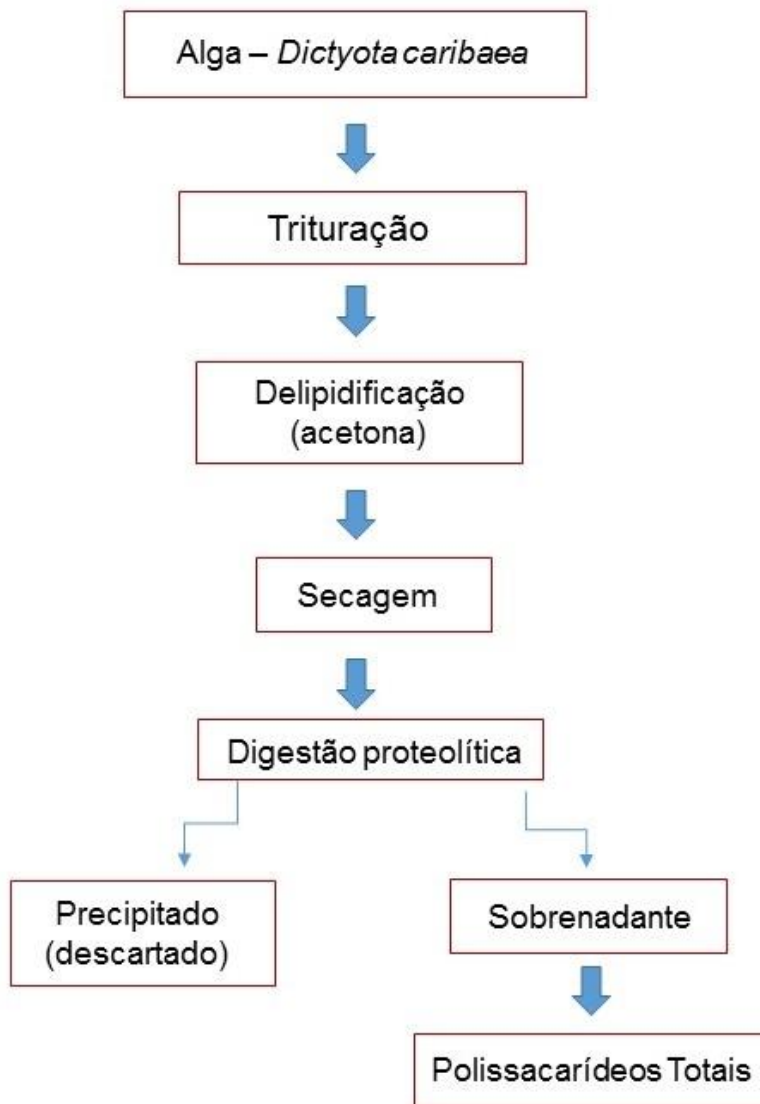


Fonte: GOOGLE. Google Earth website. <http://earth.google.com>

3.2 Extração e fracionamento dos polissacarídeos sulfatados totais (PST)

A alga foi limpa e posteriormente desidratada e triturada. Após o processo de delipidificação com acetona, o extrato passou por uma secagem e extração enzimática com papaína a fim de se obter o polissacarídeo sulfatado total presente no sobrenadante da amostra; o precipitado foi descartado (Fig 5). A partir do polissacarídeo total da *D. caribaea* foram feitas precipitações em álcool na concentração de 9% deste, obtendo-se a fração F9 (DCA), posteriormente utilizada nos ensaios biológicos deste trabalho.

Figura 8. Fluxograma da extração dos PST



3.3 Procedimentos experimentais

3.3.1 Cultura de células

A linhagem de células tumorais HCT-116 (câncer de cólon humano) foi adquirida do banco de células do RJ e mantida no Ecotox.

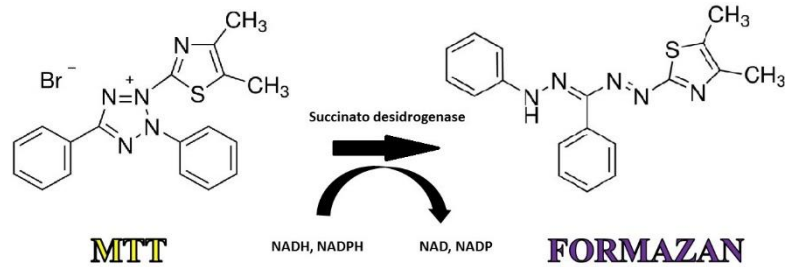
As células foram cultivadas em garrafas plásticas para cultura utilizando o meio de cultura Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640), suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de antibióticos. As células foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ sendo observado o crescimento celular com ajuda de microscópio de inversão todos os dias. Quando necessário, as células foram repicadas e mantidas em meio de cultura estéril.

3.3.2 Atividade antitumoral *in vitro*

O potencial antitumoral foi inicialmente avaliado *in vitro*, através da determinação da citotoxicidade nas linhagens de células tumorais HCT-116 (câncer de cólon humano) na concentração de 50 e 100µg/mL com 72 h de incubação através do teste do MTT.

Este ensaio consiste numa análise colorimétrica que quantifica indiretamente as células viáveis, baseada na redução do sal 3-(4,5-dimetil-tiazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio bromida (MTT), um composto de cor amarela, a formazan, de coloração púrpura (Fig. 9), pelos substratos celulares NADH, NADPH e é convertido pela enzima Succinato-desidrogenase (Mosmann, 1983; Berridge & Tan, 1993). Dessa forma, a redução do MTT a formazan, será diretamente proporcional à atividade mitocondrial e a viabilidade celular.

Figura 9. Conversão do sal de MTT (coloração amarela) à formazan (coloração púrpura).

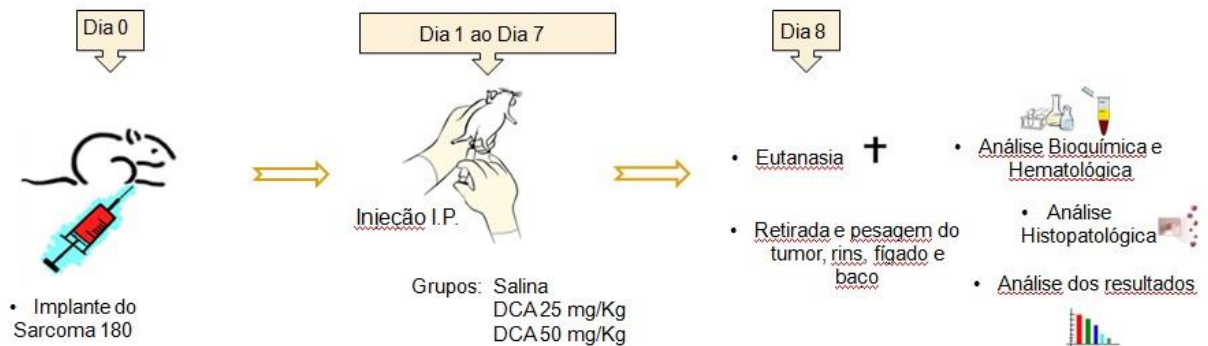


As amostras foram incubadas em concentração única de 50 µg/mL durante 72 h e as absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro de placa a 595 nm.

3.3.3 Atividade antitumoral *in vivo*

O S-180 foi inoculado subcutaneamente no dia 0 e, após 24 horas, os animais foram tratados por 7 dias com DCA. Todos os procedimentos com animais foram realizados de acordo com a legislação Brasileira para o uso de animais (Lei arouca” No 11.724/2008). Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética animal da Universidade Federal do Ceará (UFC).(#NS50) (Fig. 10)

Figura 10. Esquema do ensaio *in vivo*



IP: intraperitoneal.

3.3.3.1 Animais

Os animais utilizados na avaliação da atividade antitumoral *in vivo* foram camundongos (*Mus musculus* Swiss) fêmeas pesando entre 28 e 30g provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (BIOCEN - UFC). O animais permaneceram ao menos 7 dias antes da realização do experimento para que se adaptassem às novas condições da sala de experimentação do LOE. Todos os animais foram mantidos em estantes ventiladas com ciclo claro/escuro de 12h/12h, na temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e receberam ração comercial (Purina, São Paulo) e água tratada da rede concessionária estadual (CAGECE) *ad libitum* durante o período do experimento.

3.3.4 Modelo do Sarcoma 180

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

3.3.34.1 Manutenção do Tumor Sarcoma 180

O Sarcoma 180 (S-180) é um tumor sólido que pode ser mantido sob a forma ascítica na cavidade peritoneal de camundongos Swiss. Para a manutenção desse tumor na forma ascítica, primeiramente foi induzida a morte do animal de manutenção (ou animal doador) por deslocamento cervical e foi feita assepsia da barriga com álcool etílico 70% e algodão. Em seguida retirou-se aproximadamente 0,5 mL do tumor através de punção com seringa na cavidade peritoneal e diluir em 5 mL de Ringer lactato contendo gentamicina (0,2 mg/mL). A seguir, realizou-se a contagem das células em câmara de Neubauer em microscópio invertido e diluiu-se para 4×10^6 das células/mL. Por fim, injetou-se 0,5 mL da solução de células S-180 diluídas na cavidade peritoneal dos animais receptores saudáveis. A

cada dez dias após a inoculação, essas células tumorais foram retiradas do animal doador e aplicadas em outros animais saudáveis, a fim de manter o tumor.

3.3.4.2 Transplante do tumor S180 e tratamento dos animais

Para a avaliação do potencial antitumoral *in vivo*, a morte de um animal doador foi induzida por deslocamento cervical. O animal escolhido tinha entre 6 e 8 dias transcorridos após o transplante do S-180. Desse animal doador, foi retirado um volume de aproximadamente 5 mL do tumor ascítico localizado na cavidade peritoneal através da punção com seringa. Após esse procedimento foi preparada uma suspensão de células contendo o líquido ascítico com 5 mL de Ringer lactato contendo gentamicina (0,2 mg/mL). A contagem dessas células foi realizada na câmara de Neubauer e, posteriormente, diluiu-se na concentração de 4×10^6 células/mL com solução de Ringer Lactato contendo gentamicina (0,2 mg/mL).

Foram formados grupos de 8 animais para: o controle negativo, tratados com solução salina, e o grupo experimental, tratados com DCA. No dia zero foi realizado o transplante do tumor Sarcoma 180, através da injeção de 2×10^6 células/0,5 mL na axila esquerda pela via sub-cutânea dos camundongos receptores. O tratamento transcorreu por 7 dias consecutivos tendo início 1 dia após a inoculação do tumor. No primeiro dia de tratamento, os animais foram pesados e tratados com 0,2mL de solução salina ou de DCA nas doses de 25 ou 50 mg/kg de animal, obedecendo sempre o mesmo horário. Um dia após o fim do tratamento, a indução da morte ocorreu por deslocamento cervical.

Os parâmetros avaliados foram: peso do tumor e a variação de peso relativo dos órgãos dos animais. Exames bioquímicos e hematológicos foram realizados sob a supervisão da profa. Dra. Nylane Maria Nunes Alencar e as possíveis alterações histopatológicas, sob supervisão da profa. Dra. Ana Paula Negreiros, também foram realizadas nos principais órgãos internos envolvidos com a toxicidade de drogas como rim, baço e o fígado, assim como no tumor.

3.3.5 Análise estatística

O percentual de inibição tumoral foi calculado a partir da fórmula (Machon et al., 1981):

$$IT\% = [(C - T)/C] \times 100$$

IT%: Percentagem da inibição tumoral

C: média dos pesos dos tumores do grupo controle (salina)

T: média dos pesos dos tumores dos grupos tratados (DCA)

O peso dos órgãos foi normalizado tendo como referência 100g de massa corpórea do animal:

$$P_N = P_O \times 100g / P_A$$

P_N: Peso normalizado do órgão (g/100g massa corpórea)

P_o: Peso do órgão (g)

P_A: Peso do animal (g)

A análise estatística dos dados foi obtida através do programa GraphPad Prism versão 5.0. Os resultados que obedeciam a uma distribuição paramétrica foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) seguido pelo teste de Newman keuls.

Nos parâmetros bioquímicos e hematológicos, os resultados foram representados pela Média ± Erro Padrão da Média (EPM) com p<0,05 caracterizando o grau de significância.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da citotoxicidade *in vitro*

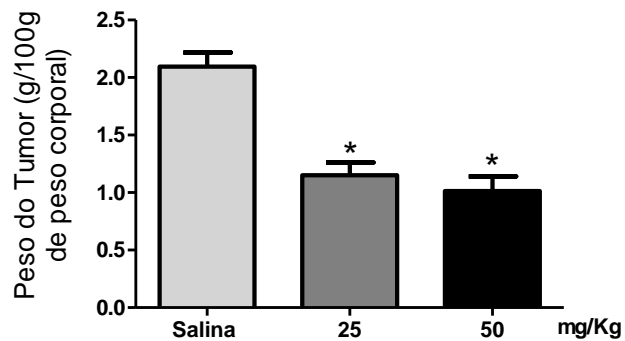
A citotoxicidade da fração polissacarídica sulfatada da alga *D. caribaea* foi avaliada contra a linhagem de células tumorais HCT-116 através do teste colorimétrico do MTT. O efeito da DCA sobre a linhagem tumoral foi determinado e não apresentou citotoxicidade na concentração de 100 µg/mL após 72 h de incubação.

4.2 Inibição do crescimento tumoral *in vivo*

O potencial antitumoral *in vivo* da DCA foi avaliado utilizando camundongos Swiss transplantados com tumor Sarcoma 180. O tumor sólido de cada animal tratado foi pesado. Os resultados foram expressos como a média da massa tumoral (g/100 g de massa corpórea) de cada grupo. A massa tumoral do grupo controle negativo (administrado com solução salina de NaCl 0,9%) foi de 2,09 g. Nos grupos tratados com DCA foram obtidos os valores médios de 1,15 g e 1,01 g para as doses de 25 e 50 mg/kg/dia, respectivamente (Fig. 11). A análise de variância da massa tumoral dos grupos tratados revelou que a DCA, em ambas doses utilizadas, foi capaz de inibir o crescimento do tumor nos animais transplantados com Sarcoma 180. Os animais tratados com a dose de 25 mg/Kg/dia apresentaram percentuais de inibição tumoral de 40% e os que foram tratados com a dose de 50 mg/Kg/dia apresentaram inibição de 51% (Fig. 11).

O peso do baço, rins e fígado também foi determinado. Os animais tratados com DCA na dose de 50 mg/Kg/dia apresentaram um aumento do peso dos rins e baço (Fig. 12- a,b) e o peso do fígado não foi alterado em nenhuma das doses (Fig. 12- c) quando comparado ao grupo salina.

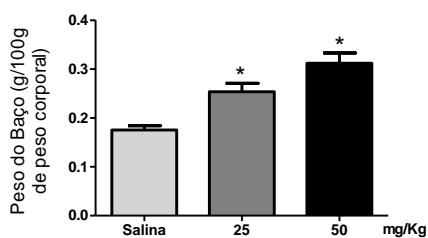
Figura 11. Peso do tumor dos animais tratados com salina estéril ou fração polissacarídica sulfatada da alga *Dictyota caribaea* (25 e 50 mg/Kg/animal).



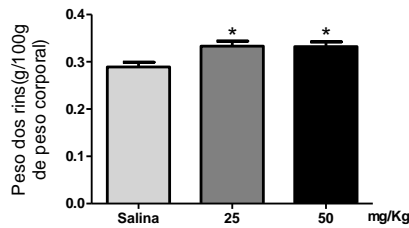
Efeito do polissacarídeo extraído de *Dictyota caribaea* (DCA) sobre o crescimento tumoral em camundongos transplantados com Sarcoma 180 tratados por via intraperitoneal. O controle negativo foi administrado com NaCl 0,9%. Resultados expressos como média \pm E.P.M. * $P < 0,05$ comparado com salina por ANOVA seguido por Newman Keuls, com $n = 8$ para cada grupo utilizado.

Figura 12. Peso do a) baço, b) rins e c) fígado dos animais tratados com salina estéril ou fração do polissacarídeo sulfatado extraído de *Dictyota caribaea* (25 e 50 mg/Kg/animal).

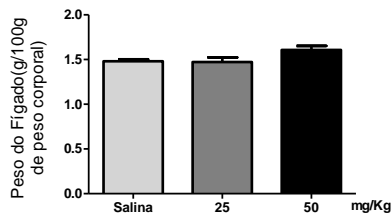
a)



b)



c)



Efeito do polissacarídeo extraído de *Dictyota caribaea* (DCA) sobre o peso do órgãos (rins, baço e fígado) em camundongos transplantados com Sarcoma 180 tratados por via intraperitoneal. O controle negativo foi administrado com NaCl 0,9%. Resultados expressos como média \pm E.P.M. * $P < 0,05$ comparado com salina por ANOVA seguido por Newman Keuls, com $n = 8$ para cada grupo utilizado.

4.3 Avaliação dos parâmetros Bioquímicos e Hematológicos

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

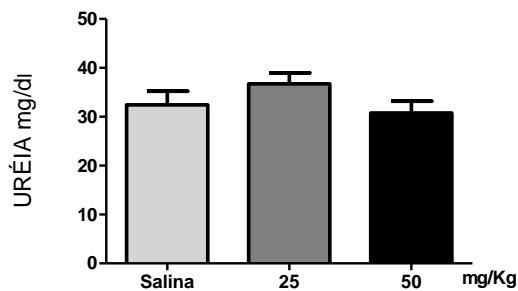
A análise bioquímica do sangue dos animais tratados com DCA em ambas as doses mostrou que houve alteração nos níveis séricos das enzimas transaminase glutâmico pirúvica (TGP) e transaminase glutâmico oxalacética (TGO) quando comparados ao grupo salina (Tabela 1), porém não foi observada alteração nos níveis plasmáticos de ureia (Fig 13).

A análise hematológica dos animais transplantados com tumor S-180 pode ser observada na Tabela 2. A contagem total de leucócitos e a porcentagem de neutrófilos e linfócitos não apresentaram diferenças significativa nos grupos tratados com DCA quando comparados ao grupo salina (Fig. 14- b). Contudo, houve um aumento significativo ($p < 0,05$) da contagem de plaquetas nos grupos tratados com DCA quando comparados ao grupo salina

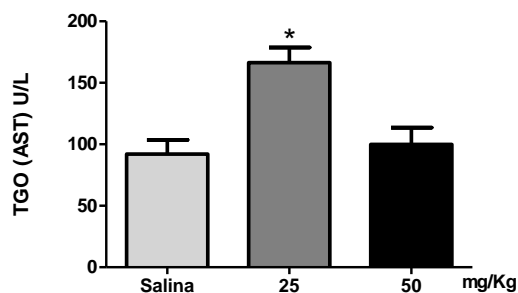
(Fig. 13- a). A contagem diferencial de monócitos apresentou uma significativa diminuição nos grupos tratados com DCA quando comparado ao grupo controle.

Figura 13. Efeito da fração polissacarídica sulfatada extraída da alga *Dictyota caribaea* (DCA) sobre parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos transplantados com Sarcoma 180. Os animais foram tratados por via intraperitoneal durante sete dias consecutivos, a partir do primeiro dia após o implante tumoral.

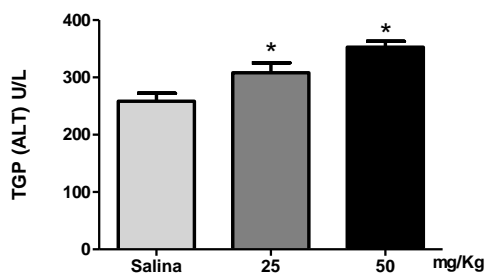
a)



b)



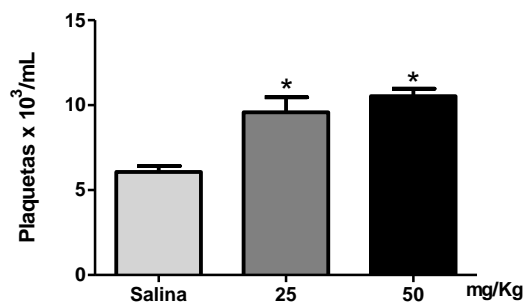
c)



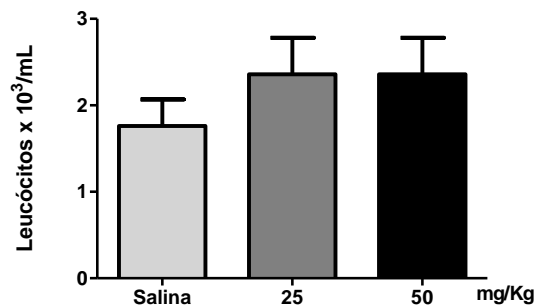
Na análise hematológica, os animais tratados com DCA apresentaram aumento na contagem das plaquetas quando comparados ao grupo controle, por sua vez, os monócitos tiveram uma significativa diminuição na sua contagem diferencial nas duas doses de DCA (Fig. 14). Os demais parâmetros avaliados não apresentaram diferenças relevantes nos grupos tratados com DCA quando comparados ao controle (Tabela 2).

Figura 14. Efeito da fração polissacarídica sulfatada extraída da alga *Dictyota caribaea* sobre parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos transplantados com Sarcoma 180. Os animais foram tratados por via intraperitoneal durante sete dias consecutivos, a partir do primeiro dia após o implante tumoral.

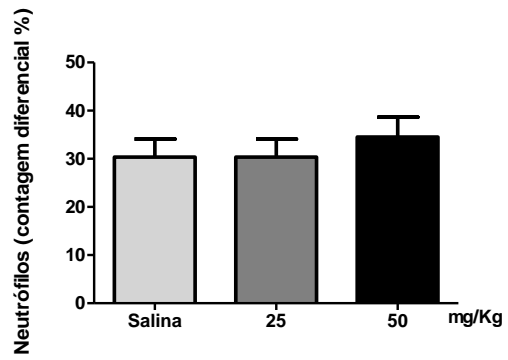
a)



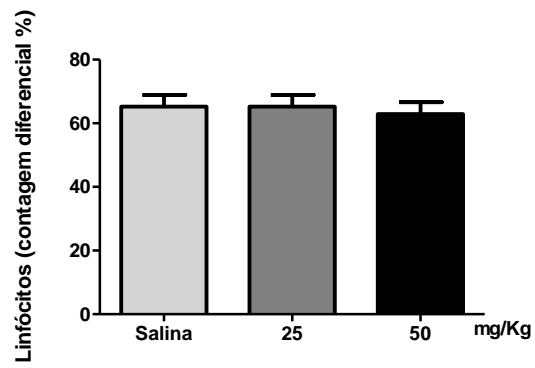
b)



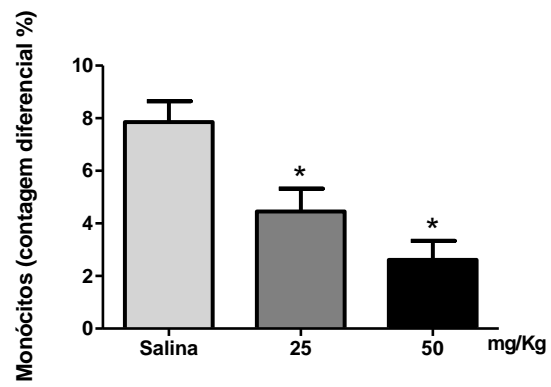
c)



d)



e)



4.4 Análise Histopatológica

Após retirada e pesagem, foram feitos cortes histológicos dos órgãos e do tumor, seguidos do preparo de lâminas histológicas.

A análise histopatológica dos tumores dos animais tratados revelou ausência de diferença no padrão morfológico. Todos os grupos apresentaram neoplasia maligna com desorganização celular intensa. Foram encontradas também numerosas figuras de mitose, invasão muscular e necrose de coagulação (Fig. 15).

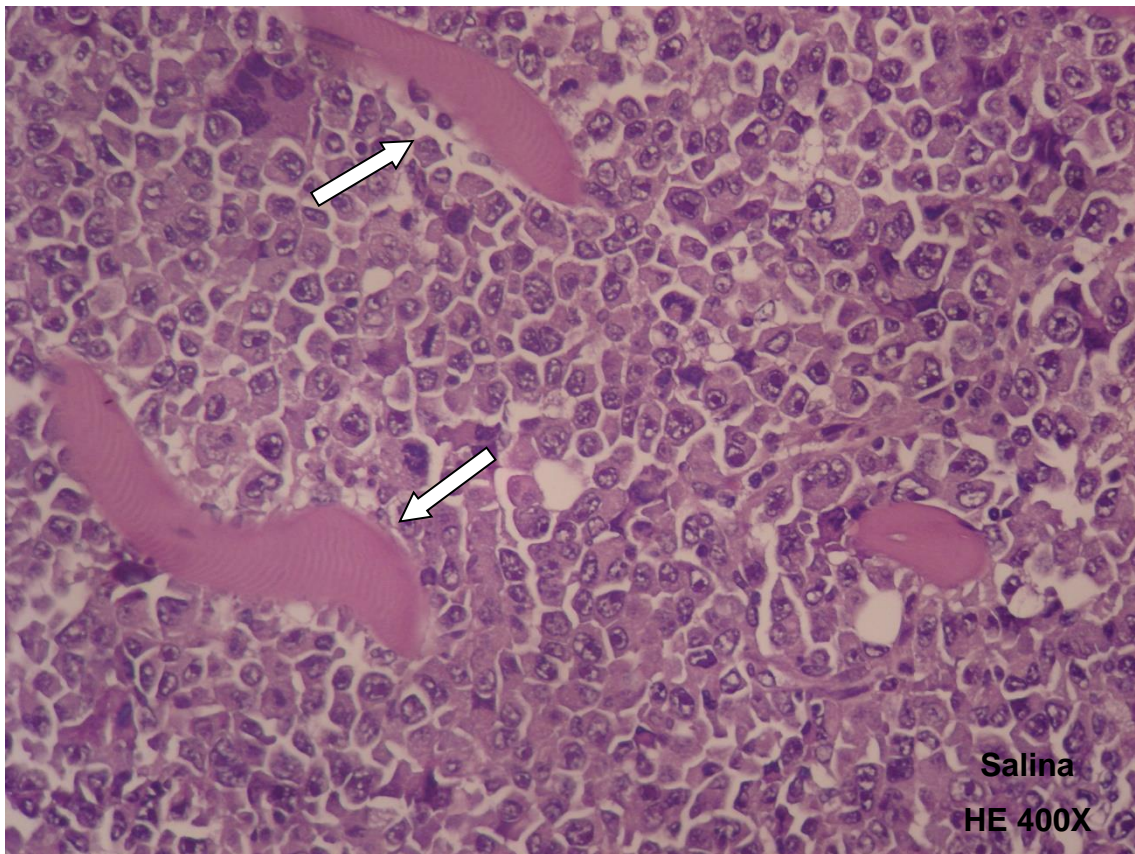
As análises histopatológicas dos rins dos animais tratados com salina e DCA mostraram glomérulos renais bem preservados e com discreta hemorragia. O grupo tratado com DCA 25 mg/Kg/dia apresentou pequena vacuolização do epitélio tubular e pontos de necrose, já o grupo tratado com a dose de 50 mg/Kg/dia apresentou apenas uma pequena vacuolização de epitélio tubular. Todos os grupos experimentais apresentaram moderada tumefação celular do epitélio tubular e hemorragia glomerular e tubular (Fig. 16).

A avaliação histopatológica do fígado dos animais revelou a presença de hiperplasia das células de Kupffer e tumefação celular em todos os grupos testados. O grupo salina apresentou moderada tumefação celular de hepatócitos. O fígado dos animais tratados com DCA em ambas as doses apresentou pequenos focos inflamatórios e pigmentos amarronzados sugestivos de bilirrubina (Fig. 17).

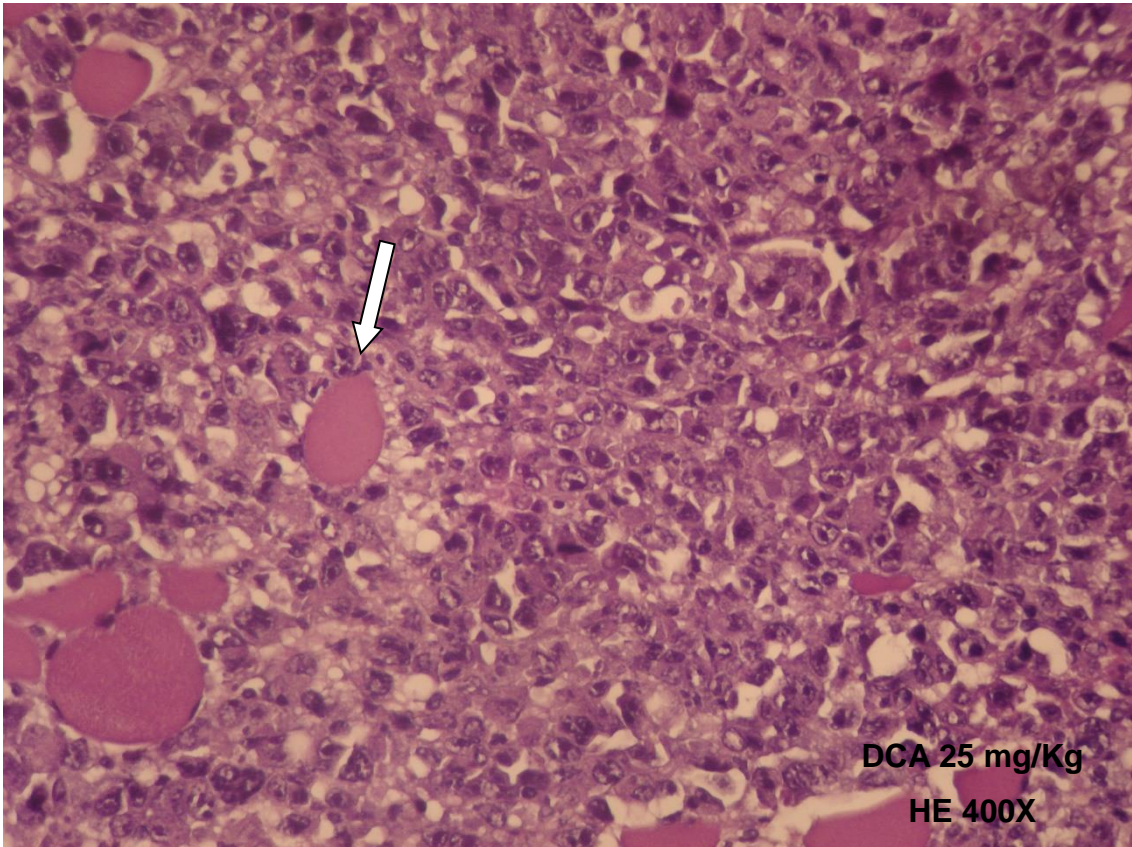
As análises histopatológicas do baço dos animais de todos os grupos mostraram hiperplasia da polpa branca, desorganização dos folículos e presença de megacariócitos. O baço dos animais tratados com DCA na dose de 25 mg/Kg/dia apresentou folículos bastante desorganizados e os tratados com a dose de 50 mg/Kg/dia, além de apresentarem folículos bastante desorganizados, também mostraram uma congestão da polpa vermelha (Fig. 18)

Figura 15. Fotomicrografia óptica do corte histológico (400x) de tumor de camundongos transplantados com S-180; todos com desorganização celular e apresentando fibras musculares esqueléticas (setas) evidenciando invasão muscular do tecido e áreas de necrose de coagulação. a) Grupo Salina (NaCl 0,9% i.p.) b) Grupo DCA 25mg/Kg/dia i.p.; c) Grupo DCA 50mg/Kg/dia i.p.

a)



b)



c)

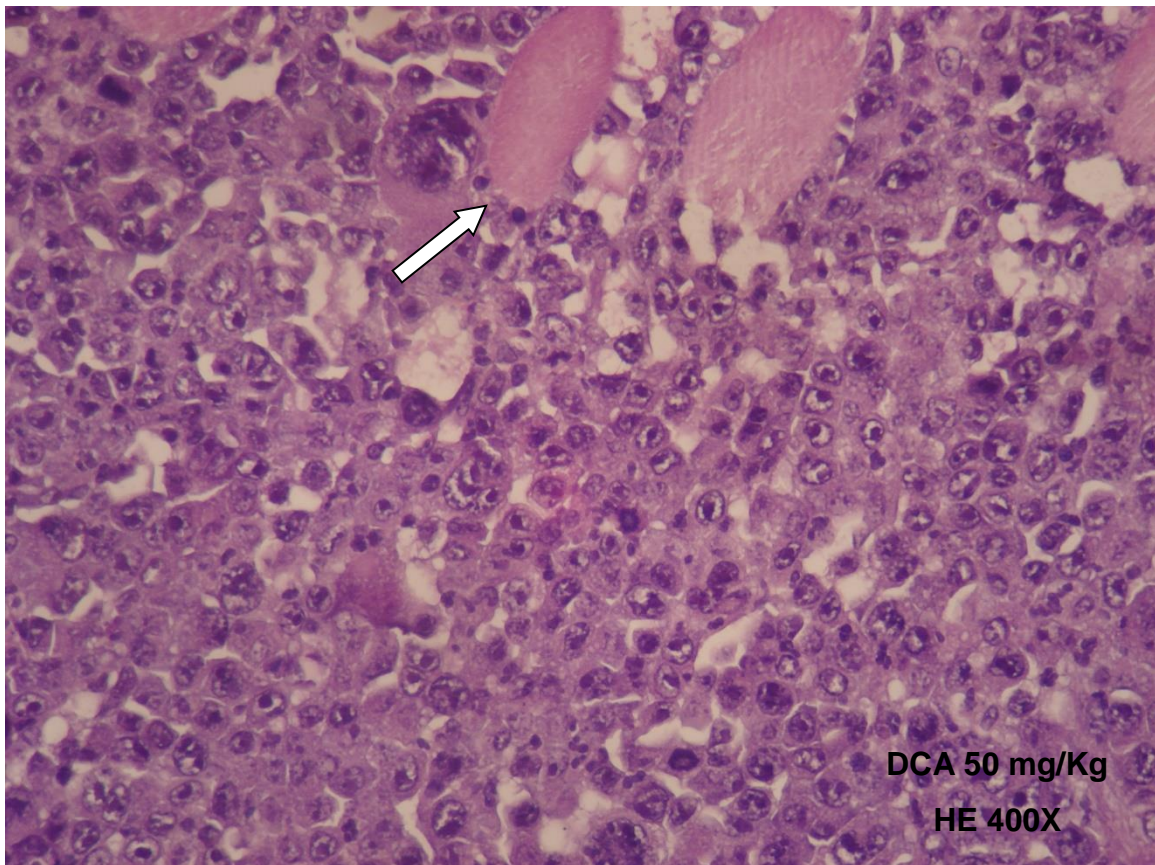
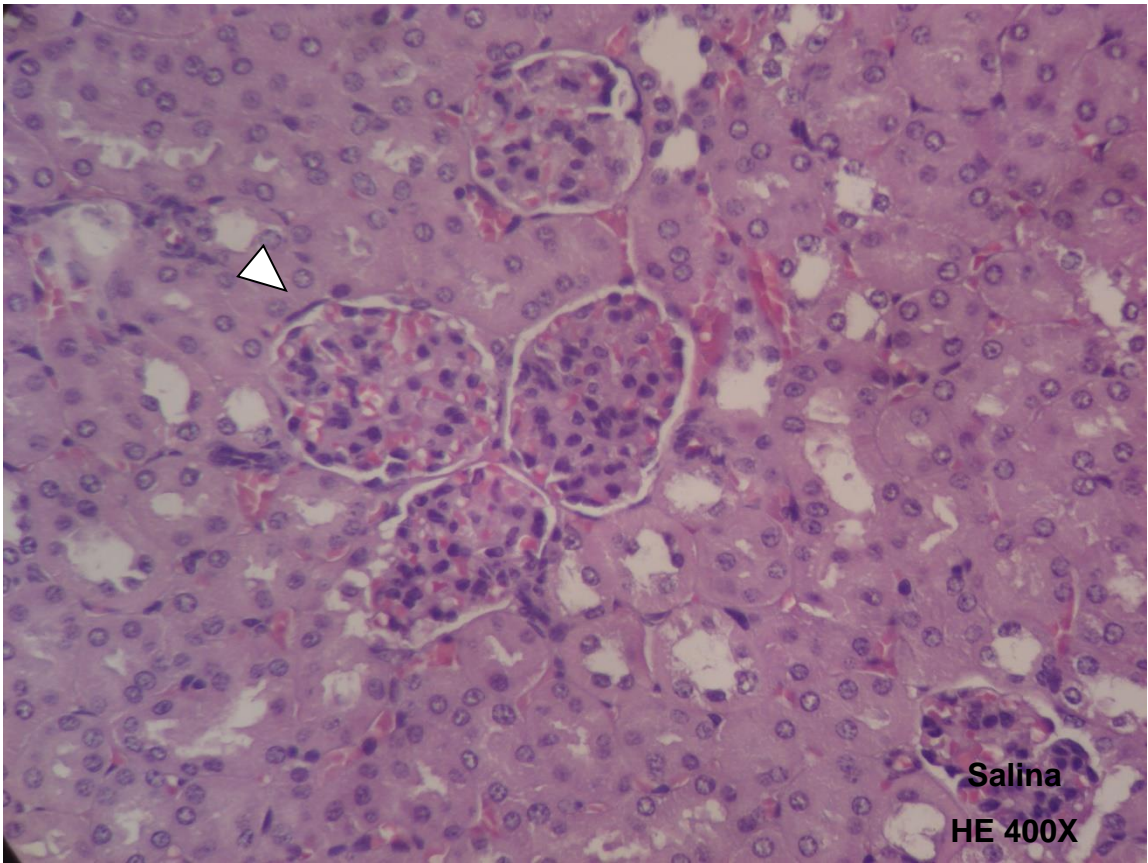
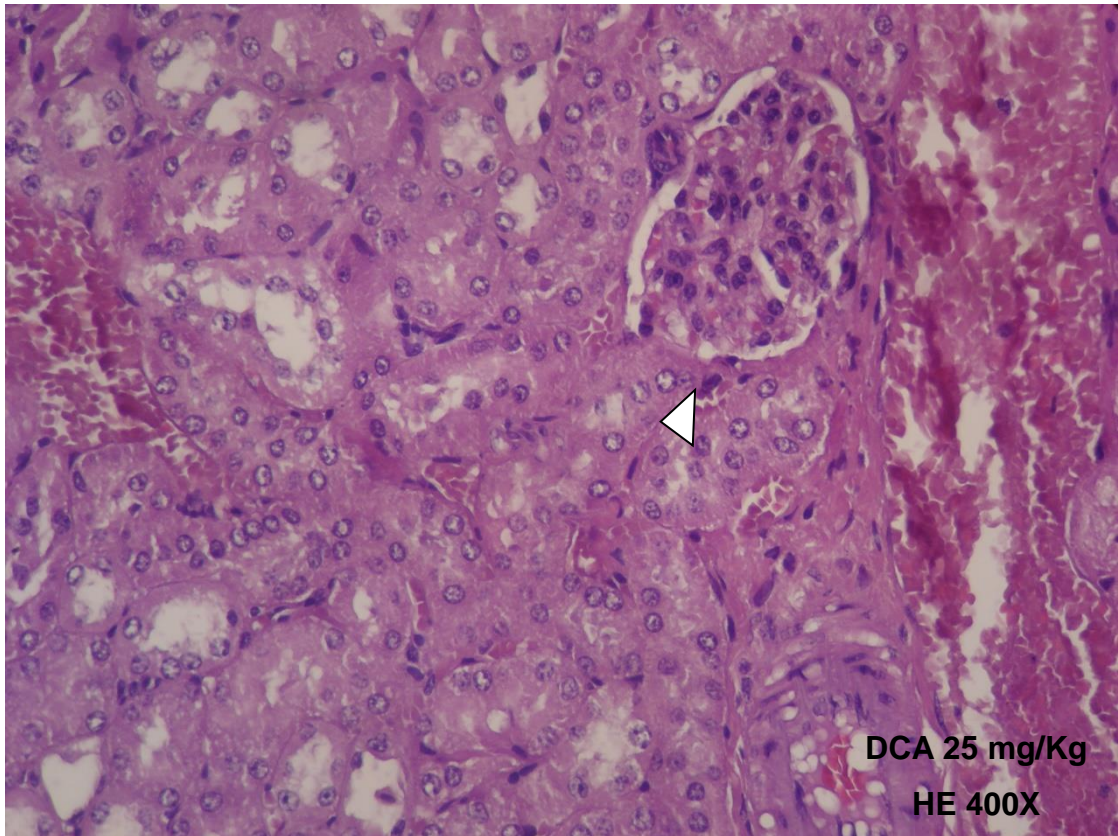


Figura 16: Fotomicrografia óptica de corte histológico (400x) dos rins dos animais transplantados com tumor S-180; todos apresentando glomérulos renais preservados (cabeças de setas) e com discreta hemorragia. a) Salina ((NaCl 0,9% i.p.); b) DCA 25 mg/Kg/dia i.p.: Apresenta pequena vacuolização do epitélio tubular e pontos de necrose; c) DCA 50 mg/Kg/dia i.p.: Apresenta pequena vacuolização de epitélio tubular.

a)



b)



c)

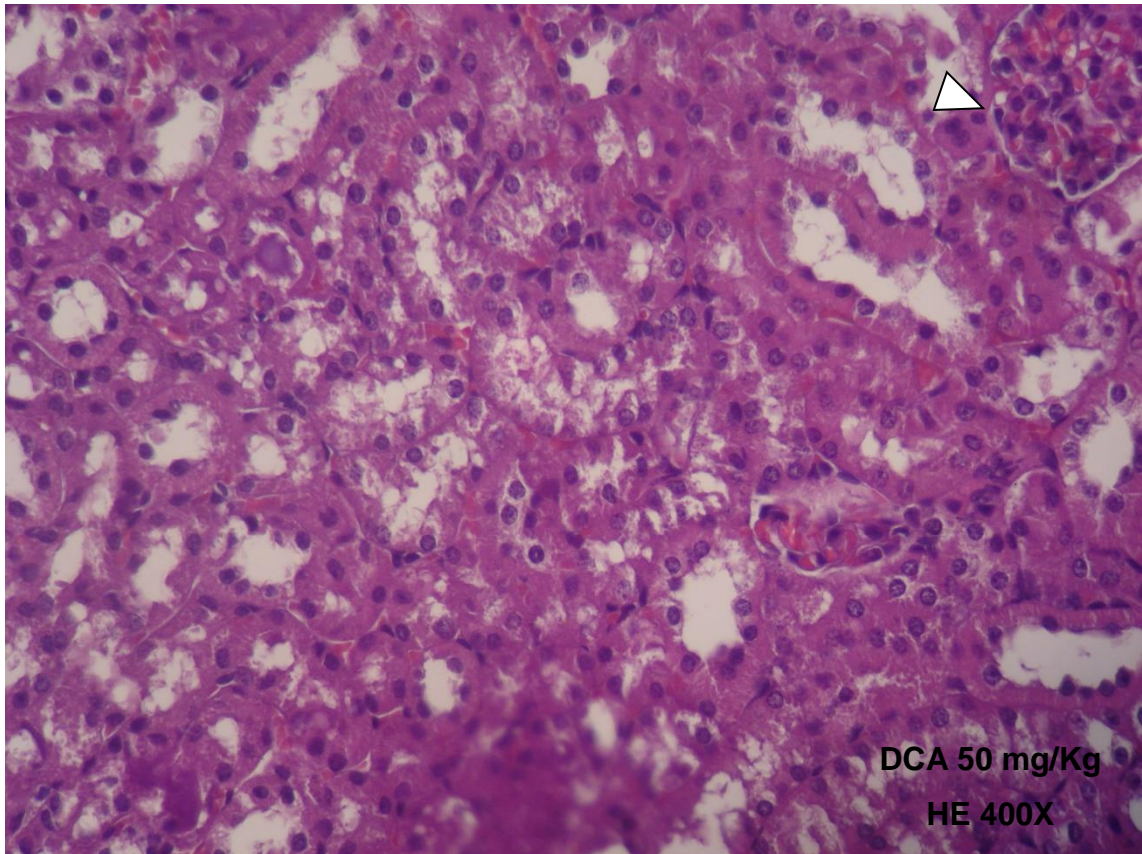
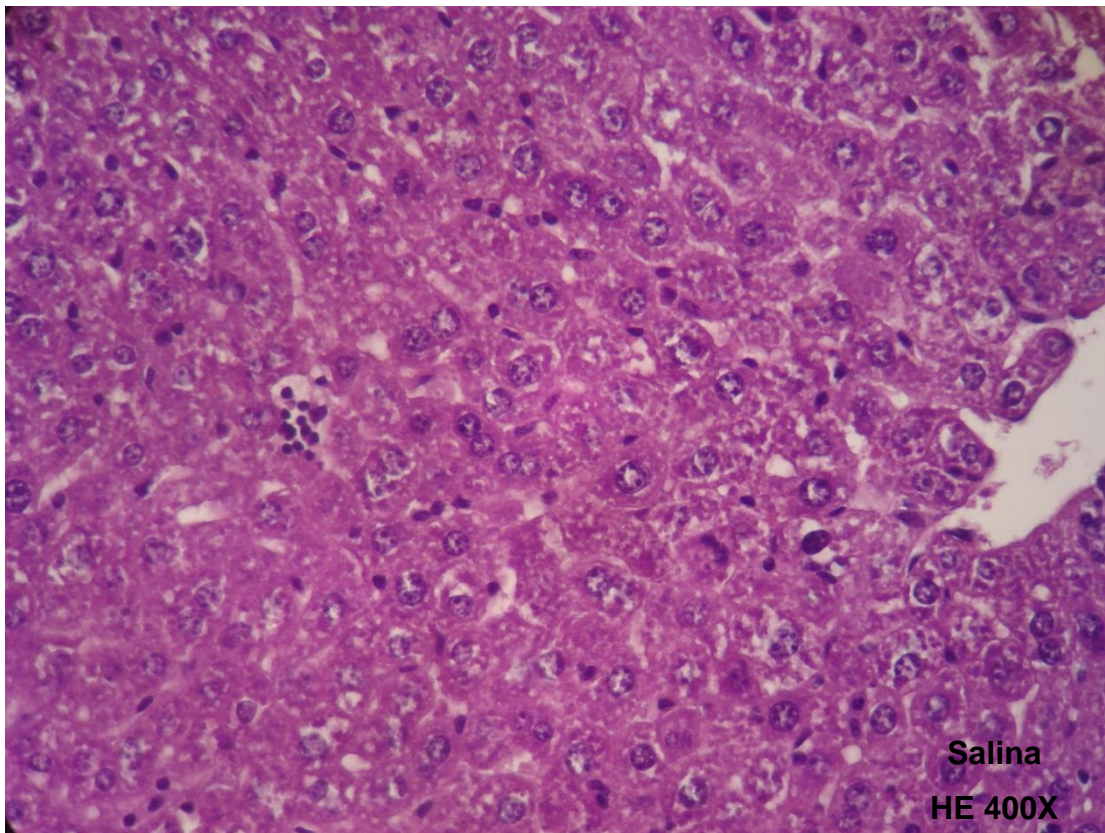
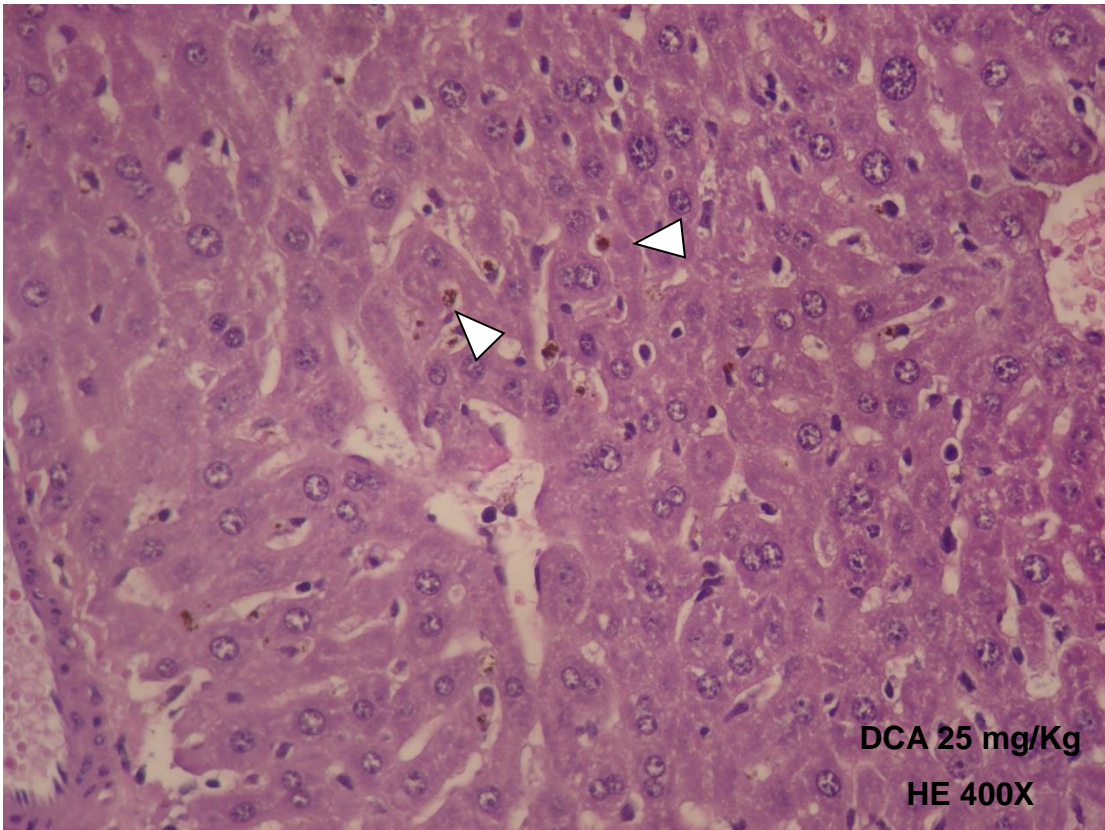


Figura 17. Fotomicrografia óptica de corte histológico (400x) do fígado dos animais transplantados com tumor S-180. Todos apresentando tumefação celular de hepatócitos preferencialmente na periferia e hiperplasia das células de Kupffer. a) Salina (NaCl 0,9% i.p.); b) e c) DCA 25 mg/Kg/dia i.p e DCA 50 mg/Kg/dia i.p., respectivamente; com focos inflamatórios e degeneração hidrópica e pigmentos amarronzados distribuídos por toda a amostra, sugestivo de bilirrubina (cabeças de setas).

a)



b)



c)

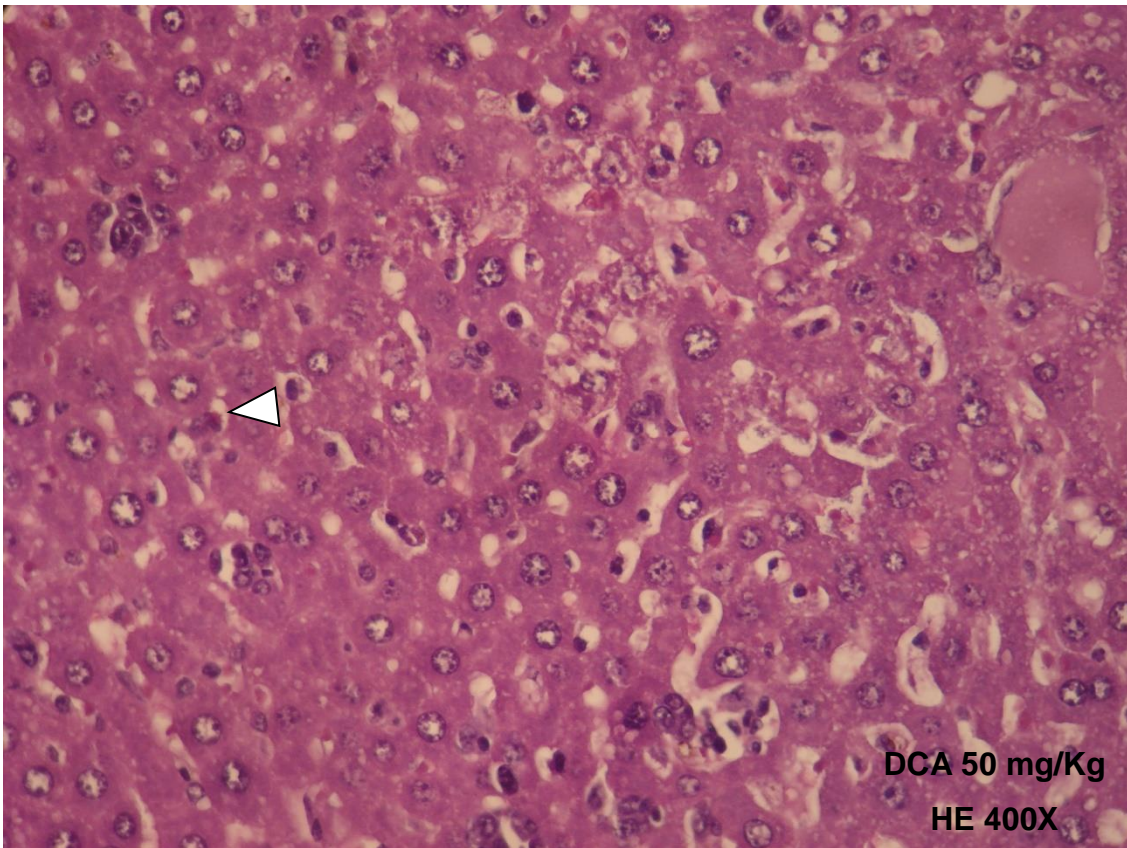
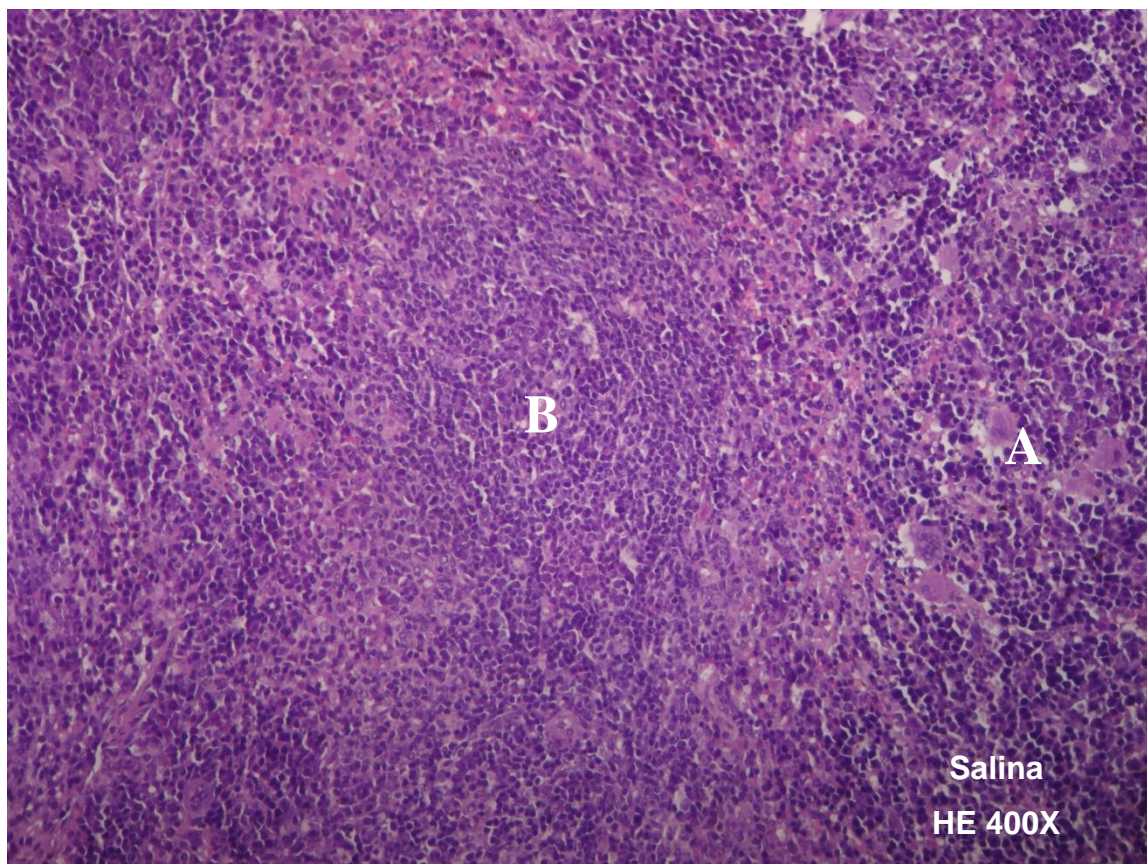
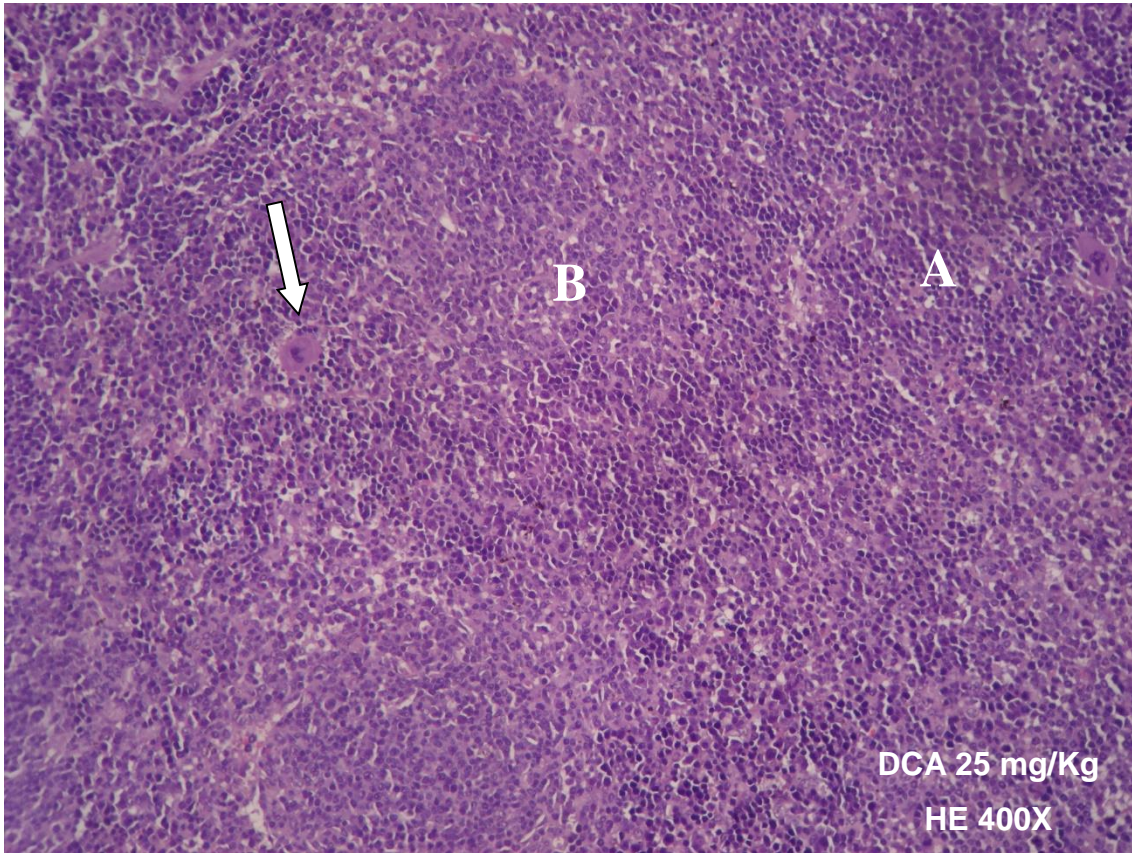


Figura 18: Fotomicrografia óptica de corte histológico (400x) do baço dos animais transplantados com tumor S-180. Evidenciando a polpa branca (B) e a polpa vermelha (A); todos apresentando hiperplasia da polpa branca, desorganização dos folículos e presença de megacariócitos (setas). a) Salina (NaCl 0,9% i.p.); b) DCA 25 mg/Kg/dia i.p.: apresentando folículos bastante desorganizados; c) DCA 50 mg/Kg/dia i.p.: apresentando folículos bastante desorganizados e uma congestão da polpa vermelha.

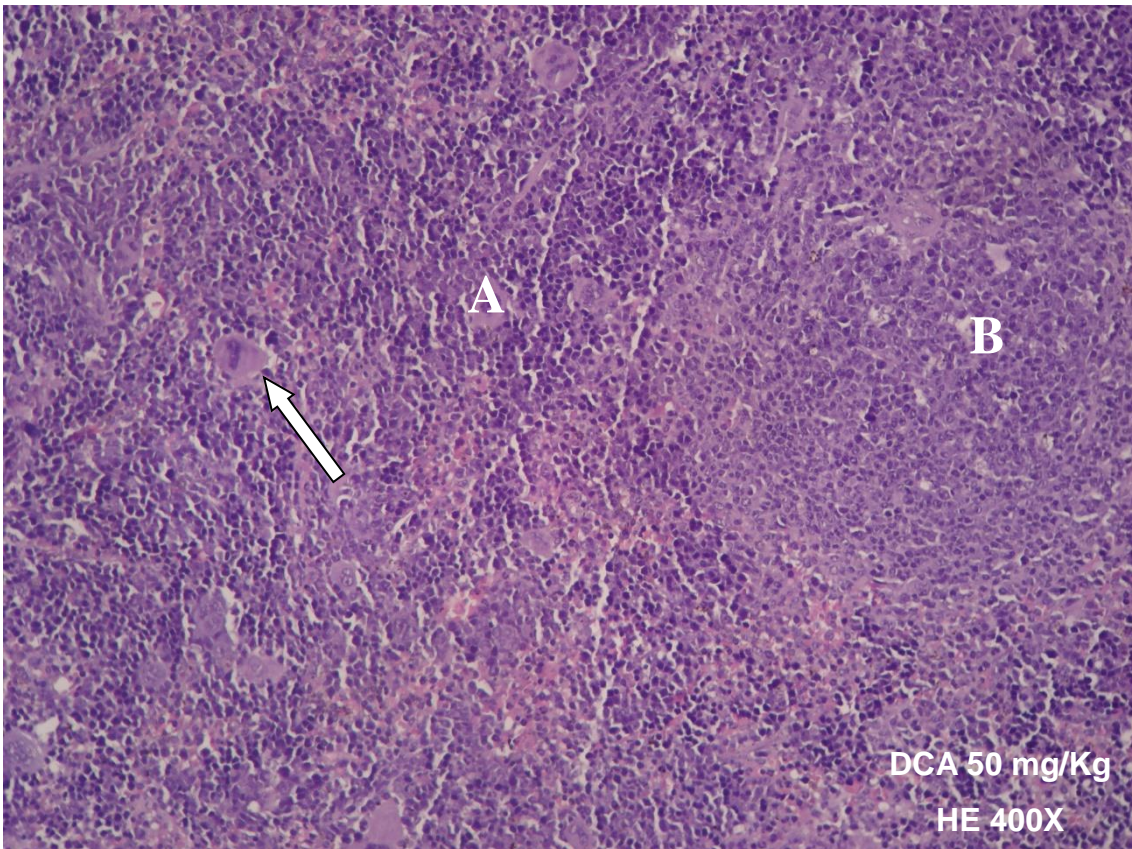
a)



b)



c)



5 DISCUSSÃO

Apesar do considerável arsenal de drogas já existente para o tratamento de cânceres e do sucesso terapêutico em vários esquemas de tratamentos, ainda não se chegou a um composto ideal. Assim, a busca por compostos mais seletivos, com menos efeitos indesejáveis, maior potência terapêutica e menor índice de resistência para a terapia do câncer é de extrema relevância. Portanto, torna-se imperativa a necessidade de encontrar, desenvolver e introduzir no arsenal médico novas opções terapêuticas mais eficientes (Costa-Lotufo *et al.*, 2010). Nesse contexto, os polissacarídeos são fortes candidatos a fármacos com ação imunomodulatória e antitumoral (SCHEPETKIN; QUINN, 2006).

Vários polissacarídeos de macroalgas marinhas apresentaram atividade antitumoral em modelos experimentais (COSTA *et al.*, 2011; SYNYTSYA *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 2010; HYUN *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2008; YE *et al.*, 2005; AISA *et al.*, 2004; RELIGA *et al.*, 2000; RIOU *et al.*, 1996; ZHUANG *et al.*, 1995; ELLOUALI *et al.*, 1993; COOMBE *et al.*, 1987). A fucoidana isolada da alga parda *Cladosiphon okamuranus tokida* inibiu o crescimento de 13 linhagens de células tumorais, obtendo a maior ação antiproliferativa contra carcinoma hepatocelular, colangiocarcinoma e carcinoma de vesícula biliar (FUKAHORI, *et al.*, 2008).

No presente trabalho, o potencial antitumoral da fração polissacarídica extraída da alga parda *D. caribaea* foi avaliado. Para a determinação da citotoxicidade *in vitro* sobre a linhagem de células tumorais humanas HCT-116 (câncer de cólon) foram utilizadas as concentrações de 50 e 100 µg/mL da DCA. Este ensaio é amplamente utilizado para avaliação da proliferação celular e determinação da citotoxicidade de compostos com potencial antitumoral devido à possibilidade de mensurar células viáveis. A maior parte da biorredução do MTT envolve a redução do nucleotídeo NADH e, em menor extensão, NADPH (BERRIDGE; TAN, 1993; BERRIDGE *et al.*, 1996; BERNAS; DOBRUCKI, 2002; BERRIDGE; HERST; TAN, 2005). O teste consiste na utilização do brometo de 3-(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-diphenil-2H-tetrazolium (MTT), um sal solúvel de coloração amarela que pode ser reduzido a cristais insolúveis (Formazan) de cor púrpura pela enzima succinato desidrogenase, funcional em células vivas (CARMICHAEL *et al.*, 1987; MORGAN, 1998; MOSMAN, 1983). Os cristais de formazan podem ser quantificados por espectrofotometria pela dissolução em um solvente orgânico e a concentração é diretamente proporcional ao

número de células metabolicamente ativas (GABRIELSON et al., 2002; RAHMAN et al., 2004; STENTELAIRE et al., 2001; TUNNEY et al., 2004)

A DCA não apresentou citotoxicidade direta sobre as células testadas até a concentração de 100 µg/mL, mas foi capaz de inibir o crescimento tumoral nos animais transplantados com Sarcoma 180. Além disso, foi demonstrada a presença de fibras musculares esqueléticas nos cortes histológicos do tumor de todos os grupos tratados, evidenciando o poder de invasão desse tumor. Resultado semelhante pode ser observado no trabalho de SOUSA et al (2007) com polissacarídeos da alga parda *Sargassum vulgare*, e LINS et al (2009) com *Champia feldmannii*. Além do elevado potencial antitumoral esses polissacarídeos apresentam baixíssima toxicidade contra células. A baixa toxicidade é uma característica presente na maioria dos polissacarídeos de algas marinhas (DE CLERCQ, 1996).

Entretanto, estudos têm demonstrado que, quando administrados no animal, muitos polissacarídeos não citotóxicos são capazes de inibir o crescimento tumoral (OOI & LIU, 2000; ZHOU et al., 2004), portanto, prosseguimos a investigação no modelo murino do tumor S-180. O efeito da DCA sobre o crescimento tumoral *in vivo* foi avaliado através do modelo experimental do Sarcoma 180. A DCA apresentou atividade antitumoral em animais transplantados com Sarcoma 180. O grupo tratado com a dose de 25 mg/Kg/dia apresentou um percentual de inibição do crescimento tumoral de 40% e os animais tratados com a dose de 50 mg/Kg/dia apresentaram um percentual de inibição tumoral de 51%.

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

Os polissacarídeos extraídos das algas pardas *Sargassum kjellmanianum* (YAMAMOTO et al., 1984) e *Sargassum vulgare* (SOUSA et al., 2007) demonstraram grande potencial antitumoral ao inibir o crescimento de células tumorais em animais transplantados com Sarcoma 180.

ZHOU et al. (2004) testaram o efeito antitumoral *in vivo* de carragenanas de diferentes massas moleculares isoladas da alga *Chondrus ocellatus* contra os tumores Sarcoma 180 e H22 em animais transplantados. Essas moléculas foram capazes de aumentar o

peso médio e a polpa branca do baço dos animais, além de elevar a atividade proliferativa de linfócitos e células NK. Uma galactana sulfatada do tipo carragenana obtida da alga vermelha *Solieria chordalis* induziu o aumento da fagocitose por neutrófilos e das citotoxicidades mediadas por células NK e citotoxicidade celular dependente de anticorpo, além de estimular a proliferação de linfócitos, demonstrando potencial para tratamento imunoterápico e anticâncer (STEPHANIE et al., 2010).

Neste trabalho pôde-se observar que a resposta antitumoral apresentada pelos animais transplantados com Sarcoma 180 tratados com DCA foi acompanhada de aumento da massa relativa do baço dos animais. Além disso, a análise histopatológica desse órgão nos grupos tratados com DCA mostrou desorganização da arquitetura esplênica com hiperplasia da polpa branca e congestão da polpa vermelha, havendo mistura entre as mesmas no baço dos animais tratados com a maior dose, com presença de vários megacariócitos. As alterações observadas sugerem que a DCA em ambas doses apresentou efeito potencializador da resposta imune desses indivíduos.

Alguns polissacarídeos de fungos são utilizados na clínica melhorando a sobrevida dos pacientes, diminuindo os efeitos adversos da quimioterapia. O PKS, um polissacarídeo ligado a proteínas, 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 por via oral ou intraperitonal (KOBAYASHI et al., 1993). A lentinana, produzida pelo fungo *Lentinus edodes*, é um β -D-glucano puro, inicialmente estudado por CHIHARA et al. (1970), que demonstrou um 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, 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 esquizofilana é também um β -glucano, produzida pelo fungo *Schizophyllum commune* e tem demonstrado ação citostática em tumor sólido Sarcoma 180, quando injetada via intraperitonal ou intravenosa. Recentemente tem-se observado um aumento da sobrevida em pacientes com câncer na cabeça e no pescoço (KIMURA et al., 1994).

Na contagem total de leucócitos nos animais transplantados com Sarcoma 180 tratados com DCA nas doses de 25 e 50 mg/Kg/dia não foi observado diferença significativa quando comparados ao grupo salina. Já na contagem diferencial de leucócitos, houve uma grande diminuição do percentual de monócitos quando comparado ao grupo salina, o que sugere que os mesmos podem estar migrando para o microambiente tumoral. A contagem total de leucócitos mostrou que não houve depleção intensa dos mesmos, apesar de os grupos tratados terem apresentado um pequeno aumento quando comparados ao grupo salina, o que sugere que DCA foi capaz de inibir o crescimento tumoral sem causar um quadro de leucocitopenia que é induzido por quimioterápicos já introduzidos no mercado, como o 5-Fluorouracil. Alguns trabalhos mostraram que a utilização do quimioterápico em conjunto com os polissacarídeos *Chondrus ocellatus* (ZHOU et al., 2004), *Champia Feldmannii* (LINS et al., 2009) e *Kappaphycus striatum* (YUAN et al., 2006) foram capazes de potencializar o efeito antitumoral do 5-FU, diminuindo a leucocitopenia, prevenindo assim a imunodepressão promovida pelo quimioterápico.

Estudos indicam que as células mielóides são o principal alvo estimulatório dos polissacarídeos imunomoduladores, possivelmente devido à participação de macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e monócitos tanto na imunidade inata quanto na adquirida (LEUNG et al., 2006; LIM et al., 2004; CHUN et al., 2001).

Com o objetivo de avaliar a toxicidade preliminar da DCA sobre os animais transplantados com S-180, também foi realizada a avaliação histopatológica do fígado e dos rins dos animais.

A análise do fígado dos animais transplantados com Sarcoma 180 mostrou a presença de células de Kupffer hiperplásicas e tumefação celular de hepatócitos preferencialmente na periferia em todos os grupos testados. Em adição, o fígado dos animais transplantados com Sarcoma 180 tratados com DCA apresentou focos inflamatórios e degeneração hidrópica, assim como pigmentos amarronzados distribuídos por toda a amostra, sugestivo de bilirrubina.

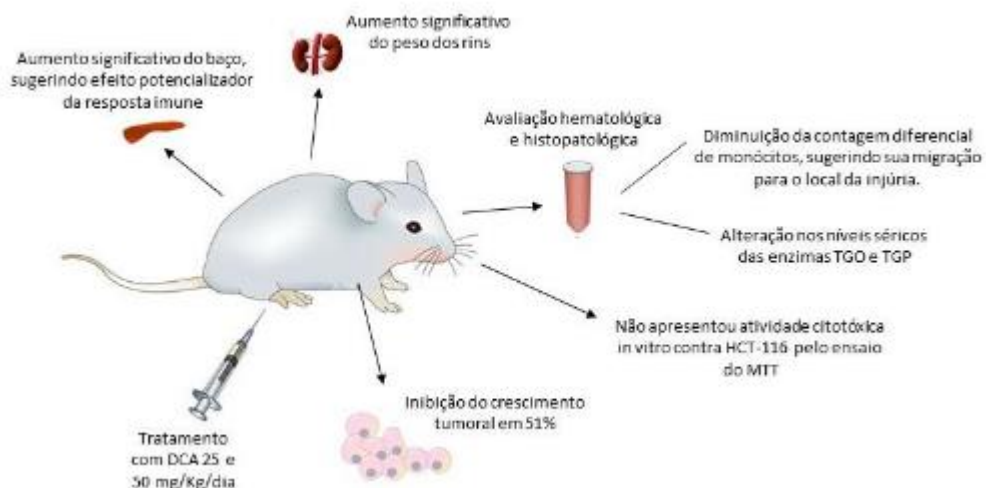
As alterações histopatológicas observadas pelos grupos experimentais após tratamento com DCA parecem ser reversíveis devido à ausência de fibrose intersticial e à grande capacidade de regeneração hepática, podendo haver reversão das alterações com a descontinuidade do tratamento ou redução da dose. A análise bioquímica do sangue dos camundongos transplantados com Sarcoma 180 dos grupos experimentais tratados com a

DCA revelou que houve alteração nos níveis séricos das enzimas transaminase glutâmica oxalacética (TGO) e transaminase glutâmica pirúvica (TGP). Essas enzimas são consideradas indicadores de lesão hepática devido à sua liberação no sangue em grandes quantidades quando há dano à membrana do hepatócito, resultando em aumento de sua permeabilidade, o que revela uma pequena hepatotoxicidade.

A nefrotoxicidade da DCA foi avaliada através de análise histopatológica dos rins e dos níveis séricos de uréia. Os rins dos animais tratados com DCA apresentaram uma arquitetura glomerular preservada. Contudo, apresentaram discreta hemorragia glomerular, pequena vacuolização do epitélio tubular e pontos de necrose. Em adição, nenhum grupo analisado apresentou alteração nos níveis séricos de uréia, sugerindo ausência de nefrotoxicidade, pois este composto nitrogenado é considerado um marcador sensível a alterações primárias da função renal.

Os resultados encontrados são muito interessantes devido à ausência de citotoxicidade dos polissacarídeos testados combinado com um potente efeito antitumoral e relação com a resposta imune caracterizada pelo aumento significativo do baço (Fig. 19). No Brasil, ainda há um número muito reduzido de pesquisadores especializados nessa área desenvolvendo estudos para avaliar essas atividades biológicas de PS de algas marinhas. Por isso, a enorme biodiversidade de espécies encontradas no litoral brasileiro deve ser melhor investigada a fim de se avançar nessa linha de pesquisa.

Figura 19: Esquema com resultados encontrados no presente trabalho



6 CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou que a fração polissacarídica sulfatada extraída da alga marinha parda *D. caribaea* não apresenta atividade citotóxica direta contra as células neoplásicas testadas *in vitro*, mas foi capaz de inibir significativamente o crescimento tumoral em camundongos transplantados com Sarcoma 180 *in vivo*. A hiperplasia da polpa branca e congestão da polpa vermelha esplênica, juntamente com o aumento da massa relativa do baço e alteração da contagem diferencial de leucócitos com redução do percentual de monócitos após administração da DCA, em ambas as doses testadas, sugere que o efeito antitumoral apresentado pela DCA possa estar envolvido com suas propriedades imunomodulatórias. Além disso, DCA demonstrou uma pequena toxicidade nos órgãos analisados.

REFERÊNCIAS

- AISA, Y.; MIYAKAWA, Y.; NAKAZATO, T.; SHIBATA, H.; SAITO, K.; IKEDA, Y.; KIZAKI, M. Fucoidan induces apoptosis of human HS-Sultan cells accompanied by activation of caspase-3 and down-regulation of ERK pathways. *Am. J. Hematol.*, v. 78, p. 7-14, 2004.
- ALBUQUERQUE, I. R.; QUEIROZ, K. C.; ALVES, L. G.; SANTOS, E. A.; LEITE, E. L.; ROCHA, H. A. Heterofucans from dictyota menstruallis have anticoagulante activity. *Braz J Med Biol Res.* 37: 167-171, 2004.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Atlanta: American Cancer Society, 2008.
- ANASTYUK S.D., SHEVCHENKO N.M., NAZARENKO E.L., DMITRENOK P.S., ZVYGAGINTSEVA T.N. *Structural analysis of a fucoidan from the brown alga Fucus evanescens* by MALDI-TOF and tandem ESI mass spectrometry (2009) *Carbohydrate Research*, 344 (6) , pp. 779-787.
- ANASTYUK S.D., SHEVCHENKO N.M., NAZARENKO E.L., DMITRENOK P.S., ZVYGAGINTSEVA T.N. Structural analysis of a highly sulfated fucan from the brown alga *Laminaria cichorioides* by tandem MALDI and ESI mass spectrometry (2010) *Carbohydrate Research*, 345 (15) , pp. 2206-2212.
- ARLEN, P. M.; MADAN, R. A.; HODGE, J. W.; SCHLOM, J.; GULLEY, J. L. Combining vaccines with conventional therapies for cancer. *Update on cancer therapeutics*, v. 2. p. 33–39, 2007
- BARAHONA, T.; CHANDÍA, N.P.; ENCINAS, M.V.; MATSUHIRO, B.; ZÚÑIGA E.A. Antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from seaweeds. A kinetic approach *Food Hydrocoll.*, 25 (2011), pp. 529–535
- Berlinck, R. G. S.; Hajdu, E.; Rocha, R. M.; Oliveira, J. H. H. L.; Hernandez, I. L. C.; Selegim, M. H. R.; Granato, A. C.; Almeida, E. V. R.; Nunez, C. V.; Muricy, G.; Peixinho, S.; Pessoa, C; Moraes, M. O.; Cavalcanti, B. C.; Nascimento, G. G. F.; Thiemann, O.; Silva, M.; Souza, A. O.; Silva, C. L.; Minarini, P. R. R. 2004. Challenges and Rewards of Research in Marine Natural Products Chemistry in Brazil. *J. Nat. Prod.* 67: 510-522

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

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

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

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

BILAN M.I., GRACHEV A.A., USTUZHANINA N.E., SHASHKOV A.S., NIFANTIEV N.E., USOV A.I. Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus evanescens* C.Ag (2002) *Carbohydrate Research*, 337 (8) , pp. 719-730.

Blunt JW, Copp BR, Hu WP, Munro MHG, Northcote, PT, Prinsep MR 2007. Marine natural products. *Nat Prod Rep* 24: 31-86.

BONGIORNI, L. & PIETRA, F. (1996) Marine natural products for industrial applications. *Chemistry & Industry*, 2, p. 54-58.

BOUHLAL, R.; HASLIN, C.; CHERMANN, J.C.; COLLIEC-JOUAULT, S.; SINQUIN, C.; SIMON, G.; CERANTOLA, S.; RIADI, H.; BOURGOUGNON, N. Antiviral activities of sulfated polysaccharides isolated from *Sphaerococcus coronopifolius* (Rhodophyta, Gigartinales) and *Boergeseniella thuyoides* (Rhodophyta, Ceramiales. *Mar. Drugs*, 9 (2011), pp. 1187–1209

CARDOZO, K. H. M.; GUARATINI, T.; BARROS, M. P.; FALCÃO V. R.; TONON, A. P. et al. Metabolites from algae with economical impact. *Comp Biochem Physiol C – Toxicol Pharmacol.* 2007; 146: 60-78

CARMICHAEL, J., DEGRAFF, W.G., GAZDAR, A.F., MINNA, J.D., MITCHELL, J.B., 1987. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 47, 936–942.

CHAN, L.W.; LEE, H.Y.; HENG, P.W.S. Production of alginate microspheres by internal gelation using an emulsification method. *International Journal of Pharmaceutics*, 242 (1-2) 259-262, 2002.

CHEVOLOT, L.; FOUCAULT, A.; CHAUBET, F.; KERVAREC, N.; SINQUIN, C.; FISHER, A. M.; BOISSON-VIDAL, C. Further data on the structure of brown seaweed fucans: relationship with anticoagulant activity. *Carbohydrate Research*, v. 319, p. 154-165, 1999.

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

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.

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

CIANCIA, M.; QUINTANA, I.; CEREZO, A.S. Overview of anticoagulant activity of sulfated polysaccharides from seaweeds in relation to their structures, focusing on those of green seaweeds. *Curr. Med. Chem.*, 17 (2010), pp. 2503–2529

COLE C.L., JAYSON G.C. Oligosaccharides as anti-angiogenic agents (2008) *Expert Opinion on Biological Therapy*, 8 (3), pp. 351-362.

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

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

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

COSTA-LOTUFO, L.V.; MONTENEGRO, R.C.; ALVES, A.P.N.N., MADEIRA, S.V.F.; PESSOA, C.; MORAES, M.E.A.; MORAES, M.O. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. *Rev. Virtual Quim*, 2 (1), 47–58. 2010.

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

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochim Biophys Acta* 1830(6): 3670–95, 2013.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M. Natural products in Drug Discovery and development. *Journal of Natural Products*, 1997.

DABA, A.S. & EZERONYE, O.U. Anti-cancer effect of polysaccharides isolated from higher basidiomycetes mushrooms. *Afric. J. of Biotech*, v. 2, n. 12, p. 672–678, 2003.

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

DIETRICH, C. P. A model of cell growth mediated by sulfated glycosaminoglycans. *Braz J Med Biol Res*. 17: 5–15, 1984.

Dietrich, C. P., Farias, G. G. M., Abreu, L. R. D., Leite, E. L., Silva, L. F. & Nader, H. B. (1995). A new approach for characterization of polysaccharides from algae: Presence of four main acidic polysaccharides in three species of the class Phaeophyceae. *Plan. Scien.* 108(2): 143-153.

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

EL GAMAL, A. A. Biological importance of marine algae. *Saudi Pharmaceutical Journal*, v.18, p. 1-25, 2010.

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

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

FAULKNER, D. J. Marine Natural Products. *Nat. Prod.* 1992, 9, 323.

FENICAL, W. New pharmaceuticals from marine organisms. *Trends in Biotechnology*, Volume 15, Issue 9, September 1997, Pages 339-341

FENICAL, W. Marine pharmaceuticals, past, presente and future. *Oceanography*, v.19, p.110-119, 2006.

FIDLLER, I. J. The pathogenesis of cancer metastasis: The seed and soil' hypothesis revisited. *Nature Reviews Cancer*, 3, 453–458(2003).

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

GABRIELSON, J., HART, M., JARELOV, A., KUHN, I., MCKENZIE, D., MOLLBY, R., 2002. Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. *J. Microbiol. Meth.*50, 63–73.

GÓMEZ-ORDÓÑEZ, E.; JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; RUPÉREZ, P. Dietary fibre and physicochemical properties of several edible seaweeds from the northwestern Spanish coast. *Food Research International*, v. 43, p. 2289-2294, 2010.

GOOGLE EARTH. <https://www.google.com.br/maps/place/Praia+Vermelha/@-22.9552144,43.1645003,642m/data=!3m1!1e3!4m2!3m1!1s0x99801a76741d47:0x9fa9df70526927c8>. 2015.

GUPTA, S.; ABU-GHANNAM, N. Recent developments in the application of seaweeds or seaweed extracts as a means for enhancing the safety and quality attributes of foods. *Innovat. Food Sci. Emerg. Tech.*, 12 (2011), pp. 600–609

Haefner B. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug Discov Today*. 2003 Jun 15;8 (12):536-44.

HANAHAN, D. & WEINBERG, R. A. The Hallmarks of cancer. *Cell*, Vol. 100, 57–70, January 7, 2000

HANAHAN, D. & WEINBERG, R A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, Vol 144, 646–67, March 2011.

HAROUN-BOUHEDJA F., ELLOUALI M., SINQUIN C., BOISSON-VIDAL C. Relationship between sulfate groups and biological activities of fucans (2000) *Thrombosis Research*, 100 (5), pp. 453-459.

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

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

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

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

JEMAL, A.; BRAY, F.; CENTER, M. M.; FERLAY, J.; WARD, E. & FORMAN, D. Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61(2), 69–90. (2011).

JIAO, G.; YU, G.; ZHANG, J.; EWART, H.S. Chemical Structures and Bioactivities of Sulfated Polysaccharides from Marine Algae. *Mar. Drugs*, 9 (2011), pp. 196–223

JIMENO et al. New Marine Derived Anticancer Therapeutics —A Journey from the Sea to Clinical Trials. *Mar. Drugs* 2004, 2, 14-29

KELECOM, A. Secondary metabolites from marine microorganisms. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v.74, p.151-170, 2002.

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

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.

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

Konig GM, Wright AD, Sticher O, Angerhofer CK, Pezzuto JM 1994. Biological-activities of selected marine natural-products. *Planta Med* 60:532-537.

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

LEMIESZEK, M.; RZESKI, W. Anticancer properties of polysaccharides isolated from fungi of the Basidiomycetes class. *Wspolczesna Onkol* 2012; 16 (4): 285–289.

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

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.

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

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.

MATHEWS, M. B. Polyanionic proteoglycans. Em: *Conective tissue: Macromolecular structure and evolution*. Kleinzeller, A., Springer, G. F. and Witmann, H. G., eds. Springer-Verlaq, Berlim, p. 93-125, 1975.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Estimativa 2015: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer (INCA), 2014.

MOHSEN, M.S.; ASKER, S.F.; MOHAMED, F.M.; ALI, O.H.; EL-SAYED. *J. Appl. Sci. Res.*, 3 (2007), pp. 1178–1185

MORGAN, D.M., 1998. Tetrazolium (MTT) assay for cellular viability and activity. *Meth. Mol. Biol.* 79, 179-183.

MOSMAN, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* 65, 55–63.

MULLOY, B.; MOURAO, P.A.S.; GRAY, E. Structure/function studies of anticoagulant sulphated polysaccharides using NMR. *J. Biotechnol.*, 77 (2000), pp. 123–135

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

NISHINO T., AIZU Y., NAGUMO T. The influence of sulfate content and molecular weight of a fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia kurome* on its antithrombin activity (1991) *Thrombosis Research*, 64 (6) , pp. 723-731.

NISHINO, T.; KIYOHARA, H.; YAMADA, H.; NAGUMO, T. An anticoagulant fucoidan from the brown seaweed *Ecklonia kurome*. *Phytochemistry*.v. 30, n. 2, p. 535–539, 1991

NISHINO, T.; YAMAUCHI, T.; HORIE, M.; NAGUNO, T.; SUZUKI H. Effects of a fucoidan on the activation of plasminogen by u-PA and t-PA. *Thomb Res*, v. 99, p. 623-634, 2000.

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

PATANKAR M.S., OEHNINGER S., BARNETT T., WILLIAMS R.L., CLARK G.F. A revised structure for fucoidan may explain some of its biological activities (1993) *Journal of Biological Chemistry*, 268 (29) , pp. 21770-21776.

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

PEREIRA, M. G. et al. Structure and anticoagulant activity of a sulfated galactan from the red alga, *Gelidium crinale*. Is there a specific structural requirement for the anticoagulant action. *Carbohydrate Research*, v. 340, n. 12, p. 2015–2023, 2005

PEREIRA, R. C., SOARES-GOMES, A (Organizadores). *Biologia Marinha*. Rio de Janeiro: Interciência, 2002.

Rahman, M., Kühn, I., Rahman, M., Olsson-Liljequist, B., Möllby, R., 2004. Evaluation of a scanner-assisted colorimetric MIC method for susceptibility testing of gram-negative fermentative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2398–2403

Raven, P. H.; Evert, R. F. & Eichhorn, S. E. 2007. *Biologia Vegetal*. 7^a. ed. Ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 830pp.

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

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

RIOUX, L.E.; TURGEON S.L.; BEAULIEU, M. Structural characterization of laminaran and galactofucan extracted from the brown seaweed *Saccharina longicruris*. *Phytochemistry*, 71 (13) (2010), pp. 1586–1595

ROCHA, H. A. O.; FRANCO, C. R. C.; TRINDADE, E. S.; CARVALHO, L. C. M.; VEIGA, S. S; LEITE, E. L.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B. A fucan from the brown seaweed

Spatoglossum schoederi inhibits Chinese hamster ovary cell adhesion to several extracellular matrix proteins. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, Brasil, v. 34, p. 621-626, 2001.

ROCHA, H. A. O.; LEITE, E. L.; MEDEIROS, V. P. et al. Natural sulfated polysaccharides as antithrombotic compounds. Structural characteristics and effects on the coagulation cascade. Em: VERLI, H.; GUIMARÃES, J. A. Insights into. Carboh Struct and Biolo Function. Kerala: Transworld Research Network. V.: 51-67, 2006.

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

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

Silva, T.M.A.; Alves, L.G.; Quiroz, K.C.S.; Santos, M.G.L.; Marques, C.T.; Chavante, S.F.; Rocha, H.A.O.; Leite, E.L. Partial characterization and anticoagulant activity of a heterofucana from the brown seaweed Padina gymnospora. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v.18, p.523-33, 2005.

SITHRANGA BOOPATHY, N.; KATHIRESAN K. Anticancer Drugs from Marine Flora: An Overview. J. Oncol., 2010 (2010), pp. 1–18

SKRIPTSOVA, A.V., SHEVCHENKO N.M., ZVYAGINTSEVA T.N., IMBS T.I. *Monthly changes in the content and monosaccharide composition of fucoidan from Undaria pinnatifida* (Laminariales, Phaeophyta) (2010) Journal of Applied Phycology, 22 (1) , pp. 79-86.

SOUSA, A. P. A.; PESSOA, C. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAIS, M. O.; TORRES, M.R.; ALVES, A. P. N. N. In vivo growth-inhibition of Sarcoma 180 by alginates from brown seaweed Saragassum vulgare. Carbohydrate Polymers, v. 66, p. 1, 2007

SOUZA, B.W.S.; CERQUEIRA, M.A.; BOURBON, A.I.; PINHEIRO, A.C.; MARTINS, J.T.; TEIXEIRA, J.A.; COIMBRA, M.A.; VICENTE, A.A. *Food Hydrocoll.*, 27, pp. 287–292.(2012).

Stengel, D. B.; Connan, S. & Popper, Z. A. Algal chemodiversity and bioactivity: Sources of natural variability and implications for commercial application. *Biotechnology Advances*, 29, 483-501, 2011.

STENTELAIRE, C., ANTOINE, N., CABROL, C., FERON, G., DURAN, A., 2001. Development of a rapid and highly sensitive biochemical method for the measurement of fungal spore viability. An alternative to the CFU method. *Enzyme Microb. Technol.* 29, 560–566

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

SYNYTSYA A., KIM W.-J., KIM S.-M., POHL R. Structure and antitumour activity of fucoidan isolated from sporophyll of Korean brown seaweed *Undaria pinnatifida* (2010) *Carbohydrate Polymers*, 81 (1) , pp. 41-48.

TAKEDA, K.; HAYAKAWA, Y.; SMYTH, M. J; KAYAGAKI, N.; YAMAGUCHI, N.; KAKUTA, S.; IWAKURA, Y.; YAGITA, H.; OKUMURA, K. Involvement of tumor 136 necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. *Nat. Med.*, v. 7, p. 94–100, 2001.

TUNNEY, M.M., RAMAGE, G., FIELD, T.R., MORIARTY, T.F., STOREY, D.G., 2004. Rapid colorimetric assay for antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 1879–1881.

TURK, S. S.; SCHNEIDER, R. Printing properties of a high substituted guar gum and its mixture with alginate. *Dye Pigment* v. 47, p. 269-275, 2000.

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

VIDOTTI, E.C.; ROLLEMBERG, M.C.E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à biorremediação e à química analítica. *Química Nova*, v. 27, n. 1, p.139-145, 2004.

VISHCHUK O.S., ERMAKOVA S.P., PHAM T.D., LY B.M., ZVYGAGINTSEVA T.N. (2009) *J. Pac. Med.*, 3 , pp. 92-96. Antitumor activity of fucoidans from brown algae. *Pacific Medical Journal*, 3 (2009), pp. 92–96

VISHCHUK O.S., ERMAKOVA S.P., ZVYGAGINTSEVA T.N. Sulfated polysaccharides from brown seaweeds *Saccharina japonica* and *Undaria pinnatifida*: Isolation, structural characteristics, and antitumor activity (2011) *Carbohydrate Research*, 346 (17) , pp. 2769-2776.

VO, T.S.; NGO, D.H.; KIM, S.K. Marine algae as a potential pharmaceutical source for anti-allergic therapeutics; *Process Biochem.*, 47 (2012), pp. 386–394

VO, T.S.; NGO, D.H.; KIM, S.K. Potential targets for anti-inflammatory and anti-allergic activities of marine algae: An overview. *Inflamm. Allergy Drug Targets*, 11 (2012), pp. 90-101

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

WIJESEKARA I.; PANGESTUTI, R.; KIM S.K. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. *Carbohydr. Polym.* 84 (2011), pp. 14–21

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Cancer Report, 2008**. International Agency for Research on Cancer, Ed. BOYLE, P.; LEVIN, B., 510p., 2015.

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

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

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

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

ZHANG, C.Y.; WU, W.H.; WANG, J.; LAN M.B. Antioxidant properties of polysaccharide from the brown seaweed *Sargassum graminifolium* (Turn.), and its effects on calcium oxalate crystallization. *Mar. Drugs*, 10 (2012), pp. 119–130

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

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

ANEXOS

Tabela 1. Efeito da DCA nos parâmetros bioquímicos

Droga	Dose (mg/kg)	ALT (UI/L)	AST (UI/L)	Uréia (mg/dL)
Salina		65,99 ± 14,05 b c	92,01 ± 11,5 b	32,4 ± 2,7
DCA	25	150,5 ± 13,0	166,4 ± 12,2 a c	36,7 ± 2,2
DCA	50	162,6 ± 7,70	99,95 ± 13,6 c	30,7 ± 2,4

Resultados foram expressos em ± E.P.M. para oito animais.

a ($p < 0.05$) quando comparado ao grupo experimental salina utilizando ANOVA (Teste de Newman–Keuls).

b ($p < 0.05$) quando comparado ao grupo experimental DCA 25 utilizando ANOVA (Teste de Newman–Keuls).

c ($p < 0.05$) quando comparado ao grupo experimental DCA 50 utilizando ANOVA (Teste de Newman–Keuls).

Tabela 2. Efeito da DCA nos parâmetros Hematológicos

Droga	Dose (mg/kg)			Contagem diferencial de leucócitos (%)		
		Leucócitos totais (10^3 cel/ml)	Plaquetas (10^5 cel/ml)	Neutrófilos	Monócitos	Linfócitos
Salina		1.7 ± 0.3	6.0 ± 0.3 bc	30 ^c	8 ^{bc}	62
DCA	25	2.3 ± 0.4	9.5 ± 0.9 ac	32	4 ^a	64
DCA	50	2.7 ± 0.3	10.5 ± 0.4 ab	34	3 ^a	63

Resultados foram expressos em \pm E.P.M. para oito animais.

a ($p < 0.05$) quando comparado ao grupo experimental salina utilizando ANOVA (Teste de Newman–Keuls).

b ($p < 0.05$) quando comparado ao grupo experimental DCA 25 utilizando ANOVA (Teste de Newman–Keuls).

c ($p < 0.05$) quando comparado ao grupo experimental DCA 50 utilizando ANOVA (Teste de Newman–Keuls).

