



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

**POTENCIAL ANTITUMORAL DE ALGINATOS ISOLADOS  
DA ALGA MARINHA MARROM  
*Sargassum vulgare* C. AGARDH (1820)**

ALESSANDRA DE PAULA ALVES SOUSA

FORTALEZA- CE

2006

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Universidade Federal do Ceará  
Faculdade de Medicina  
Departamento de Fisiologia e Farmacologia

**POTENCIAL ANTITUMORAL DE ALGINATOS ISOLADOS DA ALGA MARINHA  
MARROM *Sargassum vulgare* C. AGARDH (1820)**

**ALESSANDRA DE PAULA ALVES SOUSA**

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

**Orientadora:**

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

**Fortaleza - CE  
Janeiro, 2006**

**POTENCIAL ANTITUMORAL DE ALGINATOS ISOLADOS DA ALGA MARINHA  
MARROM *Sargassum vulgare* C. AGARDH (1820)**

**Alessandra de Paula Alves Sousa**

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

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

Aprovada em 13 de Janeiro de 2006.

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Letícia Veras Costa-Lotufo**  
Universidade Federal do Ceará  
- Orientadora -

---

**Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Helena Serra Azul Monteiro**  
Universidade Federal do Ceará

---

**Prof<sup>a</sup> Dr. Wladimir Ronald Lobo Farias**  
Universidade Federal do Ceará

*Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, e não tivesse amor, seria como o metal que soa ou como o sino que tine. E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria. E ainda que distribuísse toda a minha fortuna para sustento dos pobres, e ainda que entregasse o meu corpo para ser queimado, e não tivesse amor, nada disso me aproveitaria.*

*O amor é sofredor; é benigno; o amor não é invejoso; o amor não trata com leviandade, não se ensoberbece. Não se porta com indecência, não busca os seus interesses, e irrita, não suspeita mal. Não folga com a injustiça, mas folga com a verdade; tudo sofre, tudo crê, tudo espera, tudo suporta...*

*I Coríntios 13*

À Dr<sup>a</sup>. Leticia Veras Costa-Lotufu, pela realização deste trabalho, orientação, incentivo e desafios profissionais;

À Dr<sup>a</sup>. Cláudia do Ó Pessoa, pelos bons momentos de confraternizações e contribuição para o meu crescimento acadêmico;

À Dr. Manoel Odorico de Moraes, pelo apoio à pesquisa no Laboratório de Oncologia Experimental;

À Dr. Wladimir Ronald Lobo Farias, pela participação na banca de defesa.

À Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Negreiros Nunes Alves, pelas análises histopatológicas;

À Dr<sup>a</sup>. Helena Serra Azul Monteiro, pela realização dos experimentos de nefrotoxicologia e participação na banca de defesa;

À Dr<sup>a</sup>. Nylane Maria Nunes Alencar, pela realização dos experimentos hematológicos e bioquímicos;

À Dr<sup>a</sup>. Márcia Rocha Torres, pela parceria profissional desde a graduação, ajuda amizade e companheirismo;

À amiga Gardenia Carmen Gadelha Militão pela força, confidências, risadas, apoio e é lógico pelos bons momentos de baladas;

Aos amigos Hemerson Magalhães e Daniel Pereira (meu grande parceiro Doquinha) por todos os momentos, companheirismo e amizade;

Aos amigos Paula Jimenez, Marne Vasconcelos e Márcio Roberto pela ajuda e apoio.

As amigas e companheiras fiéis da balada Ivana Dantas, Raquel Braga, Soraya Matias e Mariana Sobral;

Aos pós-graduandos do Laboratório de Oncologia Experimental: Bruno Coelho, Diego Veras, Rômulo Feio, Raquel Montenegro, Patrícia Marçal, Paulo Michel, Patrícia Bonavides, André Viana e Danilo pelo companheirismo e amizade;

Aos pós-graduandos e funcionários do IBIMED Paulo Barbosa, Renata Souza, René Duarte, Jorge e Silvia pela ajuda na realização dos experimentos de nefrotoxicologia;

Aos alunos de graduação do Laboratório de Oncologia experimental: Juliana, Lidiane, Hidelbrando, Elthon, Marcelle, Sabrina, Lorena, Laylane, Carla, Érika pela

As técnicas Silvana França e Luciana sempre prontas a ajudar e Maria de Fátima pelos conselhos;

Aos professores do Departamento de Fisiologia e Farmacologia pelo exemplo e contribuição direta para o meu crescimento científico;

Às funcionárias do Departamento de Fisiologia e Farmacologia Silvia, Áurea, Rose, sempre prestativas;

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

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Ceará (FUNCAP) pelo apoio financeiro, o qual foi essencial para dedicação e realização deste trabalho.



## ÍNDICE

Lista de Figuras .....	x
Lista de Tabelas .....	xiii
Lista de Símbolos e Abreviaturas .....	xiv
Resumo .....	xvii
Abstract .....	xviii
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>01</b>
1.1 Câncer.....	01
1.2 Polissacarídeos com propriedades antitumorais.....	04
1.3 Algas marinhas como fonte de produtos bioativos.....	10
1.4 <i>Sargassum vulgare</i> C. Agardh.....	14
1.5 Alginatos.....	16
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>20</b>
2.1- Geral.....	20
2.2 - Específicos .....	20
<b>3. MATERIAL.....</b>	<b>21</b>
3.1 As algas marinhas.....	21
3.2 Material Biológico.....	21
3.2.1 Animais.....	21
3.2.2 Animais marinhos.....	21
3.2.3 Células tumorais.....	22
3.3. Equipamentos .....	22
3.4 Soluções e Reagentes.....	23
<b>4. MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
4.1 Armazenamento das algas marinhas.....	26
4.2 Identificação das espécies.....	26
4.3 Extração e purificação dos alginatos.....	26
4.3.1 Caracterização físico-química.....	27

4.4 Estudo da citotoxicidade dos alginatos –V e +V <i>in vitro</i> .....	29
4.4.1 Avaliação da atividade antiproliferativa em células tumorais <i>in vitro</i> .....	29
4.4.2 Avaliação do potencial antimitótico sobre o desenvolvimento do -do-mar <i>Lytechinus variegatus</i> .....	30
4.4.3 Avaliação da atividade hemolítica em eritrócitos de camundongos <i>Mus musculus</i> Swiss.....	32
4.4.4 Determinação da toxicidade aguda em larvas de <i>Artemia salina</i> ....	33
4.4.5 Análise estatística .....	33
4.5 Estudo <i>in vivo</i> da atividade antitumoral dos alginatos –V e +V no modelo experimental do Sarcoma 180 .....	34
4.5.1 Cultura do tumor Sarcoma 180.....	34
4.5.2 Avaliação dos alginatos –V e +V na inibição do crescimento tumoral.....	34
4.5.3 Avaliação dos alginatos –V e +V associados ao 5-Fluouracil na inibição do crescimento tumoral.....	35
4.5.4 Análise histológica.....	36
4.5.5 Avaliação da proliferação tumoral por imunohistoquímica com KI-67.....	36
4.5.6 Determinação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos.....	37
4.5.7 Análise estatística.....	38
4.6 Estudo da nefrotoxicidade dos alginatos –V e +V.....	39
4.6.1 A solução perfusora e seu preparo.....	39
4.6.2 Perfusão renal.....	39
4.6.3 Calibração do sistema de perfusão renal.....	41
4.6.4 Técnica cirúrgica.....	42
4.6.5 Protocolo experimental.....	44
4.6.6 Análise bioquímica.....	44
4.6.7 Cálculo dos parâmetros renais.....	44
4.6.8 Análise estatística.....	46
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>47</b>
5.1 Estudo da citotoxicidade dos alginatos –V e +V <i>in vitro</i> .....	47
5.2 Estudo <i>in vivo</i> da atividade antitumoral dos alginatos –V e +V no	47

modelo experimental do Sarcoma 180.....	
5.2.1 Inibição tumoral.....	47
5.2.2 Histopatologia do tumor Sarcoma 180.....	51
5.2.3 Imunohistoquímica do KI-67.....	54
5.3 Estudo da toxicidade.....	55
5.3.1 Determinação do peso dos órgãos dos animais inoculados com o Sarcoma 180 e tratados com os alginatos.-V e +V .....	55
5.3.2 Análise histopatológica dos órgãos dos animais inoculados com o Sarcoma 180 e tratados com os alginatos.-V e +V.....	59
5.3.3 Nefrotoxicidade dos alginatos -V e +V no sistema de perfusão renal.....	68
5.3.4 Análise dos parâmetros bioquímicos e hematológicos.....	73
<b>6. DISCUSSÃO</b>	<b>78</b>
<b>7. CONCLUSÃO</b>	<b>98</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>99</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Destruição de células cancerígenas por mecanismos do sistema imune mediados pela Lentinan.	09
<b>Figura 2</b>	Alguns compostos isolados de algas marinhas com propriedades farmacológicas. A- Carragenina; B- Caulerpenina; C- Kahalalida F; D-Ácido palmítico; E- Deidrotirsiferol.	13
<b>Figura 3</b>	Fotografia da alga marinha <i>Sargassum vulgare</i> C. Agardh	15
<b>Figura 4</b>	Representação química dos monômeros de alginato de acordo com Moe e colaboradores, 1995	18
<b>Figura 5</b>	Biossíntese de alginato	18
<b>Figura 6</b>	Roteiro de extração e purificação dos alginatos	28
<b>Figura 7</b>	Fotomicrografias da embriogênese do ovo de ouriço-do-mar <i>Lytechinus variegatus</i>	31
<b>Figura 8</b>	Fotomicrografias da larva <i>Pluteus</i> do ouriço-do-mar <i>Lytechinus variegatus</i>	31
<b>Figura 9</b>	Sistema de perfusão de rim isolado	40
<b>Figura 10</b>	Representação esquemática do sistema de perfusão de rim isolado	41
<b>Figura 11</b>	Calibração do sistema: Velocidade da bomba X Pressão de perfusão e Velocidade da bomba X Fluxômetro	42
<b>Figura 12</b>	Técnica cirúrgica	43
<b>Figura 13</b>	Determinação do peso do tumor no décimo dia dos animais transplantados com o tumor Sarcoma 180 e tratados durante 7 dias consecutivos com o Alginato -V ip e vo nas concentrações de 50 e 100 mg/m <sup>2</sup> , 5-FU (25 mg/m <sup>2</sup> ) e salina ambos i.p.....	49
<b>Figura 14</b>	Determinação do peso do tumor no décimo dia dos animais transplantados com o tumor Sarcoma 180 e tratados durante 7 dias consecutivos com o Alginato +V i.p e v.o nas concentrações de 50 e 100 mg/m <sup>2</sup> , 5-FU (25 mg/m <sup>2</sup> ) e salina ambos i.p.....	49
<b>Figura 15</b>	Determinação do peso do tumor no décimo dia dos animais transplantados com o tumor Sarcoma 180 e tratados durante 7 dias consecutivos com os Alginatos -V e +V por via oral na concentração de 25 mg/m <sup>2</sup> , 5-FU (15 mg/m <sup>2</sup> ), a associação de ambos os tratamentos e salina....	50
<b>Figura 16</b>	Microfotografia dos cortes histológicos (400X) do tumor	52

	Sarcoma 180 no décimo dia, após 7 dias de tratamento com o alginato -V (50 e 100 mg/m <sup>2</sup> ) por i.p. e v.o. e 5-FU (25 mg/m <sup>2</sup> ).....	
<b>Figura 17</b>	Microfotografia dos cortes histológicos (400X) do tumor Sarcoma 180 no décimo dia, após 7 dias de tratamento com o alginato +V (50 e 100 mg/m <sup>2</sup> ) por i.p. e v.o. e 5-FU (25 mg/m <sup>2</sup> ).....	53
<b>Figura 18</b>	Determinação do número de células positiva marcadas para -67 do tumor Sarcoma 180 no décimo dia nos animais tratados durante 7 dias consecutivos com o Alginato -V e +V i.p e v.o na concentração de 100 mg/m <sup>2</sup> , 5-FU (25 mg/m <sup>2</sup> ) e salina ambos i.p.....	54
<b>Figura19</b>	Determinação do peso dos órgãos fígado, rim e baço no décimo dia dos animais transplantados com o tumor Sarcoma 180 tratados durante 7 dias consecutivos com o Alginato -V ip e vo nas concentrações de 50 e 100 mg/m <sup>2</sup> , 5-FU (25 mg/m <sup>2</sup> ) e salina ambos i.p.....	56
<b>Figura 20</b>	Determinação do peso dos órgãos fígado, rim e baço no décimo dia dos animais transplantados com o tumor Sarcoma 180 tratados durante 7 dias consecutivos com o Alginato +V ip e vo nas concentrações de 50 e 100 mg/m <sup>2</sup> , 5-FU (25 mg/m <sup>2</sup> ) e salina ambos i.p.....	57
<b>Figura 21</b>	Determinação do peso dos órgãos fígado, rim e baço nos animais transplantados com o tumor Sarcoma 180 tratados durante 7 dias consecutivos com o Alginato -V e +V v.o na concentração de 25 mg/m <sup>2</sup> e ambos na mesma concentração associados ao 5-FU (15 mg/m <sup>2</sup> , i.p), 5-FU (15 mg/m <sup>2</sup> ) e salina ambos i.p.....	58
<b>Figura 22</b>	Microfotografia dos cortes histológicos (400X) do fígado dos animais, após 7 dias de tratamento com o alginato -V (50 e 100 mg/m <sup>2</sup> ) por i.p. e v.o. e 5-FU (25 mg/m <sup>2</sup> ).....	62
<b>Figura 23</b>	Microfotografia dos cortes histológicos (400X) do fígado dos animais, após 7 dias de tratamento com o alginato +V (50 e 100 mg/m <sup>2</sup> ) por i.p. e v.o. e 5-FU (25 mg/m <sup>2</sup> ).....	63
<b>Figura 24</b>	Microfotografia dos cortes histológicos (400X) do rim dos animais, após 7 dias de tratamento com o alginato -V (50 e 100 mg/m <sup>2</sup> ) por i.p. e v.o. e 5-FU (25 mg/m <sup>2</sup> ).....	64
<b>Figura 25</b>	Microfotografia dos cortes histológicos (400X) do rim dos animais, após 7 dias de tratamento com o alginato +V (50 e 100mg/m <sup>2</sup> ) por i.p. e v.o. e 5-FU (25 mg/m <sup>2</sup> ).....	65

<b>Figura 26</b>	Microfotografia dos cortes histológicos (400X) do baço dos animais, após 7 dias de tratamento com o alginato -V (50 e 100 mg/m <sup>2</sup> ) por i.p. e v.o. e 5-FU (25 mg/m <sup>2</sup> ).....	66
<b>Figura 27</b>	Microfotografia dos cortes histológicos (400X) do baço dos animais, após 7 dias de tratamento com o alginato +V (50 e 100 mg/m <sup>2</sup> ) por i.p. e v.o. e 5-FU (25 mg/m <sup>2</sup> ).....	67
<b>Figura 28</b>	Efeito dos alginatos -V e +V na concentração de 10 µg/mL na pressão de perfusão e resistência vascular renal no sistema de perfusão renal.....	69
<b>Figura 29</b>	Efeito dos alginatos -V e +V na concentração de 10 µg/mL na fluxo urinário e ritmo de filtração glomerular no sistema de perfusão renal.....	70
<b>Figura 30</b>	Efeito dos alginatos -V e +V na concentração de 10 µg/mL no transporte dos íons sódio, potássio e cloreto no sistema de perfusão renal.....	71
<b>Figura 31</b>	Efeito dos alginatos -V e +V na concentração de 10 µg/mL na excreção dos íons sódio, potássio e cloreto no sistema de perfusão renal.....	72
<b>Figura 32</b>	Análise hematológica dos animais transplantados com o tumor Sarcoma 180 e tratados com os alginatos -V e +V (25mg/m <sup>2</sup> ), 5-FU (15 mg/m <sup>2</sup> ), bem como a associação de ambos os tratamentos.....	76

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Classificação da espécie <i>Sargassum vulgare</i> C. Agardh de acordo com a classificação de Wyne, 1986.....	14
<b>Tabela 2</b>	Linhagens celulares utilizadas no ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> .....	22
<b>Tabela 3</b>	Características físico-químicas dos alginatos -V e +V extraídos de <i>Sargassum vulgare</i> .....	27
<b>Tabela 4</b>	Análise bioquímica das enzimas aspartato amino transaminases (AST), uréia e creatinina dos animais transplantados com o tumor Sarcoma 180 e tratados com os alginatos -V e +V na concentração de 25 mg/m <sup>2</sup> , 5-FU na concentração de 15 mg/m <sup>2</sup> , bem como a associação de ambos os tratamentos.....	75
<b>Tabela 5</b>	Resultados obtidos com os alginatos -V e +V da alga marinha <i>Sargassum vulgare</i> C. Agardh.....	77

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

%	Porcentagem
&	E
dL	decilitro
μL	Microlitro
mM	Micromolar
°C	Graus Celsius
[ ]	Concentração
<	Menor que
>	Maior que
%TCI <sup>-</sup>	Transporte de íons cloreto
%TK <sup>+</sup>	Transporte de íons potássio
%TNa <sup>+</sup>	Transporte de íons sódio
ANOVA	Analysys of Variance (Análise de variância)
AST	Aspartato amino transaminase
CD	Receptor de superfície celular leucocitária
C <sub>50</sub>	Concentração inibitória média
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono (gás carbônico)
dL	decilitro
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
E.P.M.	Erro padrão da média
ECl <sup>-</sup>	Excreção de íons cloreto
EK <sup>+</sup>	Excreção de íons potássio
ENa <sup>+</sup>	Excreção de íons sódio
EtOH	Álcool etílico
FU	Fluxo urinário
g	Gramma
h	Hora
H/E	Hematoxilina/Eosina



H <sub>2</sub> O	Água destilada
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
i.p	Via de administração intraperitoneal
IC	Intervalo de confiança
IFN-ã	Interferon gamma
IL	Interleucinas
L	Litro
LAK	Linfócitos ativados por linfocinas
LAK	Linfotoxina ativadora de linfócitos
M	Molar
m <sup>2</sup>	Metro quadrado
MeOH	Álcool metílico
mg	Miligrama
MHz	Megahertz
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H tetrazolina bromido
NK	Células natural killer
nM	Nanomolar
NO	Óxido nítrico
n <sup>o</sup>	Número
PBS	Phosphate buffer solution (Tampão fosfato)
pH	Potencial hidrogeniônico
PP	Pressão de perfusão
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RFG	Ritmo de filtração glomerular
rpm	Rotações por minuto
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RVR	Resistência vascular renal
TBS	Tris buffer solution (Tampão tris)
TNF-á	Fator de necrose tumoral alfa

TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral beta
US-NCI	United States National Cancer Institute (Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos)
v.o	Via de administração oral
UI/L	Unidade internacional por litro

V apresentou maior toxicidade que o alginato +V. O estudo da nefrotoxicidade avaliada no sistema de perfusão renal demonstrou que o alginato -V também apresenta um maior efeito que o alginato +V. A análise histopatológica do baço revelou que ambos os alginatos levam a uma hiperplasia da polpa branca nos animais tratados, o que sugere que a atividade antitumoral esteja relacionada às propriedades imunomoduladoras desses compostos. De acordo com a análise hematológica, os animais tratados com o 5-Fu (15 mg/m<sup>2</sup>) apresentaram leucopenia e linfocitopenia, sendo este quadro revertido com o tratamento associado com os alginatos -V e +V (25 mg/m<sup>2</sup>).

**Palavras chave:** *Sargassum vulgare*, alginato, alga marinha, antitumoral.

## ANTITUMOR POTENTIAL OF ALGINATES ISOLATED FROM THE SEAWEED BROWN *Sargassum vulgare* C. AGARDH (1820).

Author: Alessandra de Paula Alves Sousa. Advisor: Dr<sup>a</sup>. Leticia Veras Costa-Lotufo. Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, 2006.

Alginates are natural polysaccharides composed of linear polymers of 1-4 linked  $\beta$ -D- mannuronic and  $\alpha$ -L-guluronic acid residues in widely varying composition and sequential arrangements. The purpose of this study was to evaluate the anti cancer potential of two alginates -V (low viscosity) and +V (high viscosity), isolated from the seaweed *Sargassum vulgare*. Alginates were tested for cytotoxicity using the brine shrimp lethality assay, sea urchin development assay, hemolysis assay and MTT assay using HL-60, MCF-7, CEM, HCT-8 and B16 tumor cell lines. None of the compounds tested showed *in vitro* toxicity. On the other hand, alginates showed antitumor activity *in vivo* against Sarcoma 180 cells transplanted in mice. Both alginates inhibited the growth of solid tumor in mice implanted with  $5 \times 10^5$  tumor cells after both oral and intraperitoneal administration at 50 and 100 mg/m<sup>2</sup>, as well as 25 mg/m<sup>2</sup> after oral administration. Alginate +V presented higher inhibition effects after oral administration. The association of alginate +V (25 mg/m<sup>2</sup>) with 5-FU (15 mg/m<sup>2</sup>) showed an increasing activity against tumor compared to +V individually. Alginates antitumor activity at 50 and 100 mg/m<sup>2</sup> was related to the tumor proliferation rate inhibition, as observed by reduction of Ki-67 staining in tumor of the treated-animals. The histopathological analysis revealed that both alginates administrated at 50 and 100 mg/m<sup>2</sup> presented hepatotoxicity and nephrotoxicity, being -V was more toxic than +V. The kidney perfusion assay demonstrated that -V was more toxic than +V, corroborating data from histopathological analysis. The histopathological analysis of spleen showed that both alginates cause the enlargement of the white pulp of treated animals, suggesting that the observed antitumor activity could be related to alginates immunomodulatory properties. In fact, the alginates treatment (25 mg/m<sup>2</sup>) prevents the reduction number of leukocytes and lymphocytes, induced by 5-FU treatment as observed from the hematological analysis.

**Key words:** *Sargassum vulgare*, alginate, seaweed, antitumor

causa de morte no mundo perdendo apenas para as doenças cardiovasculares. Apesar do considerável arsenal de drogas já existentes para o tratamento do câncer, ainda não se chegou ao sucesso terapêutico em vários tipos de neoplasias.

De acordo com Parkin *et al.* (2001), no ano de 2000 foram registrados 5,3 milhões de casos de câncer em homens e 4,7 milhões de casos em mulheres. A incidência mundial de câncer chega a mais de 10 milhões de novos casos, dentre os quais, 53% têm ocorrido nos países em desenvolvimento (Instituto Nacional do Câncer, 2004). No Brasil, estima-se que em 2005 surgirão mais de 467.440 novos casos (Ministério da Saúde, 2005).

Os cânceres podem surgir basicamente através de 3 fatores, a predisposição genética, fatores ambientais e a ingestão de substâncias carcinogênicas através da dieta. Este último é responsável por cerca de 35% de todos os casos de cânceres no mundo. Quando é adicionado um carcinógeno como álcool e cigarro, este percentual aumenta para 60%. Acredita-se que a predisposição genética seja responsável aproximadamente por 20% dos casos de câncer, e a maioria desses casos está associada também a exposição a *et al.*, 2003). Estatisticamente as maiores incidências no homem são o câncer de intestino, cólon, reto e próstata, enquanto

na mulher, são o câncer de mama, colo do útero, reto e estômago (Abdulla & Gruber, 2000).

Acredita-se ser a transformação de uma célula normal em célula neoplásica um processo com muitos estágios que pode levar para se completar. Os estágios da carcinogênese incluem iniciação, promoção e progressão tumoral. O primeiro estágio envolve uma reação entre as substâncias promotoras do câncer (carcinógeno) e o DNA das células teciduais. Durante este estágio, a suscetibilidade genética é bastante limitante, podendo esta mutação permanecer inativa e o risco de desenvolvimento do câncer ocorre durante o estágio posterior. Este ocorre lentamente por um período de meses a anos (Reddy *et al.*, 2003). No entanto, acredita-se que a transformação celular é um evento freqüente, que em muitos casos, não leva ao desenvolvimento tumoral. Isto ocorre provavelmente pelas inúmeras limitações metabólicas, fisiológicas e físicas dos componentes do sistema imune que elimina células potencialmente perigosas ao processo carcinogênico (Dunn *et al.*, 2004).

A massa tumoral originada a partir de um único clone celular é constituída por uma população de células heterogêneas. As subpopulações de células diferem em relação a vários atributos fenotípicos, como cariótipo, responsividade hormonal e suscetibilidade a agentes antineoplásicos. Por exemplo, tumores com baixa fração de crescimento como o câncer de mama e de colo do útero possuem uma menor suscetibilidade à quimioterapia, bem como a ausência de antigenicidade das células proporciona uma maior resistência ao ataque terapêutico (Dunn *et al.*, 2004). Diante desta grande diversidade biológica do câncer, a associação de diferentes tipos de terapias utilizadas atualmente no tratamento do câncer e a busca de novas estratégias de intervenção têm surgido com uma perspectiva de se atingir uma grande eficácia terapêutica.

A quimioterapia atualmente é uma das principais modalidades terapêuticas comumente utilizada no tratamento de pacientes com vários tipos de câncer. Contudo, em muitos casos, somente a quimioterapia não leva a resultados terapêuticos satisfatórios como a remissão de tumores e a prevenção de metástase, além de induzir muitos efeitos colaterais nas doses efetivas (Salgaller

crescimento para célula B e fatores de crescimento hematopoéticos (principalmente como fator estimulador de colônia). Estes, portanto, podem influenciar a resposta imune em diferentes estágios. Os modificadores extrínsecos são potencializadores da resposta imunes como o Bacillus Calmette-Guérin (BCG), *Corynebacterium parvum* e endotoxinas que influenciam o crescimento tumoral (Adam *et al.*, 2003) através de uma imunoestimulação não-específica (Bremers & Parmiani, 2000). O aumento ou supressão do sistema imune através de compostos depende de vários fatores, incluindo dose, rota e tempo de administração, bem como dos seus mecanismos de ação e r

Desde a década passada, a imunoterapia tem sido reportada continuamente em vários estudos clínicos de fase I e II. Alguns estudos clínicos de fase III com pacientes em estágios precoces de câncer foram realizados demonstrando que os imunomoduladores podem potencializar ou minimizar a toxicidade promovida pela administração dos quimioterápicos, dentre eles a

## 1.2. Polissacarídeos com propriedades antitumorais

Os carboidratos são aldeídos ou cetonas poliídrolícos de forma empírica  $(\text{CH}_2\text{O})_n$  e constituem as biomoléculas mais abundantes na face da terra. Existem, segundo o seu tamanho, três classes principais de carboidratos: monossacarídeos e polissacarídeos (a palavra “sacarídeo” é derivada do grego sakkharon e significa açúcar) (Lehninger, 2000).



Desde a década de 90, muitos pesquisadores demonstraram a bioatividade antitumoral e imunoestimulante de polissacarídeos isolados de diversas espécies *Atractylodes* (Inagaki *et al.*, 2001), *Angélica sinensis* (Choy *et al.*, 1994), *Panax ginseng* (Lee *et al.*, 1997), *Curcuma zedoaria* (Kim *et al.*, 2000), *Malva verticillata* (Gonda *et al.*, 1990), etc. Alguns polissacarídeos originados dos cogumelos (macrofungos) compostos de  $\beta$ -glucana, glucoronoglicana,

manoglucana e outros heteroglicanas, bem como os complexos polissacarídeos-proteínas, são largamente utilizados na medicina (Saito *et al.*, 1992; Lei & Lin, 1993; Mizuno, 1995) devido às suas propriedades antitumoral e imunomoduladora. Mais de 50 espécies de fungos tem exibido atividade anticâncer *in vitro* ou em modelos animais (Daba & Ezeronye, 2003). Os polissacarídeos purificados de fungos tornaram-se largamente comercializados no Japão, entre eles destacam-se a lentinana, Schizophyllana e PSK, isolados da *Lentinus edodes*, *Schizophyllum commune* e *Coriolus versicolor*, respectivamente (Mizuno, 1995). Ambos a Lentinana e Schizophyllana são  $\beta$ -glucanas puras enquanto a PSK é uma  $\beta$ -glucana ligado a peptídeos. Na China, o PSP (polissacaropeptídeo) foi isolado do fungo *Coriolus versicolor* e é atualmente usado no tratamento anticâncer (Yang *et al.*, 1992).

Muitos polissacarídeos de algas com o potencial antitumoral têm chamado a atenção para o desenvolvimento de novas drogas (Guyen *et al.*, 1991). Em 1974, Yamamoto *et al.* reportaram que uma fração não dializada de algumas algas comumente utilizadas no Japão como: *Sargassum fulvellum*, *S. kjellmanianum*, *Laminaria angustata* e *L. angustata var. lonngissima*, inibia o crescimento de células do sarcoma 180 implantadas subcutanêamente em camundongos, e que esta fração consistia principalmente de polissacarídeos. A  $\kappa$ -carragenina, uma galactana sulfatada isolada da alga vermelha *Chondrus ocellatus*, inibi o crescimento tumoral do sarcoma 180 e H22 em camundongos através da proliferação de linfócitos e células NK do baço (Zhou *et al.*, 2004).

O potencial antitumoral de polissacarídeos provavelmente minimiza as insatisfações provocadas pelo tratamento do câncer através da quimioterapia e radioterapia. Um grande número de compostos químicos que têm sido identificados como agentes específicos para matar células tumorais, tam tóxicos para células não neoplásicas. Desta maneira, muitas dessas drogas antitumorais possuem consideráveis efeitos colaterais, com baixa viabilidade para o uso clínico. Diante desta circunstância, a descoberta e identificação de novas drogas seguras com atividade antitumoral tornou-se uma importante meta da pesquisa nas Ciências Biomédicas. O aumento ou a potencialização dos

mecanismos de defesa emergiram como uma possível forma de inibição do crescimento tumoral sem prejudicar o organismo (Ooi & Liu, 2000).

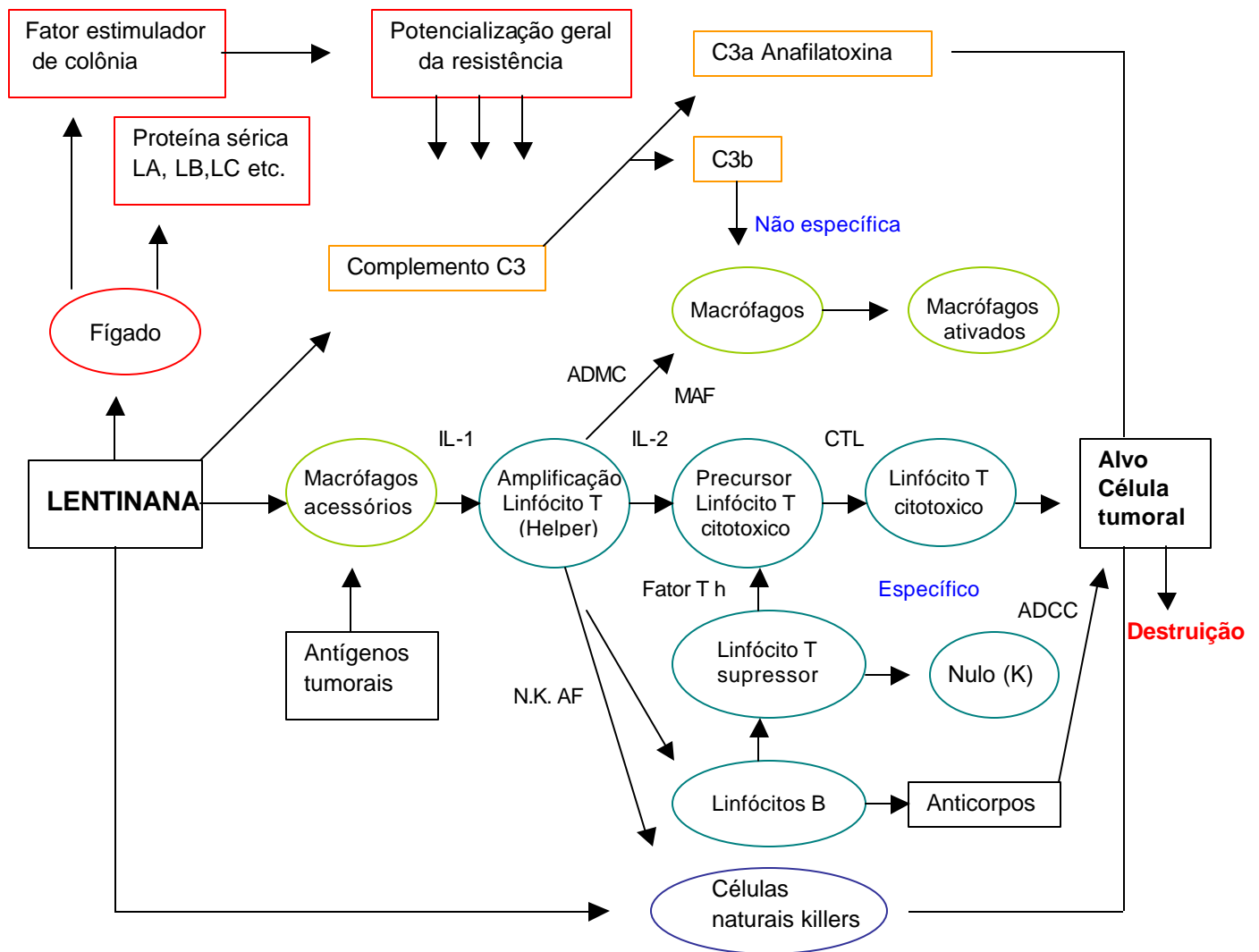
No estudo realizado por Furue *et al.*, em 1981, demonstrou-se que a lentinana, prolonga a sobrevida de pacientes com câncer, especialmente nos casos de carcinomas coloretal e gástrico. Pacientes tratados com tegafur ou com uma combinação deste com a lentinana mostraram um aumento da sobrevida, em 19.5% mais de um ano, 10.4% mais de dois anos e 6.5% mais de três anos, dados estes significativamente maiores para o grupo tratado com o tegafur associado a lentinana. A lentinana em conjugação com os agentes quimioterápicos reduz excepcionalmente os efeitos de debilidade dos quimioterápicos, por exemplo náuseas, dor, queda de cabelo e imunodepressão (Daba & Ezeronye, 2003)

Inúmeros polissacarídeos de origem natural têm demonstrado atividade depressora no crescimento tumoral por ativação do sistema imune, com largas aplicações clínicas. Alguns agentes, que são usados principalmente na modalidade terapêutica, têm sido referidos como modificadores da resposta (Ballow & Nelson, 1997) e novas descobertas envolvendo suas identificações têm se tornado um importante alvo de pesquisa na biomedicina. Os modificadores da resposta biológica revelaram-se em estudos clínicos de fase I e II potentes ferramentas para auxiliar o tratamento da quimioterapia, bem como eficazes na prevenção do câncer. Alguns pesquisadores utilizam conjugados de mitomicina C com polissacarídeos antitumorais, tipo schizophyllana (Usui *et al.*, 1994) e PSK (Fujii *et al.*, 1989) com o objetivo de reduzir os efeitos colaterais tóxicos provocados pelos agentes anticâncer, bem como promover uma resposta adjuvante no tratamento do câncer.

Uma importante característica da atividade imunomoduladora dos polissacarídeos é a sua relação estrutura-atividade. Fatores como peso molecular, composição e conformação ou estrutura terciária são relevantes para a bioatividade dos polissacarídeos. Em geral, os polissacarídeos que apresentam em sua estrutura uma conformação ligações do tipo  $\alpha$ 1-3, 1-4 ou 1-6 na cadeia são potencialmente bioativos, assim o complexo de ligação da cadeia, a presença de estruturas aniônicas e o alto peso molecular dos polissacarídeos os tornam

pode ocorrer tanto a nível celular quanto molecular através da liberação de citocinas e quimiocinas. As principais células efetoras do sistema imune que eliminam potencialmente células perigosas (infectadas e neoplásicas) são macrófagos ativados, células naturais killer, linfócitos T citotóxicos (CLT) e killers ativados por linfocinas (LAK) (Ríhova, 2002).

A lentinana foi isolada e estudada pela primeira vez por Chihara *et al.*, 1970, que demonstraram o seu efeito antitumoral. Somente em 1992 e 1999, este mesmo grupo de pesquisadores determinou que o mecanismo antitumoral da lentinana contra vários tipos de cânceres está diretamente relacionado com o seu potencial imunoestimulatório (figura 1). A interação da lentinana com vários tipos celulares do complexo imune ocorre por ligação em receptores próprios para o  $\alpha$ -glucana (de natureza fungica), bem como nos receptores iC3b (CR3, CD11b/CD18) presentes em células NK e fagocíticas. Quando isto acontece, ocorre a fagocitose e/ou liberação de grânulos citotóxicos. Dentre os seus mecanismos, a lentinana também estimula os linfócitos do sangue periférico, ativa células NK, inibe os linfócitos T supressores e aumenta os níveis de linfócitos T citotóxicos no baço (Ross *et al.*, 1999), além de potencializar as respostas inflamatórias principalmente com produção de proteínas de fase aguda (Suga *et al.*, 1986), vasodilatação (Maede *et al.*, 1991) e ativação e proliferação de linfócitos T auxiliares e citotóxicos (Chihara, 1992).



**Figura 1-** Destruição de células cancerígenas por mecanismos do sistema imune mediados pela Lentinana (Chihara, 1992).

s marinhas, invertebrados e algas (Mayer & Lehmann, 2000).

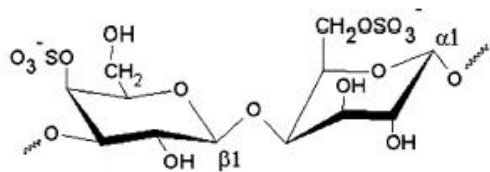
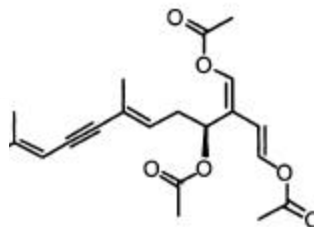
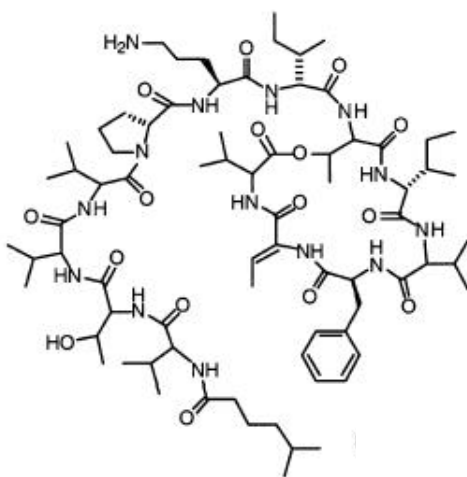
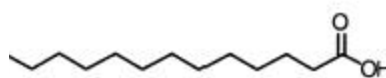
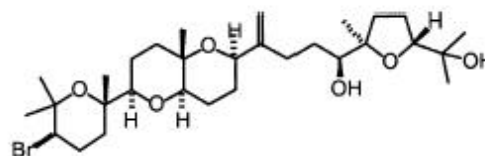
A utilização mundial de macroalgas atualmente gera à indústria bilhões de dólares. Muitas delas são baseadas no cultivo de espécies comestíveis ou na produção de agar, carragenina e alginato. De todos os produtos derivados de algas, os hidrocolóides sofreram a maior influência da sociedade moderna ocidental. Elas, portanto, têm atraído significativamente o comércio através do uso explorado pelas indústrias devido suas propriedades gelificante, solubilizante e emulsificante (Renn, 1997). Contudo, em anos recentes a indústria farmacêutica

-negativas na África do Sul e Botswana em 2003 (Spieler, 2002).

Destaca-se entre as inúmeras propriedades biológicas de compostos presentes nas algas marinhas, as atividades relacionadas com o crescimento celular. Kawakubo *et al.* (1997) demonstraram que lectinas isoladas da *Eucheuma serra* apresentaram capacidade mitogênica em linfócitos de camundongo, estimulando assim a mitose de células quiescentes. Barbier *et al.*, em 2001, investigaram a atividade antiproliferativa da caulerpenina (figura 2b), um sesquiterpeno isolado da alga marinha tropical *Caulerpa taxifolia* anteriormente apresentando citotoxicidade para muitas linhagens celulares. A caulerpenina inibiu a proliferação de células de neuroblastoma humano *in vitro* ( $CI_{50}$ = 10 $\mu$ M) através da inibição da polimerização de microtúbulos. O Kahalalida F (figura 2c) é um depsipeptídeo cíclico produzido pela alga verde *Bryopsis sp.* (e do molusco *Elysia rufescens*) que possui propriedades anticâncer (Hamann et al., 1996, Newman &

*screening*, nos Estados Unidos, conduzido pelo Instituto Nacional do Câncer (NCI), demonstrou uma atividade citotóxica do Halomon, um monoterpene pentahalogenado isolado da alga *Portieria hornemannii*, sendo selecionado para o desenvolvimento pré-clínico de drogas anticâncer (Carte, 1996).



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

**Figura 2-** Alguns compostos isolados de algas marinhas com propriedades farmacológicas. A Carragenina; B- Caulerpenina; C- Kahalalida F; D-Ácido palmítico; E- Deidotirsiferol.

*Sargassum*. Este é freqüente nas águas rasas do sublitoral tropical e subtropical (Paula & Oliveira Filho, 1980). A alga marinha *Sargassum vulgare* C. Agardh (figura 3) é uma espécie muito abundante na costa Sudoeste do Brasil, presente em uma grande extensão da costa Brasileira e biomassa (Paula, 1988; Széchy & Paula, 2000).

**Tabela 1** Classificação da espécie *Sargassum vulgare* C. Agardh de acordo com a classificação de Wynne & Bold, 1978.

<b>REINO</b>	Protista
<b>DIVISÃO</b>	Phaeophyta
<b>ORDEM</b>	Fucales
<b>FAMÍLIA</b>	Sargassaceae
<b>GÊNERO</b>	<i>Sargassum</i>
<b>ESPÉCIE</b>	<i>Sargassum vulgare</i> C. Agardh



**Figura 3-** Fotografia da alga marinha *Sargassum vulgare* C. Agardh

s de ácido gulurônico (G) (Haug & Larsen, 1971).

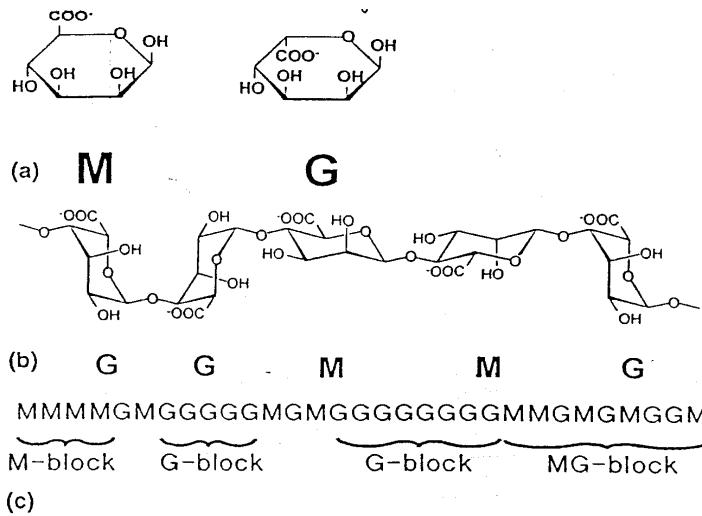
Esses polissacarídeos têm numerosas aplicações na indústria alimentícia, farmacêutica, têxtil, de cosméticos, papel, borracha etc. Nas Ciências Farmacêuticas são usados como sistemas de liberação de drogas, sistemas de bioadesão, agentes emulsificantes e implantes (Fiona *et al.*, 1997). Os alginatos não possuem nenhum valor nutricional, mas são bastante usados como aditivos para melhorar, modificar e estabilizar a textura de certos alimentos, como por exemplo, no preparo de sorvetes por impedirem a formação de cristais macroscópicos de gelo, o que dá ao produto uma característica cremosa (Moe *et al.*, 1995).

Polímeros naturais vêm sendo utilizados no encapsulamento de antígenos o o qual é bastante relevante para o desenvolvimento de vacinas (Singh & Hagan, 1998). Microesferas de alginatos

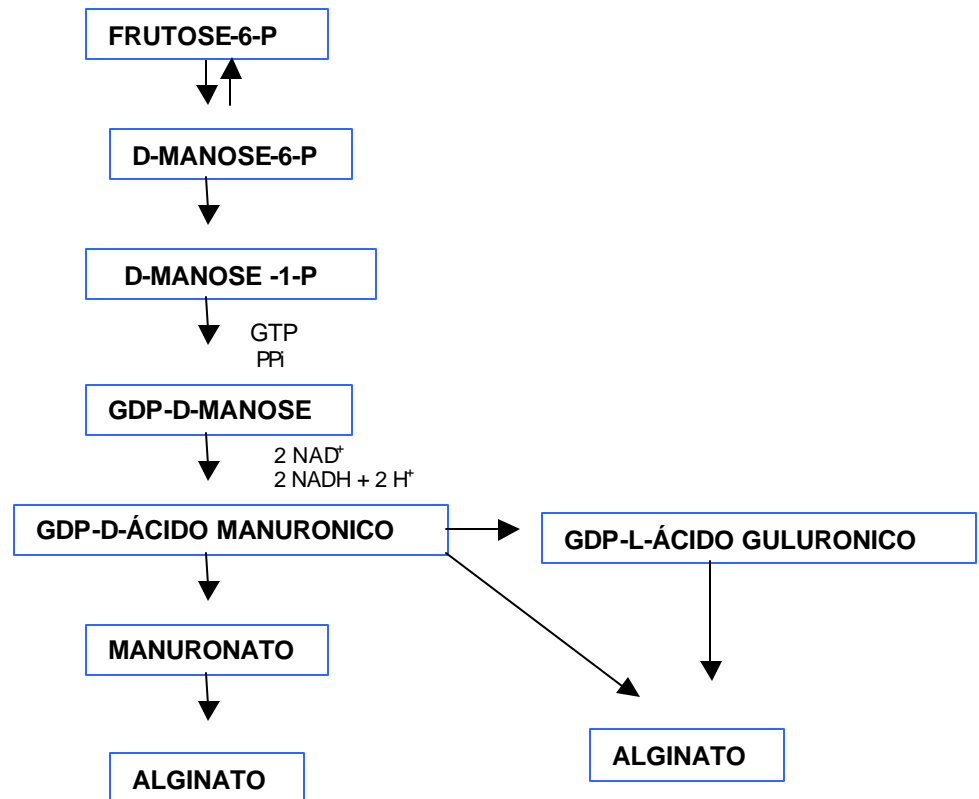
têm sido alvo de muitos estudos de imunização oral e nasal devido várias propriedades favoráveis, entre elas a capacidade de ligação com íons di ou trivalentes como o cálcio (McDowell, 1977) garantindo proteção ao antígeno em decorrência das condições desfavoráveis do ambiente. Possui, ainda, propriedades mucoadesivas (Junginger, 1991), o que pode aumentar o tempo de contato entre a microesfera de alginato e o epitélio de absorção (Bowersock *et al.*, 1994), baixo toxicidade e baixa imunogenicidade (Gombotz *et al.*, 1998).

Na área médica, os alginatos têm sido usados na imobilização das ilhotas de Langerhans para tratamento da diabete mellitus em ratos (Soon-Shiong *et al.*, 1994) e no tratamento de úlceras pépticas e esofagites (Daigo *et al.*, 1981). Kimura e colaboradores, em 1996, demonstraram em animais experimentais que o alginato de sódio diminui os níveis de colesterol e glicose plasmática, em decorrência de alterações destes no sistema de absorção no estômago e intestino delgado. Foi também demonstrado que blocos poliméricos M (ácido Manurônico) e MG (ácidos Manurônicos e Gulurônicos) possuem a capacidade de estimular a IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  óbitos ativados (Otterlei *et al.*, 1991), bem como aumentarem a taxa de sobrevivência de animais transplantados com Sarcoma 180 (Lizima-Mizui *et al.*, 1985), efeito este que pode ser relacionado com as suas propriedades imunomodulatórias.

Dois alginatos com diferentes viscosidades extraídos da alga marinha *Sargassum vulgare* C. Agardh, nomeados de alginato -V (menos viscoso) e alginato +V (mais viscoso) potencializaram a síntese de anticorpos totais, tanto pela via subcutânea como pela via oral em camundongos imunizados com a proteína ovalbumina. Neste trabalho foi sugerido que os alginatos -V e +V podem vir a ser utilizados como adjuvantes para expressarem antígenos em vacinação animal e/ou humana. Além disso, os alginatos -V e +V exerceram efeitos pro-inflamatório, recrutando neutrófilos e macrófagos através dos métodos experimentais bolsa de ar subcutânea e efeito inflamatório em cavidade peritoneal. Ambos os alginatos provocaram aumento do teor de proteínas, mas somente o alginato +V foi capaz de aumentar a permeabilidade vascular (Torres, 2003).



**Figura 4** Representação química dos monômeros de alginato de acordo com Moe e colaboradores, 1995. (a)- conformação Haworth de M:  $\alpha$ -D-manuronato e G:  $\alpha$ -L-guluronato; (b)- cadeias de alginato na conformação de cadeira; (c)- representação simbólica de uma cadeia de alginato M e G



**Figura 5-** Biossíntese de alginato (Moe et al., 1995).

muitos estudos, a fim de elucidar suas propriedades físico-químicas, bem como compreender sua relação estrutura-atividade nos sistemas biológicos. Alguns estudos com alginatos isolados da alga marinha *Sargassum vulgare* têm demonstrado seus efeitos inflamatórios, adjuvante no processo de vacinação, no entanto, suas propriedades antitumorais ainda não foram elucidadas. Acredita-se que o ácido manurônico possua importante atividade imunomoduladora, mas sua  
feito biológico ligado ao ácido gulurônico são assuntos que ainda permanecem desconhecidos. Desta forma, estudar as propriedades antitumorais desses polissacarídeos, bem como sua toxicidade poderá levar a uma maior compreensão dos seus efeitos farmacológicos.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo geral

Estudar a atividade antitumoral de dois alginatos com diferentes viscosidades extraídos da alga marinha marron *Sargassum vulgare* C. Agardh.

### 2.1 Objetivos específicos

Avaliar a citotoxicidade dos alginatos nos modelos experimentais *in vitro*: atividade mitótica em ovos do ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*, atividade hemolítica em eritrócitos de camundongos, a citotoxicidade em larvas de artemia salina e a viabilidade celular pelo MTT em 5 linhagens tumorais.

Avaliar a inibição do crescimento tumoral de camundongos (*Mus musculus*) tratados com os alginatos -V e +V, e em associação ao quimioterápico 5-FU no modelo experimental do Sarcoma 180.

Determinar a toxicidade hepática, renal e esplênica dos alginatos -V e +V em relação ao peso, bem como através do estudo histopatológico.

Determinar a nefrotoxicidade dos alginatos -V e +V no modelo de perfusão renal.

Determinar os parâmetros hematológicos e bioquímicos provocados pelos alginatos -V e +V e também em associação ao 5-FU em animais transplantados com o Sarcoma 180.



## 3. Material

### 3.1 Algas marinhas

As algas marinhas foram coletadas na Praia de Pacheco, localizada no Município de Caucaia-CE durante o mês de Agosto de 2003, no mesolitoral, em marés de sizígia (nível 0,0).

### 3.2 Material Biológico

#### 3.2.1 Animais

Foram utilizados camundongos da espécie *Mus musculus* fêmeas (25 a 30 g, 11 cm) e ratos albinos Wistar machos, adultos jovens pesando entre 250 a 350 g, provindo do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará e mantidos em colônia fechada no Departamento de Fisiologia e Farmacologia da mesma instituição. Os animais foram mantidos em condições adequadas de luz e temperatura, e alimentados com ração padrão e água *ad. Libitum*.

#### 3.2.2 Animais marinhos

Foram utilizados ouriços-do-mar da espécie *Lytechinus variegatus*, o qual pertence ao Filo Echinodermata, classe Echinoide, subclasse Euechinoidea (Rupert & Barnes, 1996). Estes foram coletados na praia da Lagoinha- CE e mantidos em aquário no Laboratório de Ecotoxicologia do Laboratório de Ciências do Mar (LABOMAR).

Foram utilizadas larvas de *Artemia* salina mantidas também no Laboratório de Ecotoxicologia. O gênero *Artemia* é classificado como pertencente ao Filo Artropoda, subfilo Crustacea, classe Branchiopoda (Rupert & Barnes, 1996).

### 3.2.3 Células tumorais

As linhagem tumorais HL-60, MCF-7, HCT-8, CEM e B-16 (tabela 2) foram doadas pelo Instituto Nacional do Câncer (NCI) dos Estados Unidos (Bethesda, MD, EUA) e mantidas no Laboratório de Oncologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

**Tabela 2** - Linhagens celulares utilizadas no ensaio de citotoxicidade *in vitro*

<b>Linhagem</b>	<b>Tipo de neoplasia</b>	<b>Origem</b>
CEM	Leucemia linfocítica	Humano
HL-60	Leucemia promielocítica	Humano
HCT-8	Cólon	Humano
B16	Pele	Murino
MCF-7	Mama	Humano

## 3.3 Equipamentos

Agitador de placa - MLW Modelo Thys 2

Aquário marinho

Centrífuga Centimicro FANEN Modelo 212

Centrífuga Excelsa Baby I FANEN Modelo 206

Centrífuga de placas Eppendorf Modelo Centrifuge 5403

Espectrofotômetro de placas Packard Spectra Count

Fluxo laminar VECO

Incubadora de células (CO<sub>2</sub> Water-Jacket Incubator) NUAIRE TS Autoflow

Microscópio óptico Metrimpex Hungary/PZO-Labimex Modelo Studar lab

Microscópio óptico de inversão Nikon Diaphot

Balança analítica - Gehaka

Câmara de Neubauer-CLAY ADAMS

Estufa incubadora de CO<sub>2</sub> –NUAIRE

Microscópio Óptico Olympus CH-2- Olympus

Bomba de perfusão – Watson

Banho Maria – Fanem

Bomba aquecedora com termostato – MGW Lauda

### 3.4 Soluções e Reagentes

Nome	Concentração	Marca
Água do mar filtrada		
Ácido Acético	32 N	REAGEN
Ácido Clorídrico	0,1 N	VETEC
Azul de tripan 10%	10 mg de Azul de tripan PBS q.s.p. 100 mL de solução	Sigma
Formalina neutra	100mL de Formaldeído 37% 4g de Fosfato de sódio monobásico 6,5g de Fosfato de sódio dibásico H <sub>2</sub> O q.s.p. 900mL	Vetec Labsynth Labsynth -
KCl 0,5M	37,3g de Cloreto de potássio H <sub>2</sub> O q.s.p. 1L de solução	Labsynth -
Meio de cultura de células RPMI 1640	Diluído em água deionizada e esterilizada, filtrado em filtro Millipore – 0,22mm – e complementado com 10% SBF, 1% de glutamina, 1% de antibióticos, 1% de bicarbonato de sódio (0,75%) e 25nM de HEPES	Cultilab
MTT	20mg de MTT PBS q.s.p. 100mL de solução	Sigma -
Penicilina-estreptomicina	Penicilina 10.000 U.I./mL	Cultilab

	Estreptomicina 10mg/mL	Cultilab
Pentobarbital sódico	-	Cristália
Manitol	-	Reagen
5-Fluorouracil	250 mg/ 10mL	ICN Farmacêutica
Solução salina para hemólise	NaCl 0,85% CaCl <sub>2</sub> 10mM	
Soro fetal bovino	-	Cultilab
Heparina	-	Roche
Solução salina	NaCl 0,015 M	
Dimetilsulfóxido (DMSO)		VETEC
Formalina neutra 10%	100 mL de Formaldeído 37% 4 g de Fosfato de sódio monobásico 6,5 g Fosfato de sódio dibásico H <sub>2</sub> O q.s.p. 900 mL	VETEC Labsynth Labsynth -
Eosina 0,5%	0,5 g de Eosina 80 mL de EtOH 0,5 mL de Ácido acético 20 mL de H <sub>2</sub> O	Doles VETEC VETEC -
Hematoxilina 0,1%	0,5 g de Hematoxilina 10 mL de Glicerina 25 g de Sulfato de alumínio 0,1 g de Iodeto de potássio	Doles Labsynth Labsynth Labsynth
Ki-67	marcador imunohistoquímico nuclear. Diluição utilizada:1:60.	Immunotec
Anticorpo biotinizado anti-imunoglobulina de camundongo	1 µL de anticorpo anti-imunoglobulina BSA 5% q.s.p. 100 µL de solução	Sigma Dako
Tampão fosfato (PBS)	8,766 g de Cloreto de sódio	Labsynth

	2,14 g de NaHPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0,276 g de NaHPO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O H <sub>2</sub> O q.s.p. 1 L de solução (pH = 7,2)	Labsynth Labsynth -
Tampão Tris (TBS) 10X	Cloreto de sódio 1,5 M Tris 0,5 M (pH= 7,6)	Labsynth Proquímios
Tripsina 0,25%	50 mL de Tripsina 2,5% 0,125 g de EDTA 500 mL de PBS	Cultilab Proquímios -
Solução Ringer com lactato	500 mL	
Solução perfusora de Krebs-Henseleit modificada	138g de NaCl 7,0g de KCl 3,2g de NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O 5,8g de MgSO <sub>4</sub> 10,0g de Uréia 4,2g de NaHCO <sub>3</sub> 0,74g de CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O 2,0g de Glicose 50mg de Penicilina 6g de Albumina bovina 0,15g de Inulina H <sub>2</sub> O bidestilada q.s.p. 2L de solução	Synth Merck Synth Reagen Reagen Synth Reagen Squibb Squibb Sigma Sigma



equivalente a 6000 rpm. Os precipitados foram descartados e os sobrenadantes foram utilizados como extratos brutos. Os extratos de alginatos brutos foram submetidos à purificação, sendo estes dissolvidos em água destilada, precipitados com etanol (200 mL para 100 mL de extrato), lavados com acetona e secos com ar quente. Em seguida as amostras de alginatos purificados foram pesadas para determinação do rendimento total.

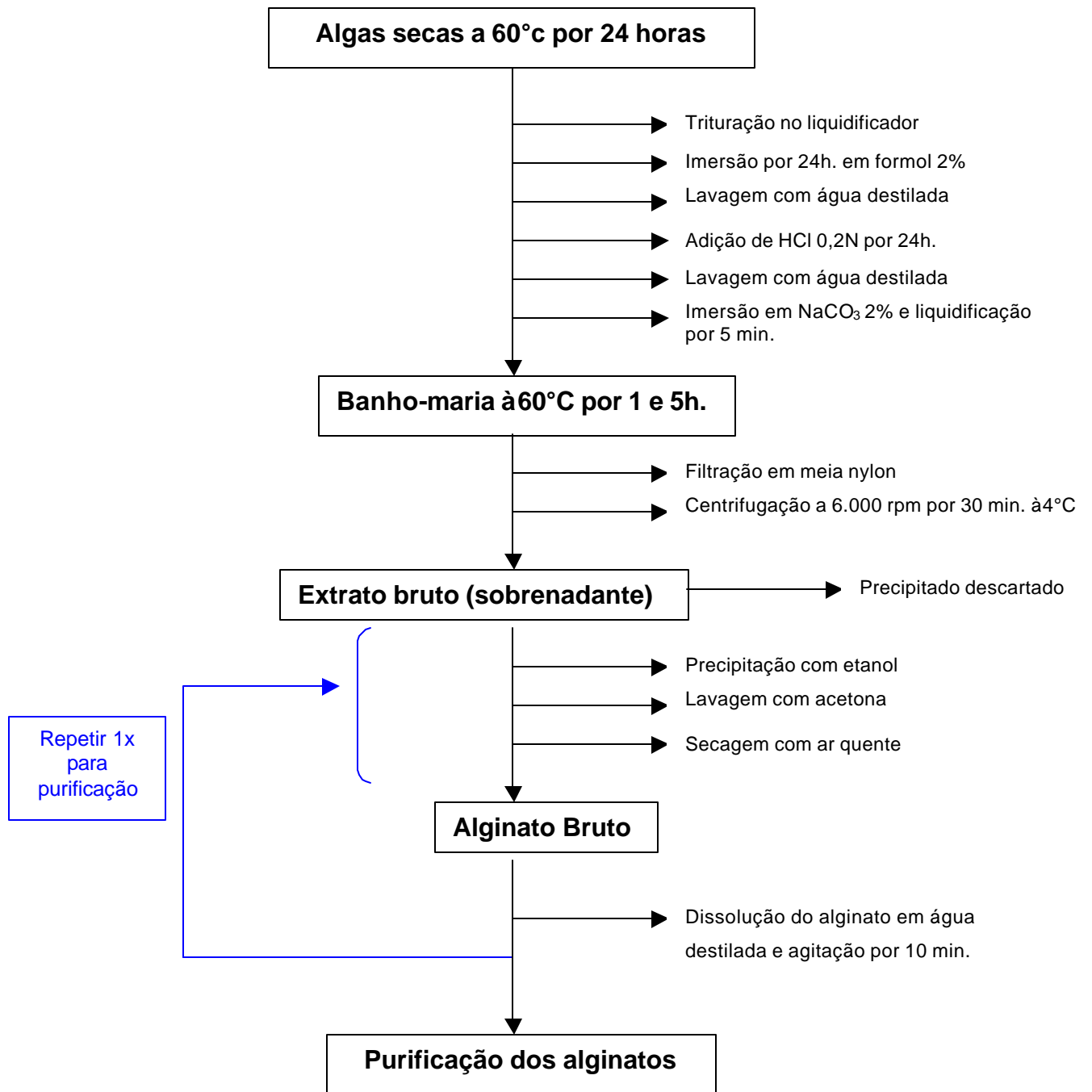
#### 4.3.1 Caracterização físico-química

Após purificação, os alginatos foram caracterizados no Departamento de Química Inorgânica da Universidade Federal do Ceará. A tabela abaixo exibe as características físico-químicas apresentadas de acordo com o trabalho de Torres (2003).

**Tabela 3** – Características físico-químicas dos alginatos -V e +V extraídos de *Sargassum vulgare*.

		Alginato extraído à 1h (-V)	Alginato extraído à 5h (+V)
Viscosidade intrínseca		5,4 g/dL	9,1 g/dL
<sup>1</sup> H RMN		F <sub>mm</sub> = 0,6 ; F <sub>ggg</sub> = 0,4	F <sub>mm</sub> = 0,67 ; F <sub>ggg</sub> = 0,2
Peso molecular		19,3 x 10 <sup>4</sup> g/mol	24,8 x 10 <sup>4</sup> g/mol
Cinzas		2%	1%
Umidade		14%	16%
Teor de proteínas		1,0%	1,3%
Microanálise de íons (%)	Hidrogênio	5,15	4,49
	Carbono	27,667	28,090
	Nitrogênio	0,17799	0,16377
	Enxofre	0	0

<sup>1</sup>H RMN: ressonância magnética nuclear de hidrogênio; F<sub>mm</sub> e F<sub>ggg</sub>: fração de ácido manurônico e ácido gulurônico, respectivamente;



**Figura 6-** Roteiro de extração e purificação dos alginatos.



## 4.4 Estudo da citotoxicidade dos alginatos -V e +V *in vitro*

### 4.4.1 Avaliação da atividade antiproliferativa em células tumorais *in vitro*.

Os alginatos -V e +V foram testados em diferentes linhagens celulares (tabela 2) para avaliação da citotoxicidade e verificação da seletividade em diferentes células tumorais (Mosmann, 1983). O método consiste numa análise baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) de cor amarela para o composto azul formazam, pela atividade da enzima mitocondrial succinil-desidrogenase das células viáveis.

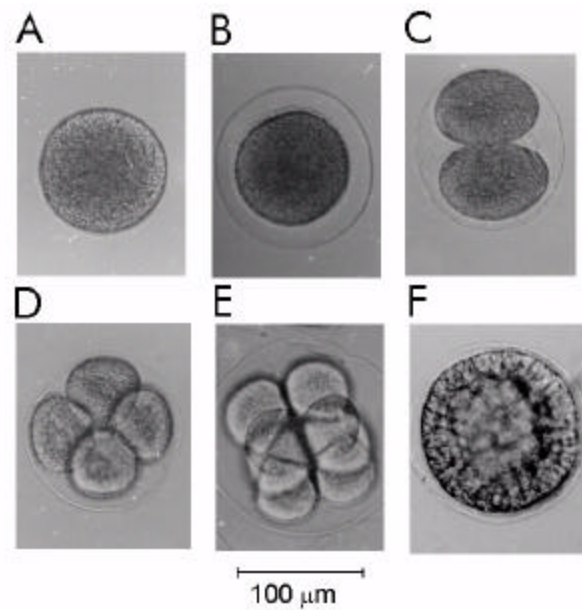
As linhagens celulares foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (25cm<sup>2</sup>, volume de 50mL para células aderidas e 75cm<sup>3</sup>, volume de 250mL para células em suspensão); utilizando o meio de cultura RPMI 1640 complementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina). As células foram incubadas a 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. As células em suspensão ou monocamadas foram distribuídas em placas de 96<sup>6</sup> células/mL, para células suspensas, 0,7x10<sup>5</sup> células/mL para HCT8 e 0,6x10<sup>5</sup> células/mL para B-16. Os alginatos -V e +V foram incubados por 72 horas com a suspensão de células na concentração de 25 a 200 µg/mL. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo. Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas (1500rpm/15min) e o sobrenadante foi descartado. Cada poço recebeu 200µL da solução de MTT (0,5 mg/mL em meio RPMI 1640), e as placas reincubadas por 3 horas em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período, as placas foram novamente centrifugadas (3000rpm/10min), com descarte do sobrenadante e ressuspensão do precipitado em 150µL de DMSO. A quantificação de células viáveis foi realizada pela leitura da absorbância no comprimento de onda 550nm em um espectrofotômetro de placa. Esta técnica permite analisar a viabilidade e o estado metabólico das células, sendo assim, uma ferramenta útil na avaliação da citotoxicidade.

de fecundação como as várias fases do desenvolvimento embrionário podem ser facilmente visualizadas à microscopia óptica. Os exemplares foram coletados na praia da Lagoinha, litoral cearense e mantidos em aquário marinho no laboratório de Ecotoxicologia do Labomar (Instituto de Ciências do Mar). O ensaio foi realizado de acordo com a metodologia descrita em 2002 por Costa-Lotufo *et al.*

A eliminação dos gametas foi induzida pela injeção de até 3mL de KCl 0,5M na cavidade celômica (perivisceral) dos animais.

pela coloração alaranjada e os espermatozoides, pela coloração esbranquiçada. Após a eliminação dos gametas, os óvulos foram lavados três vezes em uma proveta com água do mar filtrada para a remoção da camada gelatinosa que envolve o óvulo. Os espermatozoides coletados foram mantidos a baixa temperatura, 4°C, até o momento do uso. Por sua vez, os óvulos foram ressuspensos em 50mL de água do mar filtrada. A fecundação foi realizada pela adição de 1mL da suspensão de espermatozó em 2,45mL de água do mar filtrada) à suspensão de óvulos (50mL). Após cerca de dois minutos, a fecundação foi confirmada pela visualização da membrana de fecundação (figura 7b) no microscópio óptico. O plaqueamento foi realizado pela adição de 1mL da solução de ovos em placas com 24 poços, contendo os alginatos -V e +V em concentrações de 100 a 1000 µg/mL . Em seguida, os ovos foram incubados num volume final de 2mL e mantidos à temperatura ambiente (26 ± 2°C) sob agitação constante. Alíquotas de 0,2mL foram fixadas em 0,2mL de formalina 10%, em intervalos correspondentes às fases de primeira (Figura 7c) e terceira (figura 7e) divisões e blástula (figura 7f), bem como a fase de larva com 24

horas (figura 8) Cem embriões de cada amostra foram contados, ao microscópio óptico, para obtenção da porcentagem de inibição.



**Figura 7** – Fotomicrografias da embriogênese do ovo de ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*. A: óvulo não fecundado; B: ovo fecundado com a membrana de fe  
C: estágio de 2 células; D: estágio de 4 células; E: estágio de 8 células e F: estágio de



**Figura 8**– Fotomicrografias da larva *Pluteus* do ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*.

#### 4.4.3 Avaliação da atividade hemolítica em eritrócitos de camundongos *Mus musculus Swiss*.

A avaliação da atividade hemolítica pode informar um possível mecanismo de ação relacionado com a lise da membrana plasmática. O teste utiliza eritrócitos de camundongos, os quais apresentam grande semelhança com os eritrócitos humanos, principalmente em sensibilidade (Costa-Lotufo *et al.*, 2002).

O sangue de camundongos *Mus musculus Swiss* foi coletado pela via orbital e diluído em 30 volumes de solução salina (NaCl 0,85% + CaCl<sub>2</sub> 10mM). Os eritrócitos foram lavados duas vezes em solução salina por centrifugação (5000rpm/3min) para redução da contaminação plasmática e foram ressuspensos em solução salina para obtenção de uma suspensão de eritrócitos (SE) a 2%. O ensaio foi realizado em placas com 96 poços. Cada poço da 1<sup>a</sup> fileira recebeu 100µL da solução salina. Na 2<sup>a</sup>, os poços receberam 50µL da solução salina e 50µL do veículo de diluição da substância teste, neste caso, água destilada. Aos poços da 3<sup>a</sup> fileira, foram adicionados 100µL de solução salina e 100µL da substância teste em solução. Da 4<sup>a</sup> fileira em diante, os poços receberam 100µL da solução salina, exceto a última fileira, que recebeu 80µL de solução salina e 20µL de Triton X-100 1% (controle positivo). As diluições foram feitas do 3<sup>a</sup> ao 11<sup>a</sup> -se 100µL da solução do poço anterior e transferindo para o seguinte, de modo que as concentrações foram sempre diluídas à metade e que variaram de 0,78 a 200 µg/mL. Em seguida, 100µL da suspensão de eritrócitos foram acrescentados a todos os poços. Após incubação por 1h sob agitação constante à temperatura ambiente (26 ± 2°C) e centrifugação a 5000rpm por 3min, o sobrenadante foi transferido para uma outra placa e a hemoglobina liberada foi medida pela leitura da absorbância a 540nm.

simples que permite a avaliação da toxicidade aguda de extratos brutos, frações ou substâncias puras provenientes de produtos naturais.

Os cistos de *Artemia salina* foram mantidos por 24h em um béquer com água do mar filtrada, sob aeração suave e iluminação intensa, até a eclosão dos . Estas larvas foram separadas em um segundo béquer e mantidas ali por mais 24h para atingirem o estágio de náupilo II. O plaqueamento foi realizado pela adição de 10 náupilos em placas com 24 poços, contendo os alginatos V e +V em concentrações que variaram de 0,01 a 1 mg/mL, em triplicata. Como controle negativo, foi utilizada água do mar filtrada duas vezes. As placas foram incubadas à temperatura ambiente, por 24h. Depois foram contados os vivos e mortos correspondentes a cada poço.

#### 4.4.5 Análise estatística

Os dados foram analisados a partir da média e do erro-padrão da média de n experimentos.

## 4.5 Estudo *in vivo* da atividade antitumoral dos alginatos –V e +V no modelo experimental do Sarcoma 180

### 4.5.1 Cultura do tumor Sarcoma 180

As células do Sarcoma 180, provenientes do Laboratório de Oncologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, foram mantidas em cultura na cavidade peritoneal de camundongos *Mus musculus* Swiss sob a forma ascítica. A manutenção das células tumorais é realizada por transferência destas de camundongos infectados para camundongos sadios. No -se o animal por deslocamento cervical e em seguida é feito assepsia da região abdominal com álcool iodato para a coleta do líquido ascítico da cavidade peritoneal. Retirou-se cerca de 1,5 mL do líquido ascítico, em seguida foi adicionado 15 mL da solução de Ringer com lactato e 300  $\mu$  L de gentamicina. Desta solução preparada, retirou-se uma alíquota e adicionou-se o corante azul de tripan (na proporção de 1:1) para determinar o número de células tumorais viáveis utilizando câmara de Neubauer e microscópio óptico.

### 4.5.2 Avaliação dos alginatos –V e +V na inibição do crescimento tumoral.

Para implantação do tumor sólido, 0,5 mL da solução preparada contendo células do tumor Sarcoma 180 foi injetado via subcutânea na axila esquerda de cada camundongo. Os animais foram inoculados com  $5 \times 10^5$  células, em seguida foram divididos aleatoriamente em grupos (n=10) e tratados após 24 horas com d –V e +V), salina e 5-FU por 7 dias consecutivos. Avaliou-se a inibição do crescimento tumoral dos alginatos por ambas as vias de administração oral e intraperitoneal nas concentrações de 50 e 100 mg/m<sup>2</sup>, enquanto a salina e o 5-FU utilizados como controle negativo e positivo respectivamente, foram administrados por via intraperitoneal, sendo 25 mg/m<sup>2</sup> a concentração usada para o 5-FU. A salina fisiológica estéril foi utilizada tanto como controle negativo quanto como veículo para os alginatos –V e +V. Os

animais foram sacrificados por deslocamento cervical no décimo dia após a  
-se para pesagem o tumor e os órgãos: baço,

O tratamento das substâncias testadas foi realizado de acordo com o cálculo da superfície corporal:

$$\text{Superfície (m}^2\text{)} = 0,008416 \text{ P(Kg) x h(cm)}$$

onde:

P = peso do animal

h = comprimento do animal da cabeça ao início da cauda

O percentual de inibição do crescimento tumoral foi feito de acordo com a

$$\% \text{ de inibição} = [A - B / A] \times 100$$

onde;

A: é a média dos pesos dos tumores do grupo controle;

B: é a média dos pesos dos tumores do grupo tratado.

4.5.3 Avaliação dos alginatos -V e +V associados ao 5-fluorouracil na inibição do crescimento tumoral.

Para avaliar o potencial antitumoral dos alginatos - V e +V associado ao quimioterápico 5-FU, utilizou-se as concentrações de 25 e 15 mg/m<sup>2</sup>, respectivamente. Os animais foram divididos em 6 grupos (n= 10) os quais receberam 200 µL por via oral somente dos alginatos -V e +V, ambos dissolvidos em salina estéril 0,015 M e também associados a 200µL do 5-FU administrado por via intraperitoneal. A salina e o 5-FU foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente. O procedimento experimental foi realizado de acordo com o descrito anteriormente e antes do sacrifício no décimo dia, os animais foram levemente anestesiados com éter sulfúrico e amostras de sangue foram coletadas

-se o béquer e este ficou durante 20 minutos em temperatura ambiente. O tampão citrato foi descartado e as lâminas foram lavadas com TBS cuidadosamente para não remover os cortes histológicos.



Em seguida, acrescentou-se peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 3% em metanol por 10 minutos com a finalidade de bloquear a peroxidase endógena, enzima esta que pode interferir no experimento. As lâminas foram novamente lavadas com TBS, enxugadas e retirado o excesso de parafina oriunda do processo de fixação. O material presente nas lâminas foi circundado com caneta hidrofóbica e a esta região adicionou-se TBS. Posteriormente, o TBS foi aspirado e as lâminas foram incubadas em câmara úmida com soro normal de coelho – BSA (1:5) por 20 minutos (70µL de soro/lâmina). O BSA foi aspirado e o material foi incubado novamente em câmara úmida com anticorpo primário (1:5), sendo mantido em *overnight* (16-24 horas) em refrigerador ( $\pm 8^{\circ}\text{C}$ ).

No dia seguinte, o material foi retirado da geladeira e permaneceu por 15 minutos em temperatura ambiente. O excesso de anticorpo primário foi removido por lavagem com TBS por 5 minutos e após ser retirado, as lâminas com o material foi em seguida incubado com o anticorpo secundário (coelho anti-mouse biotilado) por 30 minutos. Após este período, as lâminas foram lavadas com TRIS, adicionado Estreptavidina e 30 minutos depois o material foi lavado com TBS (5 minutos) em borel vertical com ranhura.

Foi adicionado o fotoreagente (DAB) por 3 minutos (ou até os fragmentos adquirirem coloração mais escura). Retirou-se então o DAB e corou-se o material em hematoxilina na concentração de 1:1, o qual foi secado a temperatura ambiente. Posteriormente, as lâminas foram lavadas 3 vezes em etanol absoluto 100% e em xilol 100% para desidratação e montadas com Bálsamo do Canadá

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

Os parâmetros hematológicos e bioquímicos foram avaliados nos grupos de animais (n=8) transplantados com o tumor Sarcoma 180, tratados com os alginatos –V e +V na concentração de 25 mg/m<sup>2</sup> por via oral, e com os alginatos

associados ao 5-FU na concentração de 15 mg/m<sup>2</sup> e salina. Utilizou-se como controle animais saudáveis e sem tumor.

As alíquotas de sangue destinadas à determinação dos parâmetros bioquímicos foram coletadas em tubos com gel separador e centrifugadas (3000 rpm/10 minutos) para separação do soro para avaliação da função renal e hepática. Para realização da contagem de leucócitos totais adicionados a 380 µL de corante de Turck e realizada imediatamente a contagem em câmara de Neubauer e microscópio óptico. Para determinação dos leucócitos diferenciais, foram feitas lâminas com esfregaço do sangue de cada amostra e submetidos à contagem em microscópio óptico.

Foi avaliada a função renal dos animais normais e implantados com o tumor Sarcoma 180, os quais foram tratados com os alginatos -V e +V (25 mg/m<sup>2</sup>), 5-FU (15 mg/m<sup>2</sup>), os alginatos -V e +V associados ao 5-FU nas mesmas concentrações utilizadas e salina fisiológica. A função renal foi avaliada pelos parâmetros séricos de dois marcadores clássicos da integridade renal: uréia e creatinina. Para tanto se utilizou kits da LABTEST® sistemas para diagnóstico, seguindo-se a metodologia descrita por este fabricante.

Para investigação de dano no hepatócito foi determinada, no soro dos animais, a atividade da aspartato amino transaminase (AST), enzima de elevada atividade no hepatócito, portanto importante como marcador de dano neste órgão. Com esta finalidade, foram utilizados kits com sistemas para determinação de atividade enzimática *in vitro*, seguindo a metodologia descrita pelo fabricante LABTEST® sistemas para diagnóstico.

#### 4.5.7 Análise estatística

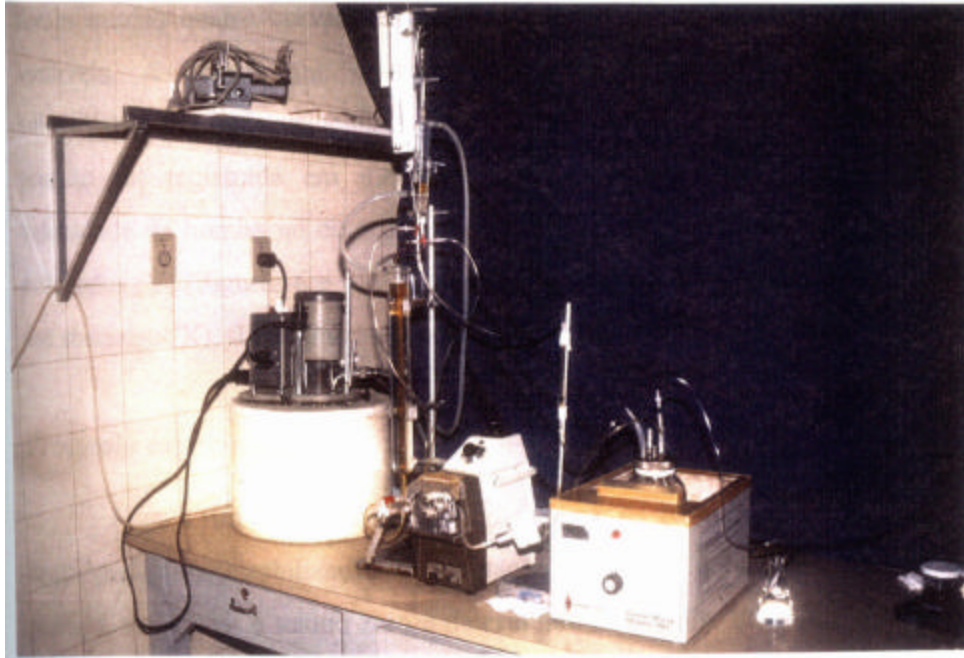
Os efeitos dos alginatos -V e +V no crescimento tumoral *in vivo* e nos parâmetros hematológicos e bioquímicos foram avaliados utilizando o programa Prism versão 4.0 (GraphPad Software). Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise

experimento.

A solução de Krebs-Henseleit modificada, concentrada 20 vezes, continha NaCl (138g), KCl (7,0g),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (3,2g),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (5,8g), e Uréia (10g). No tempo de 48 horas antes do experimento, foram separados 100 mL desta solução e acrescentados  $\text{NaHCO}_3$  (4,2g),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,74g), glicose (2,0g), e penicilina G Potássica Cristalina (0,050g). Em seguida, o volume foi completado para 2000mL com água bidestilada. Foram retirados 300 mL desta última solução, na qual foi adicionada albumina bovina (6g%). Em seguida foi realizado a diálise desta solução com albumina, auxiliada por um homogeneizador. Esta diálise tem como objetivo retirar substâncias contaminantes como piruvato, citrato e lactato (Hanson & Ballard, 1968; Cohen *et al.*, 1977; Schurek *et al.*, 1970; Ross, 1978). Em 1700mL restantes foram usados como solução para a diálise, a qual foi trocada com 24 horas. No final, após 48 horas de diálise, foi acrescentado 0,15g de inulina. O pH da solução perfusora foi mantido entre os valores de 7,3 e 7,4.

#### 4.6.2 Perfusão renal

O sistema de perfusão renal usado foi desenvolvido por Bowman e Maack (1974) e Ross (1978) e modificado por Fonteles & Jeske (1980) através da adaptação do pulmão artificial do tipo silástico, baseado no modelo de Hamilton *et al.*, (1974) (figura 9).



**Figura 9-** Sistema de perfusão de rim isolado

O sistema de perfusão de rim isolado consiste dos seguintes componentes (figura 10):

**Condensador** - reservatório de aquecimento da solução perfusora.

**Coletor de urina** - frasco que recebe a urina do rim.

**Seringa coletora de perfusato** - coletor da solução de perfusão no sistema.

**Bomba de perfusão** (Watson) – bomba peristáltica para a manutenção do fluxo de perfusão renal.

**Filtro de milipore** (8µm) – promove a filtração constante da solução perfusora.

**Banho Maria** (Fanem - modelo 100) – aquece e mantém o pulmão artificial a 37 °C.

**Fluxômetro** – mede o fluxo de perfusão durante o experimento.

**Manômetro de mercúrio** – mede a pressão de perfusão.

**Catabolhas** – câmara que retira as bolhas formadoras no sistema, evitando embolia gasosa do órgão.

Oxigenador ou pulmão artificial - promove as trocas gasosas (95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>).

Bomba aquecedora com termostato – mantém o sistema de perfusão a 37 C.

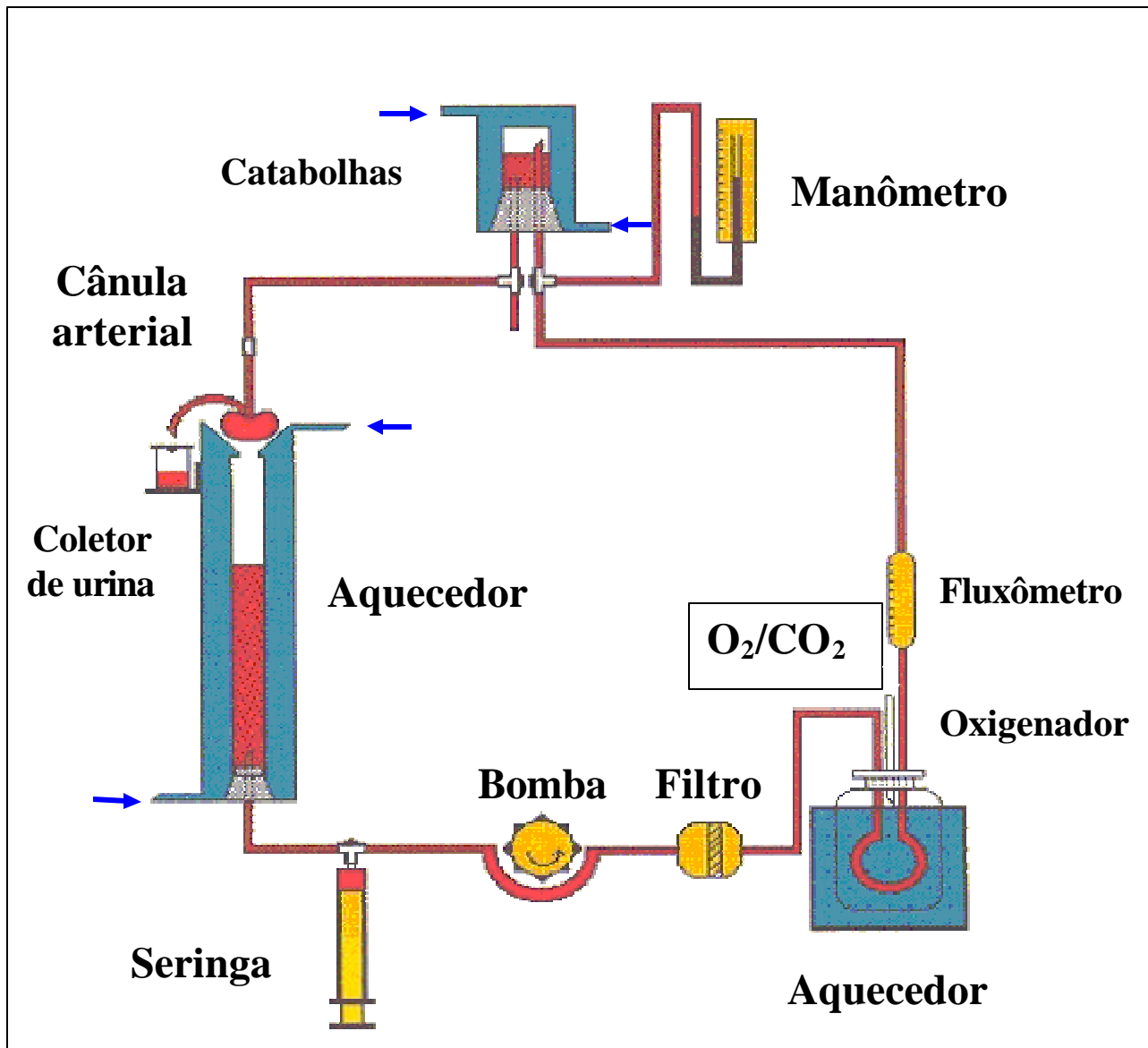


Figura 10 – Representação esquemática do sistema de perfusão de rim isolado

#### 4.6.3 Calibração do sistema de perfusão renal

Antes de cada experimento o sistema foi lavado com detergente e água destilada aquecida, montado e então calibrado.

A calibração foi sempre feita com o sistema em funcionamento na presença de solução salina a 0,9%, aquecida entre as temperaturas de 36 - 37°C. A cada unidade da bomba de perfusão (1, 2, 3, 4 e 5), foi coletado a salina por 1 minuto em proveta milimetrada (fluxo na ponta da cânula), e anotado a medida do fluxômetro e a pressão de perfusão, através do manômetro de mercúrio ligado ao sistema. Para melhor adaptação do sistema às unidades da bomba, foram estabelecidos 3 minutos de intervalo entre cada coleta.

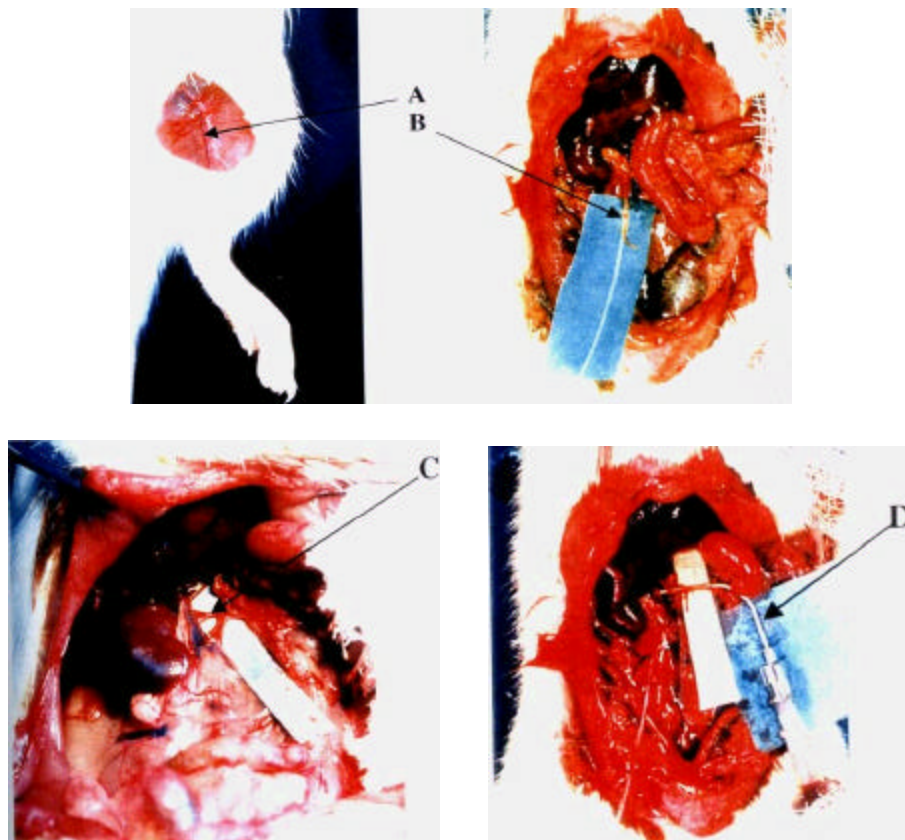
A calibração foi feita com o objetivo de conhecer o fluxo de perfusão em face da resistência da própria cânula. Para tanto, os resultados de calibração obtidos nos grupos tratados foram compilados em curvas, onde foram plotadas a velocidade da bomba nos eixos das abscissas (X) contra a pressão de perfusão, o valor obtido no fluxômetro e volume de salina coletado (fluxo) no eixo das ordenadas (Y) (Figura 11).

**Figura 11** – Calibração do sistema. A- Velocidade da bomba X Pressão de perfusão.  
B - Velocidade da bomba X Fluxômetro.

#### 4.6.4 Técnica cirúrgica

Os ratos foram mantidos em jejum nas 24 horas que antecediam os experimentos, com água *ad libitum*. Estes foram anestesiados por via intraperitoneal com pentobarbital sódico na dose de 50 mg/Kg de peso corporal. Em seguida, a veia femoral esquerda foi isolada e 3 mL de manitol a 20% foram

C. Após esse procedimento, o ureter direito foi isolado e dissecado, sendo em seguida canulado com tubo de polietileno (PE 50), a uma distância aproximadamente de 3 cm do pedúnculo renal. O rim foi descapsulado e dissecado, a suprarenal foi isolada e seccionada. A artéria renal direita e a artéria mesentérica superior foram identificadas e isoladas. O rim foi isolado com pinças hemostáticas e a artéria renal canulada através da artéria mesentérica superior (Weiss, 1959; Nishiitsutsuj-uwo *et al.*, 1967). Logo após, o rim foi retirado juntamente com o ureter e fixado à cânula perfusora do sistema, sem interrupção do fluxo vascular (figura 12)



**Figura 12** – Técnica cirúrgica. A= veia femoral; B= ureter canulado; C= art mesentérica; D= cânula arterial.

#### 4.6.5 Protocolo experimental

Os experimentos foram iniciados após a estabilização e adaptação do órgão às novas condições. Os 30 minutos iniciais foram utilizados como controle interno. A cada 5 minutos foram registrados a pressão de perfusão e o fluxo de perfusão em manômetro e fluxômetro, respectivamente, em um período total de 120 minutos. As amostras de urina e perfusato foram coletadas a cada 10 minutos, e em seguida foram armazenadas a temperatura de -20 °C para dosagem de sódio, potássio, cloro, inulina e osmolaridade, importantes na

Os rins foram perfundidos com a solução de Krebs-Henseleit contendo 6g% de albumina, sendo adicionado os alginatos -V e +V (10 µg/mL) aos 30 minutos de perfusão (n=6).

#### 4.6.6 Análise bioquímica

Em amostras de urina e perfusato foram feitas dosagens de sódio, potássio pelo método de fotometria de chama (Flame photometer- modelo 443 IL). As dosagens de cloro foram realizadas seguindo o método descrito pelo kit do fabricante Labtest. A inulina do perfusato e urina foram determinadas por hidrólise direta, conforme Walson *et al.* (1955) e Fonteles *et al.* (1983), com modificações que reduziram as quantidades de amostras e reagentes utilizados. A osmolaridade das amostras de urina e perfusato foram medidas utilizando um osmômetro (Vapor pressure osmometer- modelo 5100c WESCOR). Todos os testes bioquímicos foram realizados na Unidade de Pesquisas Clínicas da Universidade Federal do Ceará.

#### 4.6.7 Cálculo dos parâmetros renais

As fórmulas abaixo foram utilizadas para determinação dos parâmetros de  
-Maldonado *et al.*, 1978; Fonteles & Jeske, 1980).

#### **FU (mL.g<sup>-1</sup>. min<sup>-1</sup>) = Fluxo Urinário**

FU = Peso do volume urinário / Peso do rim esquerdo. 10

\*Admitiu-se que a urina possui a mesma densidade da água.



**PP = Pressão de perfusão (mmHg) = Análise direta em manômetro**

**RVR (mmHg / mL.g<sup>-1</sup>. min<sup>-1</sup>) = Resistência vascular renal**

**RFG ((mL.g<sup>-1</sup>. min<sup>-1</sup>) = Ritmo de filtração glomerular**

$$\text{RFG} = \text{DOUin} / \text{DOPin} \cdot \text{FU}$$

DOUin = Densidade ótica da inulina na urina

DOPin = Densidade ótica da inulina no perfusato

**FNa<sup>+</sup> (μEq. g<sup>-1</sup>. min<sup>-1</sup>) = Sódio filtrado**

$$\text{FNa}^+ = \text{RFG} \cdot \text{PNa}^+$$

PNa<sup>+</sup> = Concentração de sódio no perfusato

**ENa<sup>+</sup> (μEq. g<sup>-1</sup>. min<sup>-1</sup>) = Sódio excretado**

$$\text{ENa}^+ = \text{FU} \cdot \text{UNa}^+$$

UNa<sup>+</sup> = Concentração de sódio na urina

**TNa<sup>+</sup> (μEq. g<sup>-1</sup>. min<sup>-1</sup>) = Sódio transportado**

$$\text{TNa}^+ = \text{FNa}^+ - \text{ENa}^+$$

**%TNa<sup>+</sup> = Percentual de sódio transportado**

$$\% \text{TNa}^+ = \text{TNa}^+ \cdot 100 / \text{FNa}^+$$

**Cosm (mL.g<sup>-1</sup>. min<sup>-1</sup>) = Clearance osmótico**

$$\text{Cosm} = (\text{Uosm} / \text{Posm}) \cdot \text{FU}$$

Uosm = Osmolaridade urinária

Posm = Osmolaridade do perfusato

**C<sub>H2O</sub> (mL.g<sup>-1</sup>. min<sup>-1</sup>) = Clearance de água livre**

$$\text{C}_{\text{H}_2\text{O}} = \text{FU} - \text{Cosm}$$

**dTNa<sup>+</sup> (mL.g<sup>-1</sup>. min<sup>-1</sup>) = Transporte distal de sódio**

$$dTNa^+ = C_{H_2O} \cdot PNa^+$$

**AdNa<sup>+</sup> (μEq. g<sup>-1</sup>. min<sup>-1</sup>) = Aporte distal de sódio**

$$Ad = dTNa^+ + ENa^+$$

**pTNa<sup>+</sup> (μEq. g<sup>-1</sup>. min<sup>-1</sup>) = Transporte proximal de sódio**

$$pTNa^+ = FNa^+ \cdot AdNa^{+*}$$

\* Aporte distal de sódio

**%pTNa<sup>+</sup> = Percentual de transporte proximal de sódio**

$$\%pTNa^+ = pTNa^+ \cdot 100 / FNa^+$$

Todos os cálculos realizados para determinar os parâmetros de sódio, acima citados, foram repetidos para o cloro e potássio.

#### 4.6.8. Análise estatística

Foi utilizado o programa Sigmastat para análise estatística dos dados. Os resultados foram submetidos à análise de variância ANOVA (teste t de Bonferroni) e teste t Student pareado, com significância de \* p <0,05. A análise permitiu a avaliação da ocorrência de alterações funcionais renais durante o período de o. Os dados desse trabalho foram expressos em média(x) ± E.P.M.

Todas as tabelas e gráficos que avaliaram os parâmetros renais foram estudados de acordo com a variável tempo, e os dados compilados em intervalos de 30 minutos.

## 5. Resultados

### 5.1 Estudo da citotoxicidade dos alginatos –V e +V *in vitro*.

Os alginatos –V e +V não apresentaram atividade citotóxica *in vitro* contra as linhagens tumorais: HL-60, MCF-7, HCT-8, CEM e B-16. Ambos os alginatos também não apresentaram citotoxicidade em larvas de *Artemia salina*, bem como não apresentaram atividade hemolítica.

Os alginatos –V e +V não apresentaram atividade antimitótica sobre o desenvolvimento do ouriço do mar *Lytechinus variegatus* correspondente aos estágios embrionários de primeira e terceira divisões e blástula. Na fase larval, os alginatos –V e +V foram pouco citotóxicos, apresentando a IC<sub>50</sub> maior que 1000 µg/mL.

### 5.2 Estudo *in vivo* da atividade antitumoral dos alginatos no modelo experimental do Sarcoma 180.

#### 5.2.1 Inibição tumoral

O peso tumoral dos animais transplantados com o Sarcoma 180, estes tratados ou não com os alginatos –V e +V (50 e 100 mg/m<sup>2</sup>) por via intraperitoneal e oral, 5-FU (25 mg/m<sup>2</sup>) está representado nas figuras 13 e 14.

Os alginatos –V e +V nas concentrações de 50 e 100 mg/m<sup>2</sup>, ambos administrados por via i.p e v.o. inibiram o crescimento do tumor Sarcoma 180. O efeito antitumoral do alginato –V foi maior no grupo de animais tratados por via oral, causando inibição do crescimento tumoral de 51,8% (±9,2) e 74,8% (±6,1)

para as concentrações de 50 e 100 mg/m<sup>2</sup>, respectivamente. Quando administrado por via i.p, o alginato -V nas concentrações de 50 e 100 mg/m<sup>2</sup> apresentou inibição de aproximadamente 36,7% para ambas as doses.

Os animais tratados com o alginato +V nas concentrações de 50 e 100 mg/m<sup>2</sup> por via intraperitoneal apresentaram uma inibição tumoral de 27,3% ( $\pm 10,0$ ) e 46,9% ( $\pm 8,5$ ), respectivamente. Já os animais tratados com o alginato +V por via oral apresentaram inibição de 66,2% ( $\pm 9,7$ ) e 88,2% ( $\pm 3,8$ ) nas concentrações de 50 e 100 mg/m<sup>2</sup>, respectivamente. O alginato +V revelou ser mais efetivo na concentração de 100 mg/m<sup>2</sup> por ambas as vias de administração.

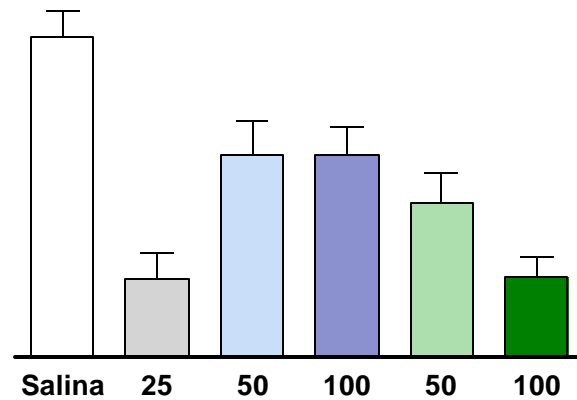
Na figura 15 está representado o peso tumoral dos animais transplantados com o Sarcoma 180 e tratados com os alginatos -V e +V por via oral na concentração de 25 mg/m<sup>2</sup>, 5-FU na concentração de 15 mg/m<sup>2</sup>, bem como a associação de ambos os tratamentos.

Os animais tratados por via oral com os alginatos -V e +V na concentração de 25 mg/m<sup>2</sup> apresentaram um percentual inibitório do tumor Sarcoma 180 de 43,0% ( $\pm 12,3$ ) e 51,0% ( $\pm 9,1$ ), respectivamente. O tratamento com os alginatos -V e +V (25 mg/m<sup>2</sup>) por via oral associado com o 5-FU na concentração de 15 mg/m<sup>2</sup> causou cerca de 48,7% ( $\pm 8,9$ ) e 76,2% ( $\pm 2,3$ ) de inibição do crescimento tumoral, respectivamente. A associação do alginato +V com o 5-FU levou a uma resposta antitumoral maior do que quando os compostos foram administrados isoladamente.

O 5-FU e a salina fisiológica foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente. O 5-FU na concentração de 25 e 15 mg/m<sup>2</sup> apresentou uma atividade inibitória tumoral de 75,5% ( $\pm 8,1$ ) e 65,3% ( $\pm 8,3$ ), respectivamente.

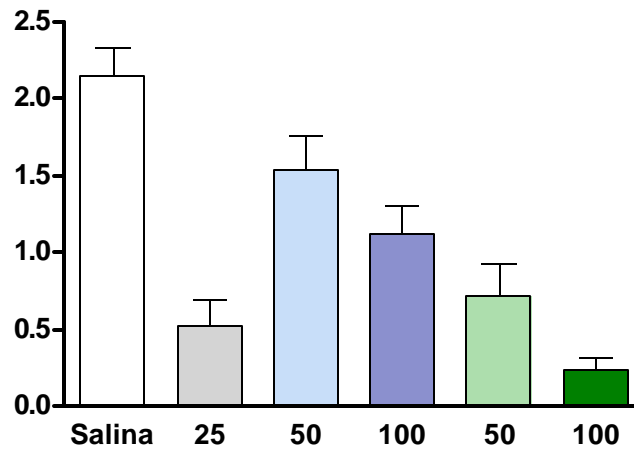
Em visão geral, os tratamentos com os alginatos -V e +V nas concentrações de 25, 50 e 100 mg/m<sup>2</sup> nas suas respectivas vias de administração foram efetivos para inibir o crescimento tumoral, no entanto o alginato +V e a via oral demonstraram ser mais eficazes, sugerindo que as propriedades físico-químicas dos alginatos, bem como a via de administração são fatores relevantes para a atividade antitumoral.

### Alginato -V



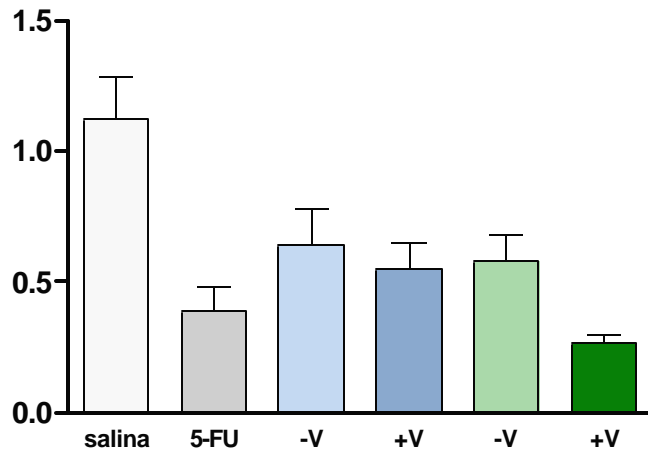
**Figura 13** - Determinação do peso do tumor no décimo dia dos animais transplantados com o tumor Sarcoma 180 e tratados durante 7 dias consecutivos com o Alginato -V ip e vo nas concentrações de 50 e 100 mg/m<sup>2</sup>, 5-FU (25 mg/m<sup>2</sup>) e salina ambos i.p. Os dados estão expressos com média ± E.P.M. Os resultados foram comparados por ANOVA, seguido por Student Newman Keuls com valores significantes para \*p< 0,05.

### Alginato +V



**Figura 14** - Determinação do peso do tumor no décimo dia dos animais transplantados com o tumor Sarcoma 180 e tratados durante 7 dias consecutivos com o Alginato +V ip e vo nas concentrações de 50 e 100 mg/m<sup>2</sup>, 5-FU (25 mg/m<sup>2</sup>) e salina ambos i.p. Os dados estão expressos com média ± E.P.M. Os resultados foram comparados por ANOVA, seguido por Student Newman Keuls com valores significantes para \*p< 0,05.

**Alginatos -V e +V/  
associação ao 5-FU**



**Figura 15** - Determinação do peso corpóreo dos animais transplantedos com o tumor Sarcoma 180 e tratados com os alginatos -V e +V (25mg/m<sup>2</sup>), 5-FU (15 mg/m<sup>2</sup>), a associação de ambos, e salina. Os dados estão expressos com média ± E.P.M. Os resultados foram comparados por ANOVA, seguido por teste de Bonferroni, com valores significantes para \*p< 0,001 em relação ao controle.

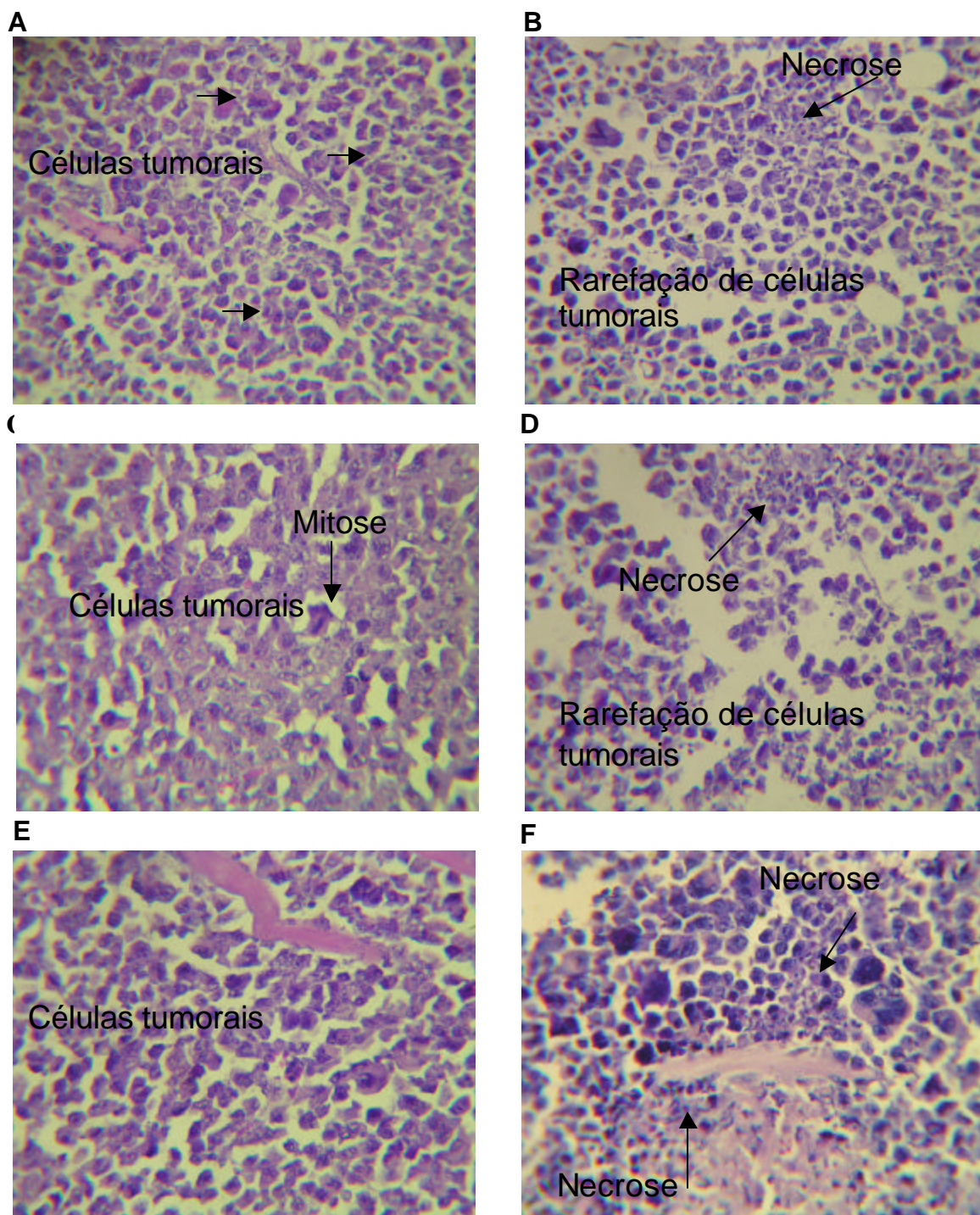
### 5.2.2 Histopatologia do tumor Sarcoma 180

As microfotografias dos cortes histológicos dos tumores dos animais transplantados com o tumor Sarcoma 180 e tratados com os alginatos nas concentrações de 50 e 100 mg/m<sup>2</sup> por via intraperitoneal e oral, 5-FU (25 mg/m<sup>2</sup>) estão representadas nas figuras 16 e 17 para os alginatos -V e +V, respectivamente.

Na análise histopatológica, verificou-se na massa tumoral a presença células pleomórficas, hipercromáticas, exibindo bi-nucleação, anisocariose e mitoses, com invasão muscular e áreas de necrose intra-tumoral no grupo tratado com salina.

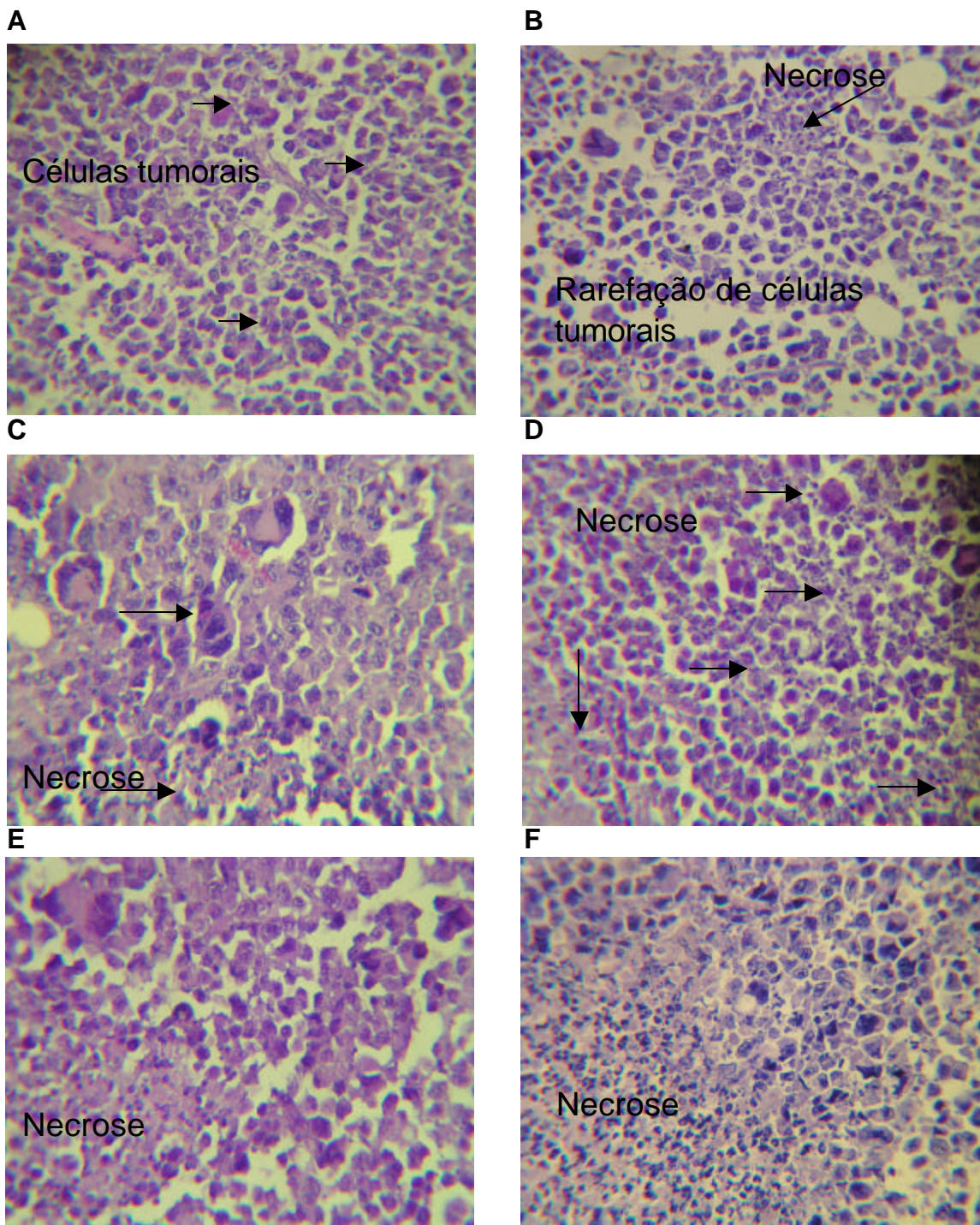
O tumor dos animais tratados com o 5-FU na concentração de 25 mg/m<sup>2</sup>, bem como com os alginatos -V e +V nas concentrações de 50 e 100 mg/m<sup>2</sup> por ambas as vias de administração, apresentaram extensas áreas de necrose de coagulação tumoral em relação aos animais do grupo salina.

O tumor dos animais tratados com os alginatos -V e +V por via oral na concentração de 25 mg/m<sup>2</sup> apresentaram poucas áreas de necroses, porém o tratamento com o 5-FU na concentração de 15 mg/m<sup>2</sup> apresentaram muitas áreas de necroses em relação ao grupo salina. O tratamento associado dos alginatos -V e +V na concentração de 25 mg/m<sup>2</sup> ao 5-FU na concentração de 15 mg/m<sup>2</sup> apresentaram extensas áreas de necroses em relação ao grupo salina.



**Figura 16** – Microfotografia dos cortes histológicos (400X) do tumor Sarcoma 180 no décimo dia, após 7 dias de tratamento. A- salina; B- 5-FU (25 mg/m<sup>2</sup>); C e D- alginato -V i.p ,50 e 100 mg/m<sup>2</sup>, respectivamente; E e F- alginato -V v.o , 50 e 100 mg/m<sup>2</sup>, respectivamente.

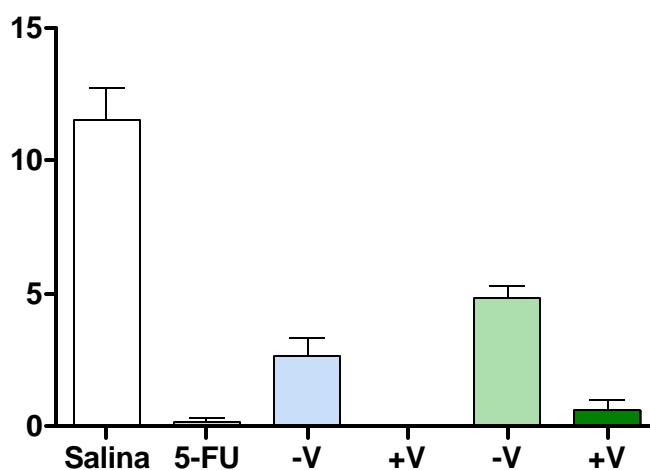




**Figura 17** – Microfotografia dos cortes histológicos (400X) do tumor Sarcoma 180 no décimo dia, após 7 dias de tratamento. A- salina; B- 5-FU ( $25 \text{ mg/m}^2$ ); C e D- alginato +V i.p ,50 e  $100 \text{ mg/m}^2$  , respectivamente; E e F- alginato -V v.o , 50 e  $100 \text{ mg/m}^2$  , respectivamente.

### 5.2.3 Imunohistoquímica do Ki-67

A figura 18 mostra o número de células positivas para o antígeno ki-67 por campo dos tumores dos animais tratados com os alginatos -V e +V na concentração de 100 mg/m<sup>2</sup> por via intraperitoneal e oral e 5-FU na concentração de 25 mg/m<sup>2</sup>. O tratamento com ambos os alginatos promoveram uma inibição na proliferação celular quando comparados com o grupo salina. O alginato +V inibiu 94,2% ( $\pm 2,8$ ) e 100% ( $\pm 0$ ) a proliferação celular quando administrado por via oral e intraperitoneal, respectivamente. Já o alginato -V inibiu 57,9% ( $\pm 4,1$ ) e 76,8% ( $\pm 5,7$ ) a proliferação celular quando administrado por via oral e intraperitoneal, respectivamente. Entre as vias de administração e os alginatos, a atividade antiproliferativa das células do tumor Sarcoma 180 foi significativamente maior no tratamento por via intraperitoneal, bem como pelo alginato +V. O tratamento com o alginato +V por via intraperitoneal exibiu um efeito inibitório semelhante ao 5-FU (25 mg/m<sup>2</sup>) que foi 98,5% ( $\pm 1,4$ ).



**Figura 18**– Determinação do número de células positivas marcadas para o antígeno Ki-67 do tumor Sarcoma 180 no décimo dia nos animais tratados durante 7 dias consecutivos com o Alginato -V e +V i.p e v.o na concentração de 100 mg/m<sup>2</sup>, 5-FU (25 mg/m<sup>2</sup>) e salina ambos i.p. Os dados estão expressos com média  $\pm$  E.P.M. Os resultados foram comparados por ANOVA, seguido por Student Newman Keuls com valores significantes para \* $p < 0,05$ .

## 5.3 Estudo da toxicidade

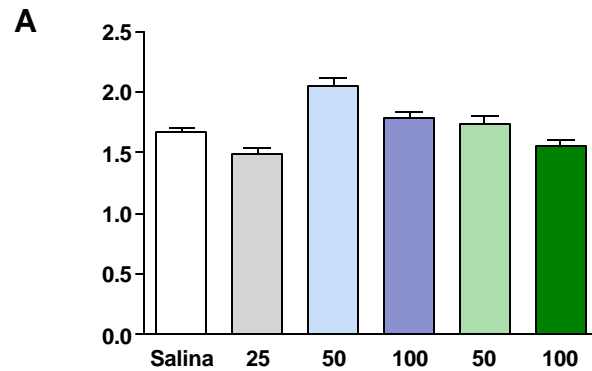
### 5.3.1 Determinação do peso dos órgãos dos animais inoculados com o Sarcoma 180 e tratados com os alginatos.

De acordo com as figuras 19 e 20, os alginatos -V e +V nas concentrações de 50 e 100 mg/m<sup>2</sup> respectivamente, bem como o 5-FU na concentração de 25 mg/m<sup>2</sup> promoveram alterações no peso dos órgãos: fígado (A), rim (B) e baço (C) dos animais transplantados com o tumor Sarcoma 180.

Os animais tratados com os alginatos -V e +V por via i.p. na concentração de 50 mg/m<sup>2</sup> apresentaram um aumento significativo do peso dos órgãos avaliados (fígado, rim e baço) quando comparados com o grupo controle salina. O tratamento com o alginato -V na concentração de 100 mg/m<sup>2</sup> por via intraperitoneal promoveu aumento no peso do baço, enquanto o tratamento por via oral apresentou uma diminuição do peso do baço dos animais. O tratamento com o alginato +V na concentração de 100 mg/m<sup>2</sup> promoveu uma diminuição do peso dos órgãos fígado, rim e baço dos animais tratados por via oral, ao contrário da via intraperitoneal que apresentou significativamente um aumento do baço em relação ao grupo salina.

O peso dos órgãos fígado, rim e baço dos animais tratados com o 5-FU na concentração de 25 mg/m<sup>2</sup> foi significativamente menor em relação ao grupo controle salina.

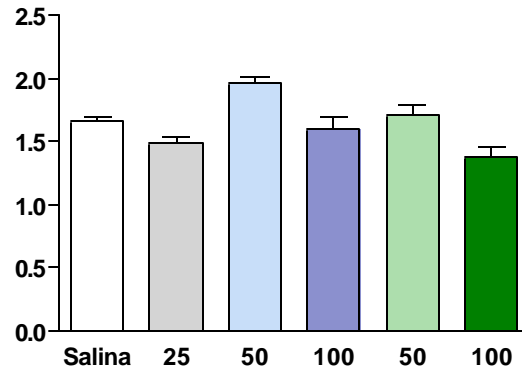
De acordo com a figura 21, o tratamento com os alginatos -V e +V, administrado na concentração de 25 mg/m<sup>2</sup> por via oral e 5-FU na concentração de 15 mg/m<sup>2</sup>, bem como a associação de ambos os tratamentos não causou alterações no peso dos órgãos (fígado, rim e baço) dos animais transplantados com o Sarcoma 180.



**B**

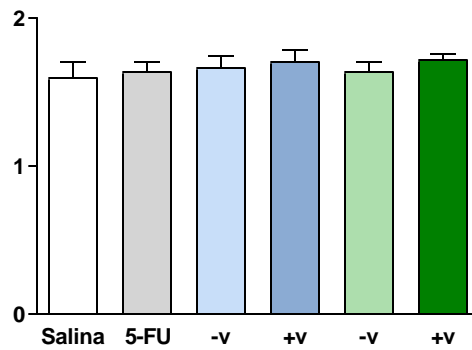
**C**

**Figura 19-** Determinação do peso dos órgãos (A- fígado; B- rim e C- baço) no décimo dia dos animais transplantados com o tumor Sarcoma 180 tratados durante 7 dias consecutivos com o Alginato -V ip e vo nas concentrações de 50 e 100 mg/m<sup>2</sup>, 5-FU (25 mg/m<sup>2</sup>) e salina. Os dados estão expressos com média ± E.P.M. Os resultados foram comparados por ANOVA, seguido por Student Newman Keuls, \*p< 0,05.



dos animais transplantados com o tumor Sarcoma 180 tratados durante 7 dias consecutivos com o Alginato +V ip e vo nas concentrações de 50 e 100 mg/m<sup>2</sup>, 5-FU (25 mg/m<sup>2</sup>) e salina ambos i.p. Os dados estão expressos com média ± E.P.M. Os resultados foram comparados por ANOVA, seguido por Student Newman Keuls, \*p< 0,05.





no décimo dia dos animais transplantados com o tumor Sarcoma 180 tratados durante 7 dias consecutivos com o Alginato -V e +V v.o na concentração de 25 mg/m<sup>2</sup> e ambos na mesma concentração associados ao 5-FU (15 mg/m<sup>2</sup>, i.p), 5-FU (15 mg/m<sup>2</sup>) e salina ambos i.p. Os dados estão expressos com média  $\pm$  E.P.M. Os resultados foram comparados por ANOVA, seguido por Student Newman Keuls, \*p< 0,05.

### **5.3.2 Análise histopatológica dos órgãos dos animais inoculados com o Sarcoma 180 e tratados com os alginatos –V e +V**

As microfotografias dos cortes histológicos do fígado dos animais transplantados com o tumor Sarcoma 180 e tratados com os alginatos nas concentrações de 50 e 100 mg/m<sup>2</sup> por via intraperitoneal e oral, 5-FU (25 mg/m<sup>2</sup>) estão representadas nas figuras 22 e 23 para o alginato –V e +V, respectivamente.

O fígado dos animais inoculados com o Sarcoma 180 e tratados com salina fisiológica apresentou focos inflamatórios, discreta tumefação turva dos hepatócitos com hiperplasia das células de Kupffer. Já o grupo correspondente ao tratamento com 5-FU na concentração de 25 mg/m<sup>2</sup>, apresentou intensa tumefação turva dos hepatócitos, hemorragia sinusoidal, extensas áreas de esteatose, intensa hiperplasia das células de Kupffer, bem como a presença de pigmentos de hemossiderina. Houve uma diminuição dos efeitos tóxicos no tratamento com o 5-FU na concentração de 15 mg/m<sup>2</sup> revelado por focos discretos de esteatose.

Ambos os alginatos administrados por via oral e intraperitoneal provocaram alterações no fígado em relação ao grupo controle, apresentando diferenças entre as concentrações de 50 e 100 mg/m<sup>2</sup>, bem como entre os alginatos –V e +V. O tratamento com os alginatos –V e +V por via oral e intraperitoneal provocou intensa tumefação turva dos hepatócitos, hemorragia sinusoidal, hiperplasia das células de Kupffer e focos inflamatórios no fígado dos animais administrados com as concentrações de 50 e 100 mg/m<sup>2</sup>.

As alterações hepáticas apresentadas no fígado dos animais tratados com os alginatos –V e +V nas concentrações de 50 e 100 mg/m<sup>2</sup> por via intraperitoneal e oral são de caráter reversível, portanto indicando leve hepatotoxicidade.

O fígado dos animais tratados com o alginato –V e +V na concentração de 25 mg/m<sup>2</sup> apresentou o mesmo padrão morfológico do grupo tratado com salina (descrito anteriormente). O tratamento associado do alginatos –V na concentração de 25 mg/m<sup>2</sup> com o 5-FU na concentração de 15 mg/m<sup>2</sup> promoveu esteatose e necrose focal dos hepatócitos, enquanto o alginato +V apresentou hemorragia

V em ambas as concentrações por via intraperitoneal, provocou necrose tubular aguda (NTA) nos rins dos animais. Em geral, as alterações renais foram mais intensas no grupo de animais tratado com alginato -V do que o grupo tratado com o alginato +V.

O rim dos animais tratados com os alginatos -V e +V na concentração de 25 mg/m<sup>2</sup> por via oral apresentou discreta tumefação turva do epitélio tubular, glomérulos preservados, mas somente o alginato -V provocou vacuolização em trechos do epitélio tubular. O tratamento com os alginatos V e +V na concentração de 25 mg/m<sup>2</sup> associados ao 5-FU (15 mg/m<sup>2</sup>) provocaram alterações renais com a presença de vacuolização do epitélio tubular, além de tumefação



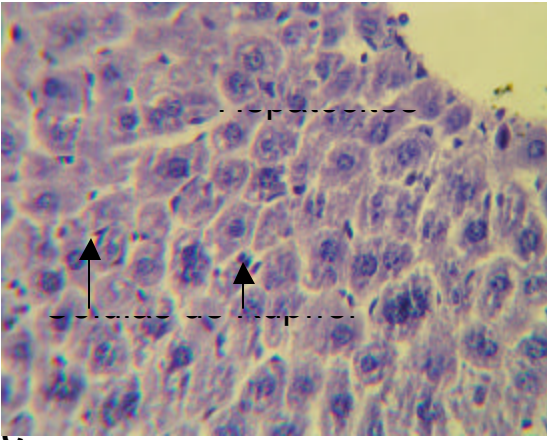
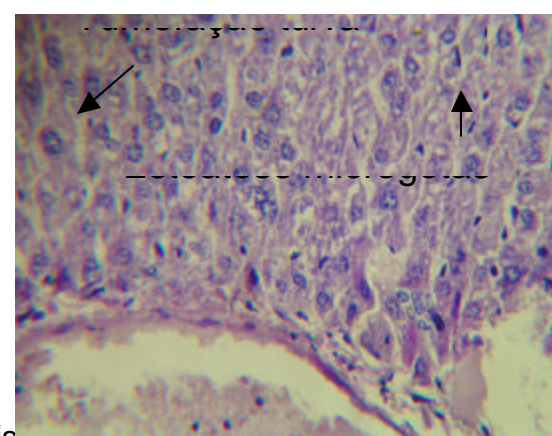
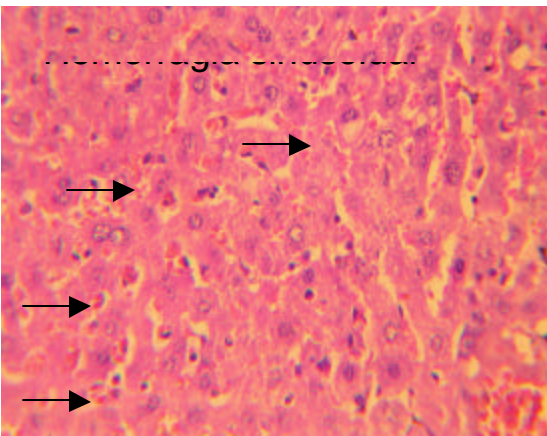
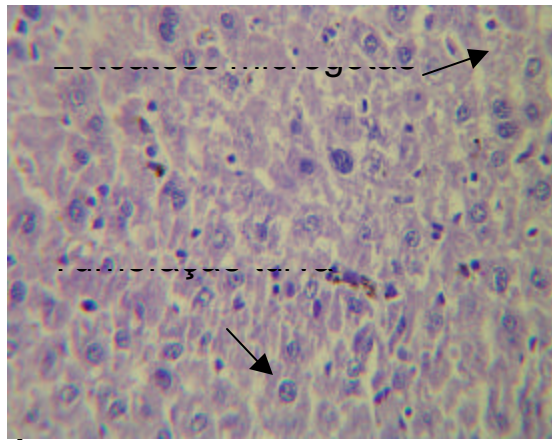
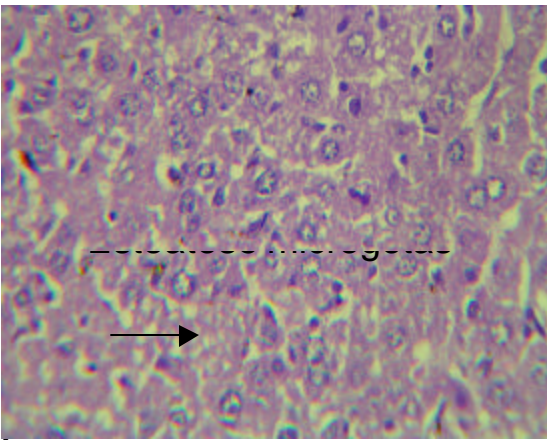
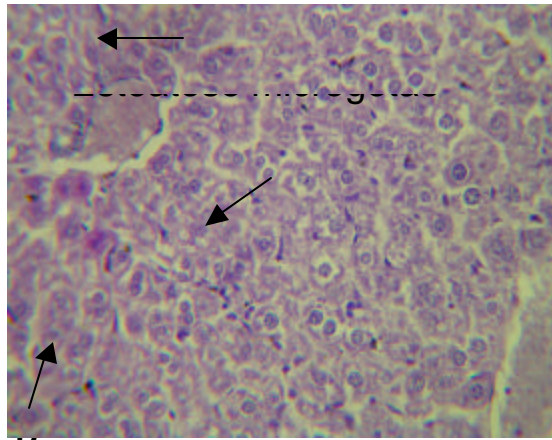
turva do epitélio tubular, porém os glomérulos exibiram um padrão normal com a

As microfotografias dos cortes histológicos do baço dos animais transplantados com o tumor Sarcoma 180 e tratados com os alginatos nas concentrações de 50 e 100 mg/m<sup>2</sup> por via intraperitoneal e oral, 5-FU (25 mg/m<sup>2</sup>) estão representadas nas figuras 26 e 27 para o alginato -V e +V, respectivamente.

O baço dos animais tratados com salina fisiológica apresentou poucos megacariócitos e a polpa branca circunscrita. O tratamento com o 5-FU nas concentrações de 25 e 15 mg/m<sup>2</sup> promoveu imunossupressão revelado por uma diminuição do número de megacariócitos.

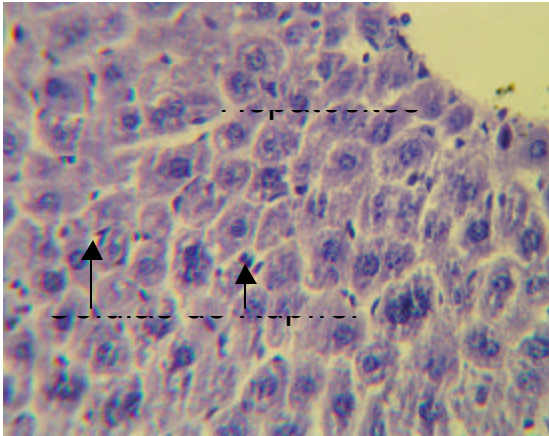
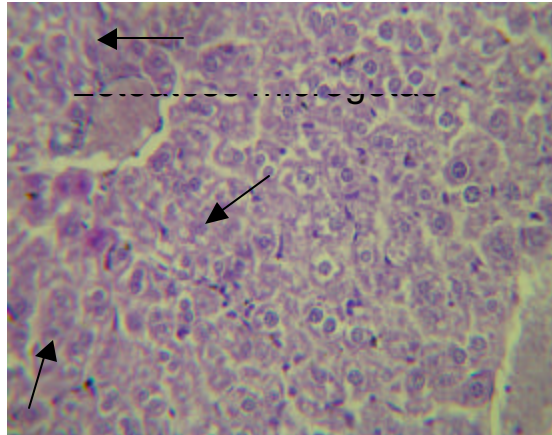
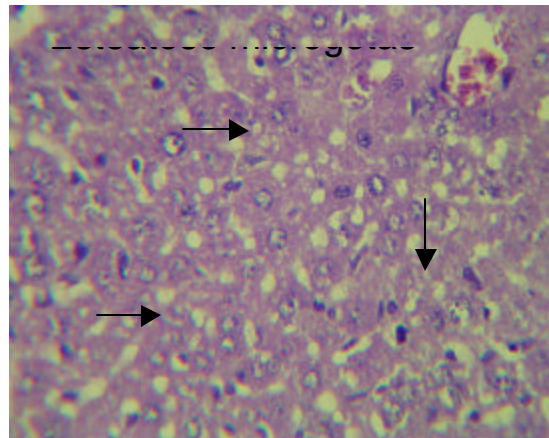
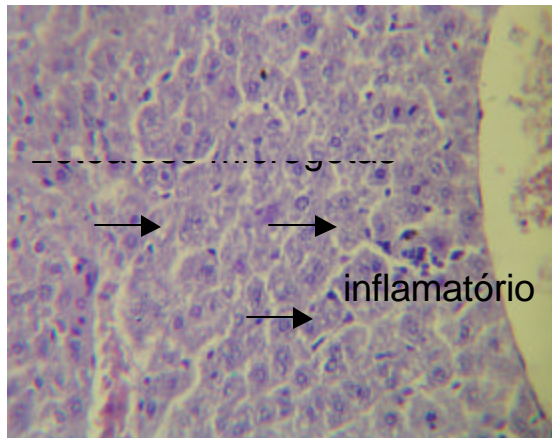
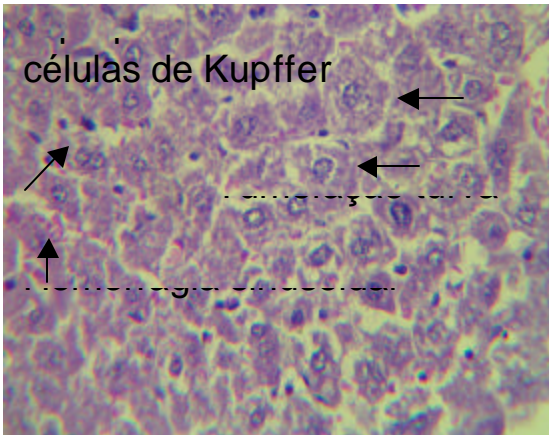
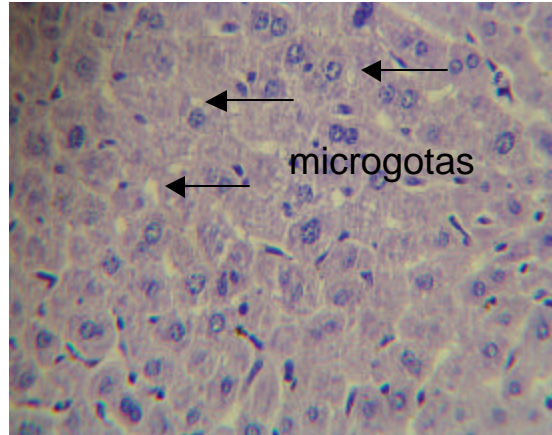
Ambos os alginatos -V e +V administrados por via intraperitoneal e oral nas concentrações de 50 e 100 mg/m<sup>2</sup> promovem um aumento do número de megacariócitos distribuídos pelo córtex e medula, bem como aumento da polpa branca no baço dos animais. Entretanto, o alginato +V causa uma hiperplasia da polpa branca mais intensa que o alginato -V. Não houve diferenças entre os tratamentos realizados por via oral e intraperitoneal com os alginatos -V e +V.

O baço dos animais tratados com os alginatos -V e +V na concentração de 25 mg/m<sup>2</sup> por via oral, bem como sua associação ao 5-Fu na concentração de 15 mg/m<sup>2</sup> não apresentaram significativa proliferação da polpa branca significativamente em relação ao grupo controle.

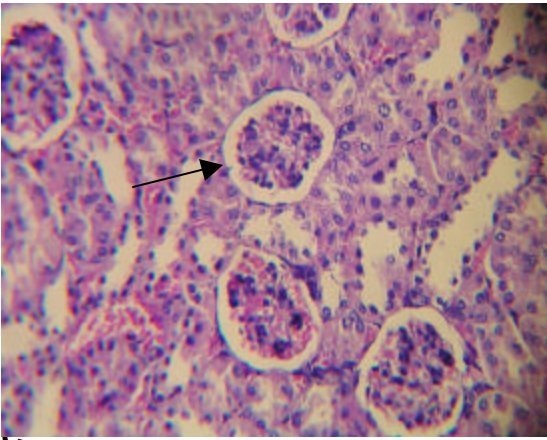
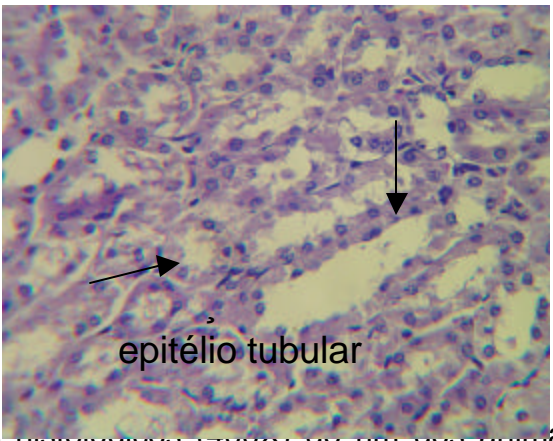
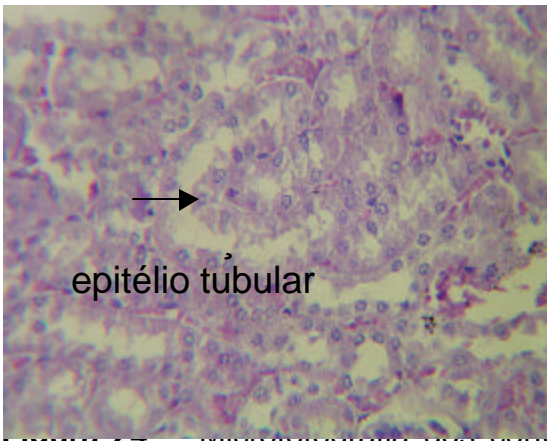
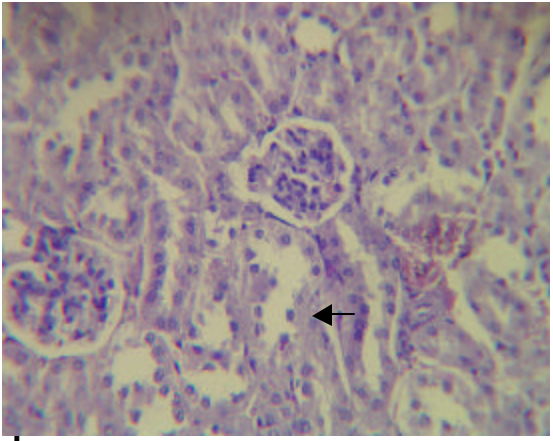
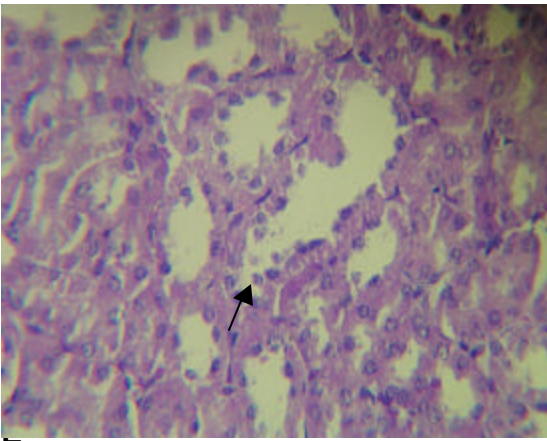
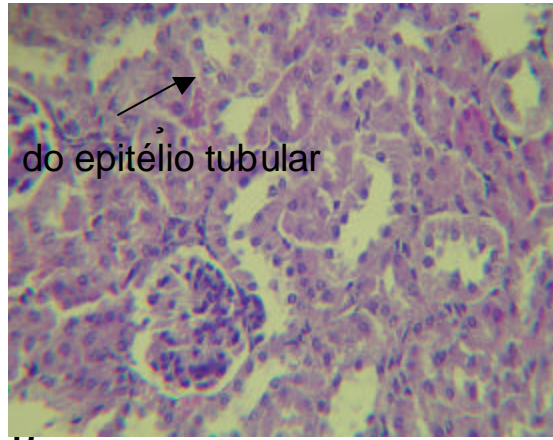
**A****B**

**Figura 22** — microfotografia dos cortes histológicos (400X) do fígado dos animais, após 7 dias de tratamento. A- salina; B- 5-FU (25 mg/m<sup>2</sup>); C e D- alginato -V i.p., 50 e 100 mg/m<sup>2</sup>, respectivamente; E e F- alginato -V v.o., 50 e 100 mg/m<sup>2</sup>, respectivamente.



**A****B****C****D****E****F**

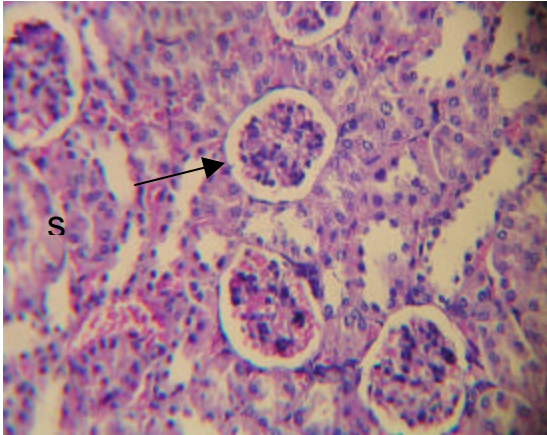
**Figura 23** – Microfotografia dos cortes histológicos (400X) do fígado dos animais, - salina; B- 5-FU ( $\text{mg}/\text{m}^2$ ); C e D- alginato +V i.p ,50 e 100  $\text{mg}/\text{m}^2$  , respectivamente; E e F- alginato -V v.o , 50 e 100  $\text{mg}/\text{m}^2$  , respectivamente.

**A****B**

**Figura 24** — microfotografia dos cortes histológicos (100x) de rim dos animais, - salina; B- 5-FU (25 mg/m<sup>2</sup>); C e D- alginato -V i.p ,50 e 100 mg/m<sup>2</sup>, respectivamente; E e F alginato -V v.o , 50 e 100 mg/m<sup>2</sup>, respectivamente.



A



B

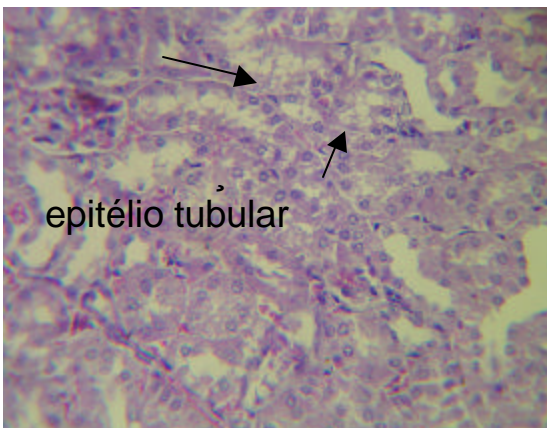
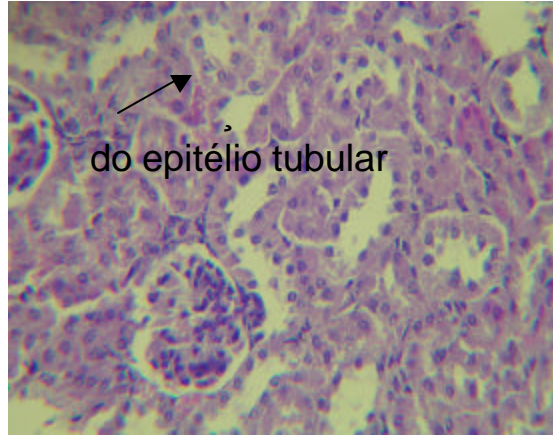
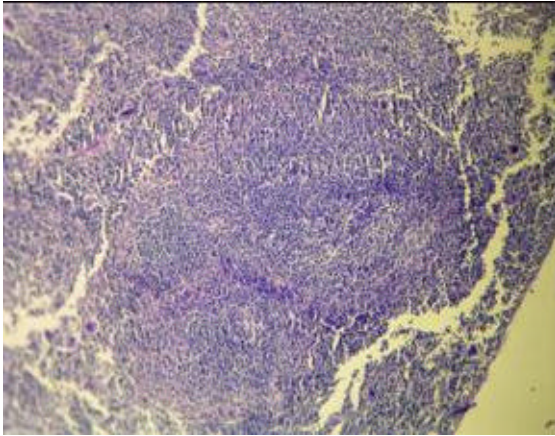
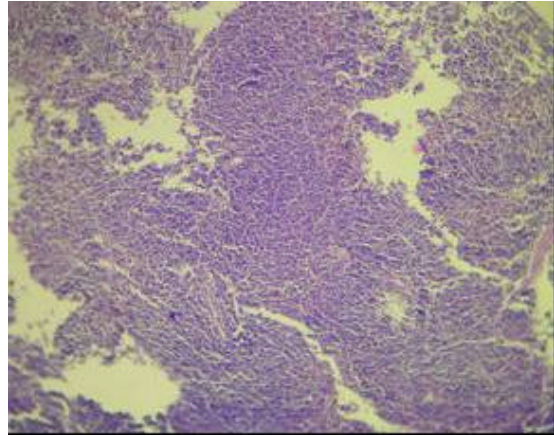
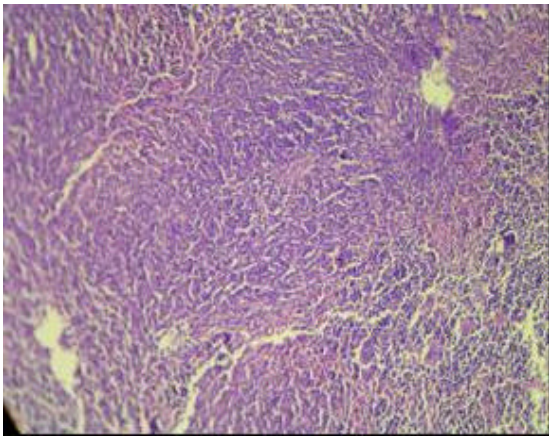
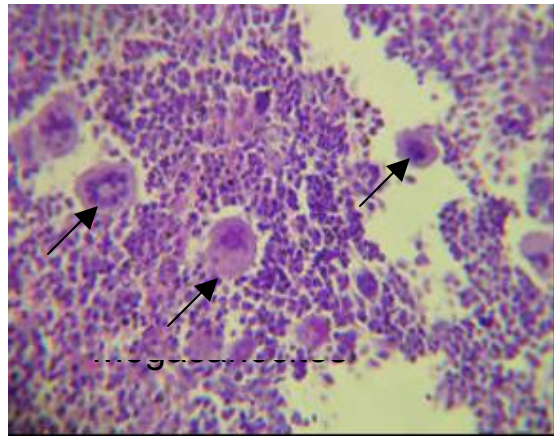
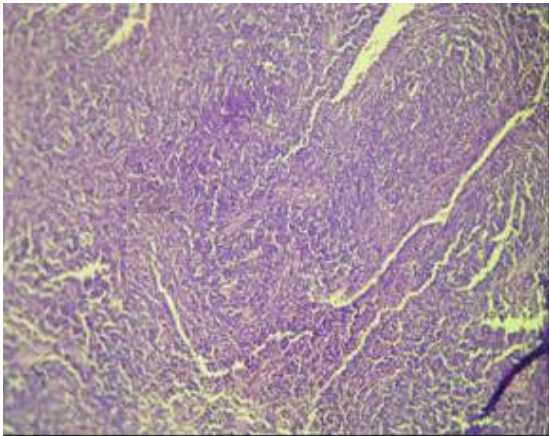
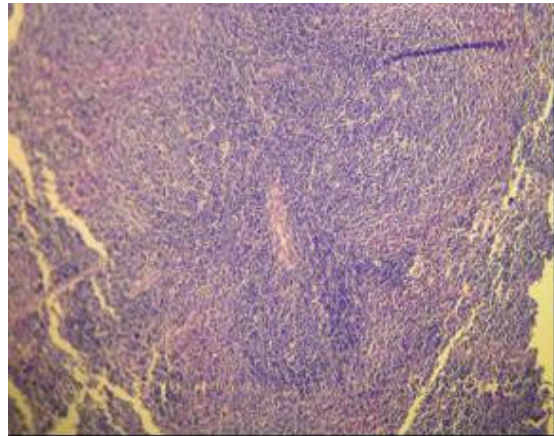


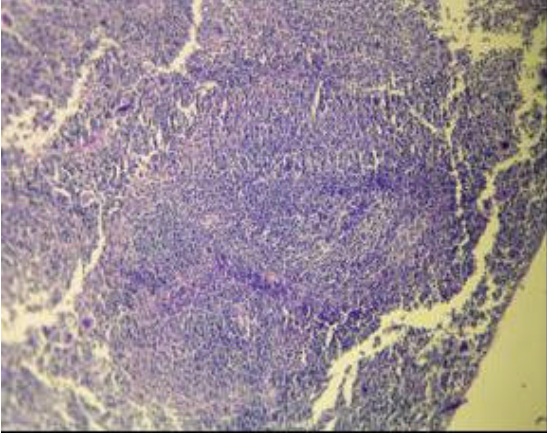
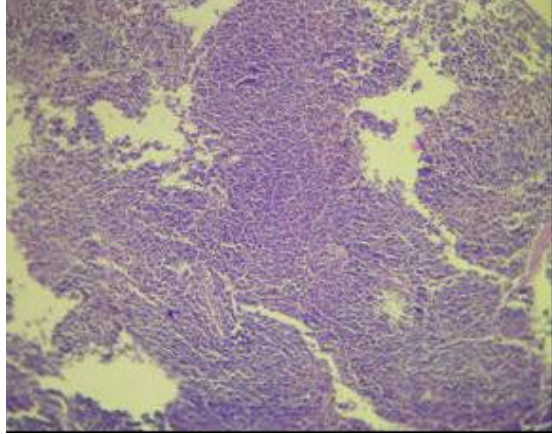
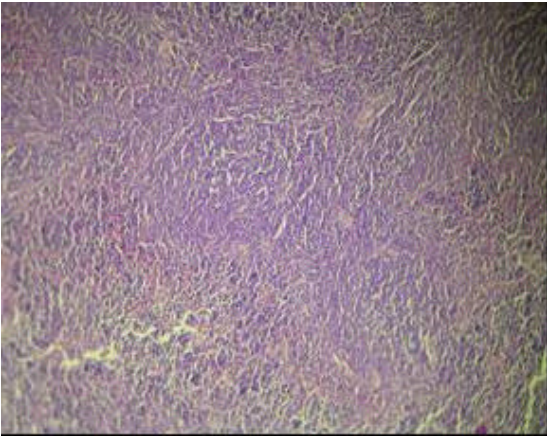
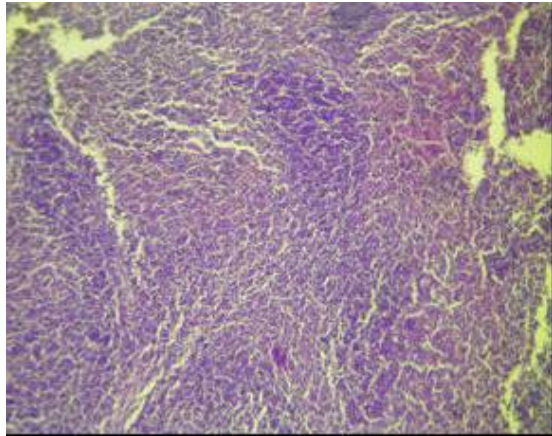
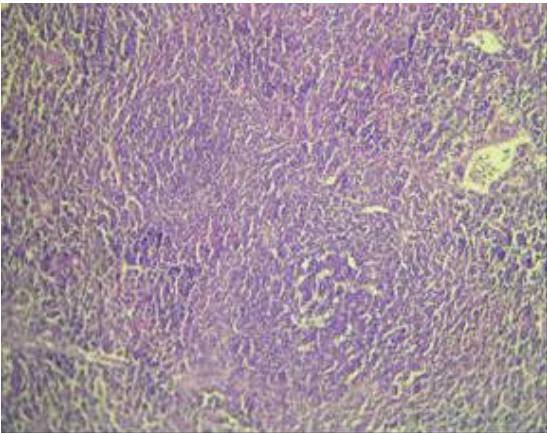
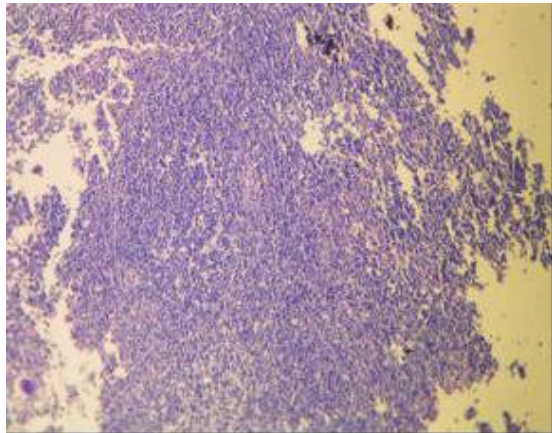
Figura 20 - Microfotografia dos cortes histológicos (100x) do rim dos animais, - salina; B- 5-FU ( $\text{mg}/\text{m}^2$ ); C e D- alginato +V i.p ,50 e 100  $\text{mg}/\text{m}^2$  , respectivamente; E e F- alginato -V v.o , 50 e 100  $\text{mg}/\text{m}^2$  , respectivamente.



**A****B****C****D****E****F**

**Figura 26** – Microfotografia dos cortes histológicos (100X) do baço dos animais, - salina; B- 5-FU (25 mg/m<sup>2</sup>); C e D- alginato -V i.p ,50 e 100 (400X) mg/m<sup>2</sup> , respectivamente; E e F- alginato -V v.o , 50 e 100 mg/m<sup>2</sup> , respectivamente.

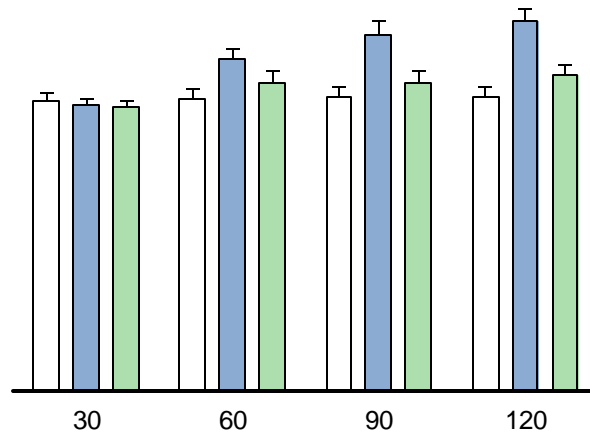


**A****B****C****D****E****F**

**Figura 27** – Microfotografia dos cortes histológicos (100X) do baço dos animais, - salina; B- 5-FU (25 mg/m<sup>2</sup> ); C e D- alginato +V i.p ,50 e 100 mg/m<sup>2</sup> , respectivamente; E e F alginato -V v.o , 50 e 100 mg/m<sup>2</sup> , respectivamente.

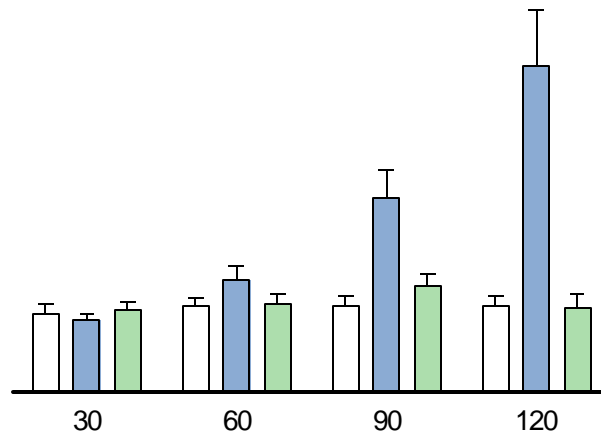
V e +V não alteraram o transporte dos íons sódio (%TNa+) e potássio (%TK+), porém promoveram uma diminuição significativa do transporte de íons cloreto (%TCl-) nos tempos 60, 90, 120 ( $70.9 \pm 4.4$ ,  $64.2 \pm 5.7$  e  $71.2 \pm 2.5$ ) e 120 ( $74.8 \pm 3.7$ ), respectivamente em relação ao controle ( $80.3 \pm 2.4$ ). O alginato -V aumentou intensamente de forma crescente a excreção nos tempos 60, 90 e 120 minutos dos íons sódio, potássio e cloreto em relação ao controle, no entanto o alginato +V aumentou significativamente a excreção dos íons sódio e cloreto somente no tempo de 90 minutos.



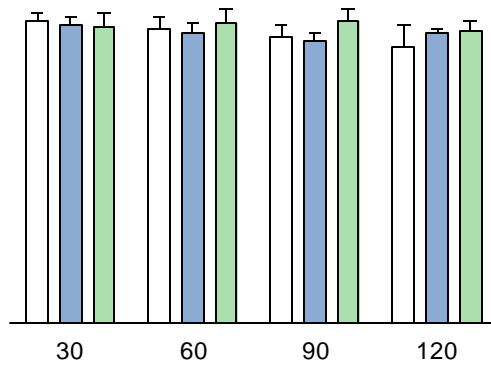


1

$\mu\text{g/mL}$  na pressão de perfusão (A) e resistência vascular renal (B) no controle externo ( ). Os dados estão expressos com média  $\pm$  E.P.M. Os resultados foram comparados por ANOVA, seguido por Student Newman Keuls, \* $p < 0,05$ .



$\mu\text{g}/\text{mL}$  no fluxo urinário (A) e ritmo de filtração glomerular (B) no sistema de perfusão renal (controle externo ( )). Os dados estão expressos com média  $\pm$  E.P.M. Os resultados foram comparados por ANOVA, seguido por Student Newman Keuls,  $*p < 0,05$ .



90-

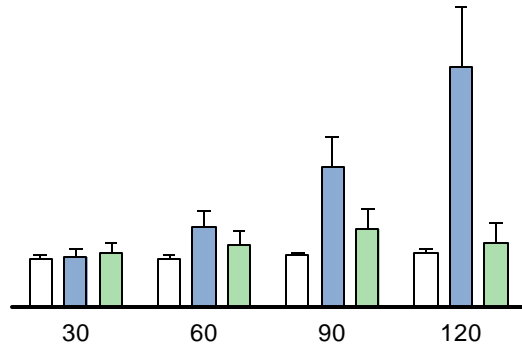
80-

70-

60-

μg/mL no transporte de íons sódio (A), potássio (B) e cloreto (C) no sistema de perfusão renal (controle externo ( )). Os dados estão expressos com média ± E.P.M. Os resultados foram comparados por ANOVA, seguido por Student Newman Keuls, \*p < 0,05.

+



125.

100.

75.

µg/mL na excreção de íons sódio (A), potássio (B) e cloreto (C) no sistema de perfusão renal (controle externo( )). Os dados estão expressos com média ± E.P.M. Os resultados foram comparados por ANOVA, seguido por Student Newman Keuls, \*p< 0,05.

#### **5.4 Análise dos parâmetros bioquímicos e hematológicos**

Foi realizada a análise bioquímica dos animais transplantados com o tumor Sarcoma 180 e tratados com os alginatos -V e +V por via oral (25mg/m<sup>2</sup>), 5-FU (15 mg/m<sup>2</sup>), a associação de ambos, salina (controle tumor), bem como no grupo de animais sem tumor e não tratados (controle normal). O níveis séricos das enzimas aspartato amino transaminases (UI/L), uréia (mg/dL) e creatinina (mg/dL)

Os animais tratados com os alginatos -V e +V e o 5-FU na concentração de 25 e 15 mg/m<sup>2</sup>, respectivamente, bem como a associação de ambos os tratamentos não apresentaram alterações dos níveis séricos de creatinina e uréia em relação ao grupo controle normal.

Os animais tratados com os alginatos -V e +V na concentração de 25 mg/m<sup>2</sup> não apresentaram alterações nas enzimas aspartato amino transaminases (AST) em relação ao controle normal. Entretanto, o grupo administrado com o 5-FU na concentração de 15 mg/m<sup>2</sup>, bem como sua associação com os alginatos -V e +V na concentração de 25 mg/m<sup>2</sup> apresentaram um grande aumento na atividade das enzimas hepáticas. O nível enzimático das AST dos animais tratados somente com o 5-FU não apresentou diferenças significativas em relação aos animais tratados com os alginatos -V e +V associados ao 5-FU. A partir da análise bioquímica da atividade enzimática das AST, pode-se concluir que diferentemente do 5-FU na concentração de 15 mg/m<sup>2</sup>, os alginatos -V e +V na concentração de 25 mg/m<sup>2</sup> não causam toxicidade hepática e que ambos os alginatos diminuíram significativamente o efeito tóxico hepático promovido pelo 5-FU quando administrados em associação.

A partir da análise hematológica, determinou-se o número de leucócitos totais e linfócitos (figura 32 A e B, respectivamente) nos animais transplantados com o tumor Sarcoma 180 e tratados com os alginatos -V e +V na concentração de 25 mg/m<sup>2</sup> por via oral, 5-FU na concentração de 15 mg/m<sup>2</sup>, a associação de ambos os tratamentos, salina (controle tumor), bem como em animais sem tumor e não tratados (controle normal).

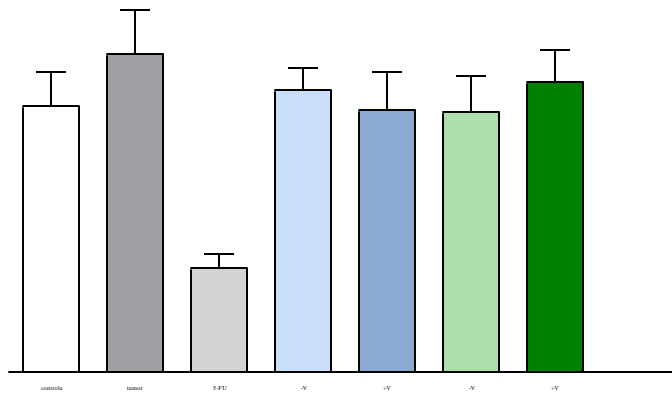
Os animais transplantados com o Sarcoma 180 e tratados com os alginatos -V e +V na concentração de 25 mg/m<sup>2</sup> e salina (grupo tumor) não apresentaram diferenças significativas do número de leucócitos totais em relação ao grupo de animais sem tumor e não tratados (grupo controle), porém o número de linfócitos encontrou-se significativamente diminuído. O tratamento com o 5-FU na concentração de 15 mg/m<sup>2</sup> promoveu uma intensa diminuição do número de leucócitos totais e linfócitos quando comparado com o grupo controle normal.

Os animais tratados com a associação dos alginatos V e +V na concentração de 25 mg/m<sup>2</sup> ao 5-FU na concentração de 15 mg/m<sup>2</sup> não apresentaram diferenças significativas do número de leucócitos totais em relação ao grupo controle, no entanto em relação ao tratamento com o 5-FU houve um expressivo aumento do número de leucócitos. A associação de ambos os alginatos com o 5-FU apresentou uma diminuição significativa do número linfócitos em relação ao grupo controle normal, porém em relação aos animais tratados com o 5-FU houve um expressivo aumento do número de linfócitos. Portanto, os alginatos -V e +V na concentração de 25 mg/m<sup>2</sup> promoveram um resgate do quadro de leucocitopenia e linfocitopenia apresentado pelos animais tratados com o 5-FU na concentração de 15 mg/m<sup>2</sup>.

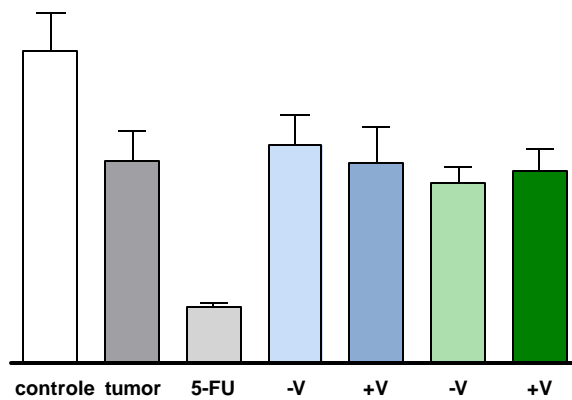
**Tabela 4** – Análise bioquímica das enzimas aspartato amino transaminases (AST), uréia e creatinina dos animais transplantados com o tumor Sarcoma 180 e tratados com os alginatos -V e +V na concentração de 25 mg/m<sup>2</sup>, 5-FU na concentração de 15 mg/m<sup>2</sup>, bem como a associação de ambos os tratamentos. O grupo controle normal representa os animais sem tumor e não tratados e o grupo controle tumor representa os animais transplantados com o Sarcoma 180 e tratados com salina fisiológica.

<b>Grupo</b>	<b>AST (UI/L)</b>	<b>Uréia (mg/ dL)</b>	<b>Creatinina (mg/dL)</b>
Controle normal	82,3 + 3,7	50,3 + 6,4	0,14 + 0,02
Controle tumor	133,0 + 10,4	35,8 + 21	0,15 + 0,03
5-FU	199,4 + 49,2***	34,8 + 14	0,1 + 0,04
-V	136,0 + 12,9	34,6 + 9,4	0,1 + 0,03
+V	147,0 + 6,5	39,6 + 13	0,09 + 0,02
-V + 5-FU	156,0 + 15,4**	28,8 + 6,0	0,1 + 0,04
+V + 5-FU	163,0 + 13,4*	33,8 + 4,6	0,12 + 0,02

\* p < 0,05; \*\* p < 0,01 e \*\*\* p < 0,001 em relação ao grupo controle normal. Foi realizado análise de variância (ANOVA), teste de Bonferroni.



-



tumor Sarcoma 180 e tratados com os alginatos  $-V$  e  $+V$  ( $25\text{mg}/\text{m}^2$ ), 5-FU ( $15\text{ mg}/\text{m}^2$ ), a associação de ambos, e salina (tumor). Já o grupo controle representa os animais sem tumor e não tratados. Os dados estão expressos com média  $\pm$  E.P.M. Os resultados foram comparados por ANOVA, seguido por teste de Bonferroni, com valores significantes para  $*p < 0,01$  em relação ao controle e  $\# p < 0,01$  em relação ao 5-FU.



**Tabela 5-** Resumo dos resultados obtidos com os alginatos -V e +V da alga marinha *Sargassum vulgare* C. Agardh.

<b>Alginate -V</b>	<b>Alginato +V</b>	
<b>Propriedades Físicos-Químicas</b>		
Viscosidade Intrínseca $\eta$ [g/dL		
5,4	9,1	
Frações MM e GGG e 0,4		0,6
	0,67 e 0,2	
<b>Estudo da Atividade Citotóxica <i>in vitro</i></b>		
Inibição da Proliferação de Células Tumorais- MTT		-
	-	
Potencial Antimitótico em Ovos de Ouriço do Mar		-
	-	
Toxicidade Aguda em <i>Artemia sp</i>		-
	-	
Atividade Hemolítica		-
	-	
<b>Estudo Antitumoral <i>in vivo</i></b>		
Via de administração oral		++
	+++	
Via de administração intraperitoneal		++
	+++	
Associação com o 5-Fluouracil		++
	+++	
Detecção de Ki-67 por imunohistoquímica		
	+++	+++
<b>Estudo da toxicidade</b>		
Dano hepático		++
	+	
Imunomodulação no baço		++
	+++	
Nefrotoxicidade		
	+++	+
<b>Análise Bioquímica e Hematológica</b>		
Função Hepática e Renal		+
	+	
Reversão da leucocitopenia e linfocitopenia do 5-FU		+++

+ Fracamente ativa; ++ Ativa; +++Fortemente ativa; - Não ativa

## 6. *Discussão*

A partir da década de 50 com a descoberta do DNA por Watson & Crick, iniciou-se uma revolucionária área de pesquisa a fim de compreender vários processos biológicos que a ciência até então desconhecia. Com o sequenciamento do genoma humano, foram elucidados vários produtos protéicos associados aos genes constituintes e descobriram-se diversos alvos moleculares envolvidos em vários tipos de doenças, como por exemplo, em diabetes, obesidade e câncer. Nos últimos anos têm ocorrido uma grande descoberta de alvos moleculares que podem ser utilizados para o diagnóstico, prevenção e tratamento de doenças humanas (Newman *et al.*, 2003). Uma análise dos últimos 6 anos apontam que as novas drogas introduzidas no mercado para o tratamento de doenças humanas foram desenvolvidas a partir de produtos naturais, e, de acordo com dados do FDA (United States Food and Drug Administration), mais de 60% e 75% das drogas utilizadas na clínica para tratar câncer e doenças infecciosas, respectivamente, são provenientes de produtos naturais.

Nas últimas três décadas, mais de 3.000 novas substâncias foram identificadas a partir de organismos marinhos, demonstrando o grande potencial do ambiente marinho como fonte de novas classes de moléculas bioativas, dentre elas, aquelas com propriedades anti-câncer (Schwartzmann *et al.*, 2001).

Historicamente, as algas marinhas têm sido utilizadas por vários países orientais como fonte de alimentação. Em vários programas de screening, a investigação de algas marinhas tem evidenciado numerosos extratos com efeito antitumoral para diversas linhagens (Xu *et al.*, 2004). Os polissacarídeos sintetizados por macroalgas marinhas formam a base de uma indústria alimentar com grande importância econômica e em rápida expansão (Renn, 1997). Além  
stria alimentar, esses compostos são, ainda, utilizados na

indústria farmacêutica e na indústria têxtil (Moe *et al.*, 1995). Os polissacarídeos bioativos de origem natural têm sido utilizados na tradicional medicina chinesa especialmente como adjuvante no tratamento do câncer (Chang, 2002).

A descoberta de inúmeros compostos utilizados no tratamento clínico de neoplasias está associada principalmente à evolução da oncologia experimental (Pott, 1987). A quimioterapia do câncer, seja em animais experimentais ou em humanos, tem como objetivo a redução do número de células neoplásicas viáveis, abaixo do qual, as células que sobrevivam ao tratamento com uma determinada droga não sejam capazes de restabelecer a

Descrito pela primeira vez pelo químico britânico Stanford, E. C. em 1881, os alginatos são polissacarídeos formados por unidades de ácido manurônico e ácido gulurônico, ligados a partir de ligação 1-4 e, atualmente, são bastante explorados pelas indústrias farmacêutica, biotecnológica (Moe *et al.*, 1995).

Os alginatos estudados neste trabalho foram isolados da alga marinha *Sargassum vulgare*, extraídos à temperatura de 60°C nos tempos de 1 e 5 horas. De acordo com a caracterização físico-química reportada por Torres (2003), os alginatos extraídos a 1 hora e 5 horas apresentam diferentes viscosidades, sendo a viscosidade intrínseca equivalente a 5,4 g/dL e 9,1 g/dL, respectivamente. Diante destes resultados convencionou-se de -V (menos viscoso) e +V (mais viscoso) os alginatos extraídos a 1 e 5 horas, respectivamente.

Nos ensaios *in vitro* realizados, foi avaliado o potencial tóxico dos alginatos -V e +V de *S. vulgare* através da avaliação do efeito antiproliferativo em 5 linhagens tumorais: HL-60, MCF-7, HCT-8, CEM e B16, da toxicidade em larvas de *Artemia salina*, da atividade lítica em membrana de eritrócitos, bem como no estudo da atividade antimetabólica sobre o desenvolvimento embrionário -do-mar *Lytechinus variegatus*. Nesses testes realizados, os alginatos -V e +V não apresentaram efeito, com exceção da fase larval do ouriço-do-mar.

utilização de lectinas conjugadas com FITC (fluoresceína isotiocinato), os autores demonstraram que a superfície dos ovos dos ouriços apresentam uma

diversidade de glicanos que não podem ser visualizados nos primeiros estágios s glicanos começam a reaparecer a partir dos estágios de blástula e gástrula, estando todos, aparentemente, presentes na superfície da larva. No presente trabalho, os alginatos -V e +V de *S. vulgare* também apresentaram efeito inibitório apenas no estágio I -do-mar. Ambos os alginatos apresentaram a IC<sub>50</sub> maior que 1000 µg/mL, concentração esta bastante elevada se comparada com as lectinas. Baseado nestes achados, a toxicidade dos alginatos -V e +V durante a fase larval do ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* também pode estar relacionada com a presença de glicanos na membrana destas células.

Nos estudos *in vivo*, avaliou-se o potencial antitumoral dos alginatos -V e +V de *S. vulgare* no modelo experimental do Sarcoma 180. O Sarcoma 180 foi, inicialmente, identificado no *Crocker Laboratory (Columbia University, New York)* em 1914. É um tumor de natureza sólida, que foi inicialmente classificado como carcinoma mamário, por surgir espontaneamente na região axilar de camundongos. Em 1919, após muitos tran forma sarcomatosa e manteve-se sem alterações até os dias atuais (Schabel *et al.*, 1977,). A forma sólida caracteriza-se por ter um rápido crescimento e a inoculação de 5 x 10<sup>5</sup> células em camundongos “swiss” tratados com apenas com salina fisiológica originou uma massa tumoral de aproximadamente 2,12g (± 0,17) com 10 dias de inoculação de acordo com o presente trabalho.

Os quimioterápicos são classificados de acordo com sua estrutura química e mecanismo de ação, tais como os agentes alquilantes, anti-metabólicos, inibidores da topoisomerase I e II, anti-mitóticos, compostos platinos etc. (Espinosa *et al.*, 2003). Neste estudo, o 5-FU foi utilizado nos ensaios *in vivo* como controle positivo e administrado por via intraperitoneal na concentração de 25 e 15 mg/m<sup>2</sup>. O 5-Fluorouracil é um agente antimetabólico da classe dos análogos da pirimidina que em última instância levam a um bloqueio da timidilato sintase, sendo bastante utilizado na clínica (Hardman & Limbird, 1996).

O tratamento com os alginatos -V e +V nas concentrações de 50 e 100 mg/m<sup>2</sup> inibiu significativamente o crescimento do tumor sólido do Sarcoma 180 transplantado em camundongos, quando administrados por via oral e intraperitoneal. Embora os alginatos -V e +V tenham apresentado um potente efeito antitumoral por ambas as vias de administração, a administração por via oral foi mais eficiente para ambos os alginatos.

Na prática clínica, a via de administração é extremamente importante tanto para o paciente no que se diz respeito à invasibilidade, bem como em relação a farmacocinética da droga. A ingestão oral é o método mais comum de administração de drogas por ser considerado mais seguro, mais conveniente e, *et al.*, 1996). Na área da quimioterapia antineoplásica, a existência de drogas que possam ser administradas por via oral representa um avanço no que diz respeito à melhoria da qualidade de vida dos pacientes (Gebbia & Puozzo, 2005).

De acordo com Kimura *et al.* (1996), quando alginatos de sódio naturais são administrados por via oral, eles são convertidos a ácido algínico livre no estômago. O ácido algínico, por sua vez, não seria absorvido no intestino delgado devido à falta de enzimas digestivas específicas em mamíferos e funcionaria como uma fibra. Ao contrário do que esses autores sugerem, os dados do presente trabalho sugerem que os alginatos -V e +V de *S. vulgare* sejam absorvidos por via oral, uma vez que essa via de administração foi a mais eficiente na inibição do crescimento tumoral, e, ainda, pela presença de efeitos tóxicos observados após o tratamento, o que será discutido mais adiante. Desta maneira, o estômago pode estar sendo o grande responsável pela absorção de ambos os alginatos.

O alginato +V apresentou um maior efeito inibitório do crescimento tumoral que o alginato -V, quando se compara as respectivas concentrações e vias de administração. Vale ressaltar que o alginato +V na concentração de 100 mg/m<sup>2</sup> quando administrado por via oral inibiu 88,8 (± 3,8)% do crescimento tumoral, percentual este superior ao apresentado pelo tratamento com 5-FU (25 mg/m<sup>2</sup>).

Geralmente, as soluções de alginatos possuem uma alta viscosidade que normalmente pode variar entre  $[\eta]$  6 e 20 g/dL. A viscosidade é uma propriedade que está relacionada com a conformação das moléculas de alginatos, que resultam em um amplo volume hidrodinâmico. Os alginatos apresentam a propriedade de gerar flexibilidade ao tecido algal em frente à força das marés. Dentre os fatores envolvidos que interferem diretamente na viscosidade dos alginatos são a força iônica da solução, a conformação estrutural do polímero, peso molecular, bem como as seqüências das unidades M (manurônico) e G (gulurônico) (Moe et al., 1995). Segundo Torres (2003), o peso molecular dos alginatos  $-V$  e  $+V$  de *S. vulgare* foram determinados a partir da viscosidade intrínseca  $[\eta]$ , os quais foram  $19,3 \times 10^4$  g/mol e  $24,8 \times 10^4$  g/mol, respectivamente. Através da análise de  $^1H$  RMN foram determinadas as frações Fmm e Fgg de ambos os alginatos. O alginato  $-V$  apresentou a Fmm= 0,6 e Fgg= 0,4, enquanto o alginato  $+V$  apresentou a Fmm= 0,67 e Fgg= 0,2. Panikkar & Brasch (1996) propôs um sistema de classificação para três tipos de alginatos baseado na composição de monômeros: alginatos com alto teor de blocos M (Fm 0,7), alginatos com alto teor de blocos G (Fm 0,6) e alginatos intermediária composição de blocos M e G ( $0,6 < Fm < 0,7$ ). Baseada nesta classificação, o alginato  $-V$  (0,6) apresenta um alto teor de grupos G, enquanto o alginato  $+V$  (0,67) é classificado como do tipo intermediário.

Fujihara *et al.* (1984) trabalharam com alginatos isolados da alga *Sargassum fulvellum* e demonstraram seu efeito antitumoral contra vários tumores murinos, principalmente o Sarcoma 180 (forma ascítica e sólido), o carcinoma de Erlich e o IMC. Posteriormente, Fujihara & Nagumo (1992 e 1993) reportaram a atividade antitumoral de alginatos extraídos a partir de muitos tipos de algas marinhas e demonstraram que o efeito antitumoral dos alginatos depende da composição do homopolímero de blocos GG e MM. Os alginatos que apresentaram uma alta composição de blocos MM mostraram alta atividade antitumoral em relação aos alginatos de baixa composição MM.

Em 1991, Otterlei *et al.* demonstraram que alginatos são capazes de estimular monócitos humanos resultando na liberação de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1,



todos produzidos em elevadas concentrações. Neste trabalho, os alginatos com pouco G foram aproximadamente 10 vezes mais potentes na indução da produção de citocinas quando comparado aos alginatos com alto teor no trabalho de Fujihara & Nagumo (1993), onde os autores avaliaram o efeito de alginatos na atividade quimiotóxica de macrófagos, não se observou atividade estimulatória nos alginatos com alto conteúdo de blocos MM, enquanto que os alginatos com alto teor de blocos GG diminuíram esta atividade. Os autores sugerem que o elevado conteúdo de blocos GG em um alginato levaria a uma depressão da quimiotaxia dos macrófagos e que esta atividade inibitória reduz a atividade antitumoral.

Os alginatos estudados no presente trabalho diferem relativamente pouco tanto no conteúdo de ácido manurônico quanto na freqüência de blocos. Entretanto, a diferença observada na atividade antitumoral pode estar relacionada a uma maior freqüência de blocos MM no alginato +V.

A análise histopatológica dos tumores retirados dos animais do grupo controle mostrou a presença de células pleomórficas, hipercromáticas, exibindo anisocariose e bi-nucleação, morfologia, esta, compatível com uma neoplasia maligna. Nesses animais também foram observadas áreas de necrose intratumoral e invasão muscular. No animais tratados com 5-FU ou com os alginatos -V e +V, foi observado um aumento das áreas de necrose. Esse aumento foi mais evidente nos animais tratados com a alginato +V, principalmente por via oral, o que corrobora os achados utilizando o peso dos tumores.

A proliferação celular nos tumores foi avaliada por imunohistoquímica -67 descrito por Gerdes *et al.* (1983). Esse antígeno é expresso durante a fase G1 do ciclo celular, podendo se apresentar em G2 e M (Falini *et al.*, 1989; Quinn & Wright, 1990). Houve uma diminuição significativa na marcação das células tumorais dos animais tratados com os alginatos -V e +V por ambas as vias de administração na concentração de 100 mg/m<sup>2</sup>. O efeito antiproliferativo do alginato +V foi maior que do alginato -V, o que também corrobora os achados utilizando o peso dos tumores.

Desta maneira, a partir desses resultados fica demonstrado que ambos os alginatos -V e +V isolados de *S. vulgare* apresentam atividade antitumoral no modelo experimental do sarcoma 180 levando a uma diminuição do peso tumoral associada a uma diminuição da proliferação das células tumorais e a um aumento das áreas de necrose. Essa atividade foi maior quando o tratamento foi realizado com o alginato de maior viscosidade e utilizando a via oral de administração. Vale ressaltar, ainda, que nenhum dos compostos analisados apresentou atividade citotóxica direta, como evidenciado pela ausência de atividade nos modelos *in vitro*, o que sugere que a atividade antitumoral dos alginatos seja mediada pelo hospedeiro.

Um dos grandes problemas enfrentados pela indústria farmacêutica que frustram o desenvolvimento de novos fármacos é a toxicidade da molécula. Um mpostos químicos com potencial citotóxico específico para células tumorais apresentam toxicidade também para células não neoplásicas. Muitas drogas anti-câncer possuem consideráveis efeitos colaterais e portanto com limitado uso clínico (Ooi & Liu, 2000).

A toxicidade gerada pelo tratamento com os alginatos -V e +V foi, inicialmente, avaliada através da análise histopatológica de órgãos-alvo, como fígado, rim e baço, e comparada ao efeito do 5-FU, um quimioterápico que apresenta efeitos colaterais bastante relevantes na clínica.

Quanto à alteração do peso dos órgãos avaliados (fígado, rim e baço), verificou-se que ambos os alginatos se comportam de maneira semelhante. Os alginatos -V e +V aumentaram o peso do fígado, rim e baço no tratamento por via intraperitoneal na concentração de 50 mg/m<sup>2</sup>. Já o tratamento por via oral na concentração de 100 mg/m<sup>2</sup> com o alginato +V e o 5-FU ocasionaram uma diminuição no peso dos órgãos avaliados em relação ao controle.

A análise histopatológica dos rins dos animais tratados com os alginatos -V e +V mostrou graus variados de degeneração hidrópica e vacuolização do epitélio tubular proximal, além de hemorragia glomerular e tubular, porém preservação da estrutura glomerular. Essas alterações foram observadas independentes dos alginatos e da via de administração. Além disso, nos rins dos

ção renal pode ser restabelecida. Apesar do intenso dano celular, a regeneração depende da integridade dos tecidos intersticiais (Curran, 1990; Olsen & Solez, 1994). Nos rins dos animais tratados com o alginato –V observou-se a preservação do tecido intersticial, com ausência de edema ou infiltração de linfócitos, o que sugere a possibilidade de regeneração do dano.

Além dos efeitos renais observados, a análise histopatológica do fígado dos animais tratados sugere que este órgão também pode ser afetado pelo tratamento com os alginatos. Os efeitos observados incluem hiperplasia das células de Kupfer, congestão portal e centrolobular, focos inflamatórios, tumefação turva dos hepatócitos, hemorragia sinusoidal e áreas de esteatose em microgotas. Esses efeitos foram observados em todos os animais tratados, seja com os alginatos ou com o quimioterápico.

As drogas podem ser consideradas como possíveis causa de lesões encontradas em biópsia hepática. Um grande número de compostos químicos de diferentes classes e com variadas atividades farmacológicas levam a importante lesões hepáticas (Scheuer & Lefkowitz, 2000). Essas substâncias incluem agentes antituberculose, antiinflamatórios não-esteroidais, anestésicos, fitotérapicos, metotrexato e muitos outros (Rang & Dale, 1991; Scheuer & Lefkowitz, 2000; Kummar *et al.*, 2004). Apesar disso, o fígado possui uma grande capacidade adaptativa e regenerativa. Por exemplo, o aumento do retículo endoplasmático produzido pelo tratamento crônico com

V

durante os tempos 90 e 120 minutos. O alginato -V também aumentou o ritmo de filtração glomerular nos tempos 90 e 120, enquanto o alginato +V apresentou

V diminuiu o transporte dos íons cloreto durante os tempos 60, 90 e 120 minutos, enquanto o alginato +V foi ativo somente no tempo de 120 minutos. O alginato -V aumentou intensamente a excreção dos íons sódio, potássio e cloreto ao longo dos tempos 60, 90 e 120 minutos, porém o alginato +V aumentou significativamente a excreção dos íons sódio e cloreto no tempo de 90 minutos. De acordo com os parâmetros analisados, pode-se afirmar que o alginato -V possui uma maior nefrotoxicidade em relação ao alginato +V, corroborando os achados

Martins *et al.* (2003) demonstraram que os componentes do sobrenadante de macrófagos ativados pelo veneno da *Crotalus durissus cascavella* possuem efeitos nefrotóxicos *in vitro*, tais como aumento da pressão de perfusão, taxa de filtração glomerular, fluxo urinário e diminuição do transporte tubular e proximal de sódio. Dentre os componentes com atividade nefrotóxica liberado a partir de macrófagos destaca-se os efeitos promovidos pela fosfolipase A<sub>2</sub> e ciclooxigenase, estas sintetizam mediadores inflamatórios originados do ácido araquidônico, bem como a liberação de citocinas principalmente o TNF- $\alpha$ . Barbosa *et al.* (2005) demonstraram que as frações miotóxicas I e II (Lys49 PLA<sub>2</sub> e Asp49 PLA<sub>2</sub> respectivamente) isoladas do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* promovem um aumento da pressão de perfusão, resistência vascular renal, fluxo urinário e da taxa glomerular. Ao contrário, diminui o transporte tubular de sódio e potássio. A indometacina reverteu os efeitos tubulares, vasculares e glomerulares promovida pela miotoxina I, e parcialmente bloqueou os efeitos da miotoxina II.

No momento, não podemos afirmar se os alginatos -V e +V possuem um efeito direto no glomérulo, porém uma lesão do tecido glomerular pode resultar em um aumento na taxa de filtração levando a um posterior aumento do

V. Este maior efeito imunomodulador do alginato +V pode estar relacionado com a maior eficácia deste composto no que diz respeito a atividade antitumoral. Vários estudos têm reportado que o ácido manurônico, presente em maior quantidade no alginato +V, estimula a resposta imune humoral e celular.

Este estudo confirma com os achados reportados por Torres (2003), onde os alginatos -V e +V de *S. vulgare* potencializaram a síntese de anticorpos totais em camundongos imunizados contra a proteína ovalbumina, no entanto, ambos os alginatos não proveram a síntese de anticorpos específicos, ou seja, não apresentaram imunogenicidade. Em modelos experimentais murino de V e +V de *S. vulgare* aumentaram a migração de

células envolvidas no processo da resposta inflamatória aguda, tais como neutrófilos e macrófagos. Desta maneira, suas propriedades antigênicas podem intermediar as respostas imunes inata e adaptativa, estimular a fagocitose, aumentar a liberação de citocinas, ativar a produção de leucotrienos, bem como potencializar a produção de anticorpos.

Em vários estudos utilizando animais experimentais, demonstrou-se que extratos de algas marinhas apresentam compostos biologicamente ativos envolvidos com a resposta imune das células B e macrófagos (Yoshizawa *et al.*, 1993; Okai, *et al.* 1997, Liu, *et al.*, 1997). Shan em 1999 demonstrou que extratos de algas marinhas estimulam a proliferação *in vitro* de linfócitos T do sangue periférico, aumentam a atividade dos linfócitos T citotóxicos contra células tumorais e a produção de imunoglobulinas pelas células B, bem como estimulam a liberação de TNF a partir de monócitos humanos e murinos. O fracionamento realizado posteriormente demonstrou que os compostos bioativos não eram de natureza protéica, mas que polissacarídeos estavam relacionados com a potencialização da resposta imunológica. Os alginatos também *in vitro* em monócitos peritoneais murino, revelado pelo aumento na produção de TNF, NO e expressão dos receptores CD80 e CD86, bem como promovem o processo de fagocitose. Devido sua propriedade pró-inflamatória, os alginatos possuem relevantes ações adjuvantes a fim de potencializar a estimulação antigênica no processo de vacinação (Pasquali *et al.*, 2005).

Por outro lado, muitos quimioterápicos, inclusive o 5-Fluorouracil, são imunossupressores e possuem muitos efeitos colaterais (Takiguchi *et al.*, 2001). No presente estudo, demonstrou-se que o tratamento com o 5-FU nas concentrações de 25 e 15 mg/m<sup>2</sup> promovem hipoplasia da polpa branca do baço, com expressiva diminuição dos megacariócitos e de agregados linfóides.

Muitos investigadores têm sugerido que diversos polissacarídeos de xicidade diretamente em células cancerígenas, mas produzem efeitos anticâncer a partir da ativação do sistema imune. Isto tem

-tratamento com agentes anti-macrófagos. Borchers *et al.*, 1999, demonstraram que vários efeitos dos polissacarídeos são devido a potencialização das células T e macrófagos após o reconhecimento específico

*et al.* (2004) reportaram que o polissacarídeo purificado da espécie fungica *Antrodia camphorata* (AC-PS) inibe o crescimento do tumor Sarcoma 180 *in vivo* quando administrado por via oral e intraperitoneal, no entanto não inibe o crescimento *in vitro* de células tumorais U937. Este trabalho também demonstrou que camundongos tratados com AC-PS exibiram uma alta proliferação de células esplênicas após 30 dias de tratamento. Shimizu *et al.* (2005) demonstraram que o polissacarídeo sulfatado de alto peso molecular da *Okinawa mozuku* aumenta o número de células T citotóxicas do baço de camundongos BALB/c, bem como a taxa de células CD 11b, antígeno de superfície das células Natural killer (NK) presente também em monócitos e macrófagos. Foi demonstrado que alginatos com alto teor de ácido manurônico (M) ativa as células (NK) murinas, funcionando como imunomodulador *in vivo* (Son *et al.*, 2005).

A peritoneo consiste de uma cavidade onde residem células do sistema de defesa contra microorganismos potencialmente patogênicos. Dentre os mais importantes, os macrófagos participam no desenvolvimento das respostas imunes específica como células apresentadoras de antígenos (APC) e células acessórias para os linfócitos. Os macrófagos também fazem parte do sistema imune inato, e, portanto, possuem um importante papel na defesa contra inúmeros microorganismos e tumores. Quando ativados, os macrófagos aumentam sua atividade fagocitária e liberam vários mediadores principalmente citocinas como interleucinas (IL), interferon (IFN), fator de necrose tumoral (TNF); espécies reativas do oxigênio, prostaglandinas e óxido nítrico (Son *et al.*, 2001). Agentes imunomodulatórios como o polímero divinil ester-co-maleico



-se que os alginatos estimulam a migração e ati macrófagos, que liberam vários mediadores citotóxico principalmente TNF-á, NO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Estes fatores conseqüentemente estão envolvidos com a atividade antitumoral dos alginatos.

Medzhitov & Janaway (2000) têm proposto que as células do sistema imune inato expressam receptores que discriminam entre antígenos próprios e estranhos por reconhecimento de moléculas preservadas presentes nos patógenos, denominados de PAMPS. Os receptores *Toll like* constituem uma família de proteínas que apresentam um domínio extracelular com regiões repetidas ricas em leucinas e uma região intracitoplasmática contendo um

domínio homólogo ao receptor da IL-1, as quais estão envolvidas com a resposta imune inata inicial contra patógenos. Flo *et al.* (2002) demonstraram que polímeros de ácidos manurônicos estimulam a liberação de citocinas, tais como TNF e IL-6, através da ativação dos receptores *Toll like* (TLR) 2 e 4 em células mononucleares do sangue periférico. Desta forma, os alginatos com alto teor de M são relevantes no tratamento do câncer devido as suas propriedades imunomoduladoras.

Embora a via oral seja tolerante a muitas substâncias estranhas para manter a homeostase fisiológica, a resposta imune humoral e celular é bastante desenvolvida nas regiões bucal e intestinal. Maeda & Kimura (2004) demonstraram que quitosanas, polímero formado por unidades de glicosamino, de baixo peso molecular e administradas por via oral possuem atividade antitumoral no modelo experimental do Sarcoma 180, no entanto, este efeito não foi visto em quitosanas de alto peso molecular. Neste estudo, verificou-se que a atividade citotóxica das quitosanas contra as células tumorais foi desenvolvida por fatores imunomoduladores através dos linfócitos intraepiteliais intestinais, com a participação de células natural killer, m -ã, IL-12 e IL-18.

De acordo com a análise histopatológica, o tratamento com os ambos os alginatos por via oral levou ao aumento da polpa branca do baço, indicando aumento no número de megacariócitos. Este efeito imunomodulador sugere que os alginatos -V e +V estimulam a resposta imune por via oral, embora neste estudo os mecanismos não tenham sido elucidados.

A quimioterapia tem sido uma das principais modalidades terapêuticas usada para o tratamento de pacientes com diversos tipos de câncer. Contudo, em muitos casos, somente a quimioterapia não resulta no sucesso terapêutico, onde não há uma remissão completa dos tumores nem prevenção de metástases, além de induzir muitos efeitos adversos em doses terapêuticamente efetivas (Han *et al.*, 1999). Entretanto, a descoberta e identificação de novas drogas, sem muitos efeitos colaterais, bem como a associação de várias formas

citocinas e anticorpos monoclonais, bem como a associação destes com drogas utilizadas na quimioterapia podem ser excelentes adjuvantes no tratamento do câncer, bem como diminuir os efeitos tóxicos causados pela quimioterapia.

Desta maneira, os alginatos foram testados em associação com o 5-FU. Para a realização desses experimentos, foram utilizadas concentrações menores tanto dos alginatos + V e V (25mg/m<sup>2</sup>), bem como de 5-FU (15 mg/m<sup>2</sup>), na tentativa de reduzir a toxicidade apresentada por esses compostos, porém mantendo ou potencializando a atividade. A administração dos alginatos foi feita por via oral, uma vez que essa via mostrou-se mais eficaz.

A associação do 5-FU (15 mg/m<sup>2</sup>) com o alginato +V (25 mg/m<sup>2</sup>) levou a uma inibição do crescimento tumoral de 76,2%, semelhante ao observado quando o alginato +V foi administrado na concentração de 100 mg/m<sup>2</sup>. Já a associação do quimioterápico com o alginato V, causou a mesma inibição ou menor que quando os compostos foram administrados isoladamente. Esses resultados indicam que a associação mostrou-se uma estratégia terapêutica eficiente apenas para o alginato +V.

Com relação aos efeitos tóxicos, não foram observadas alterações nos pesos dos órgãos utilizando a concentração 2 para os alginatos e 15 mg/m<sup>2</sup> para o 5-FU, nem nos grupos associados, ao contrário das concentrações maiores, o que sugere uma redução de toxicidade quando os compostos foram administrados em doses menores mesmo associados. A análise histopatológica do rim revelou que os animais tratados com a associação dos alginatos V e +V com o 5-FU apresentaram sinais de toxicidade renal, revelada pela presença de

tumefação turva e vacuolização do epitélio tubular, porém estas alterações foram mais leves do que quando os compostos foram administrados isoladamente em concentrações maiores. Com relação aos efeitos hepáticos, também houve diminuição da toxicidade, com redução dos focos de esteatose em microgotas. Já a proliferação da polpa branca, não foi visualizada na concentração de 25mg/m<sup>2</sup> de ambos os alginatos.

Como outra forma de avaliar a toxicidade desses compostos administrados na concentração de 25mg/m<sup>2</sup>, associados ou não ao 5-FU, foi realizada a análise de parâmetros hematológicos e bioquímicos dos animais tratados.

A análise bioquímica dos grupos tratados como os alginatos V e +V por via oral e 5-FU nas concentrações de 25 e 15 mg/m<sup>2</sup>, respectivamente, bem como a associação de ambos os tratamentos não apresentaram efeitos tóxicos velado pelos níveis séricos de uréia e creatinina. Os alginatos V e +V na concentração de 25 mg/m<sup>2</sup> administrados por via oral não apresentam alterações significativas das enzimas ATS em relação ao controle. O tratamento associado dos alginatos – V e +V na concentração de 25 mg/m<sup>2</sup> ao 5-FU na concentração de 15 mg/m<sup>2</sup>, bem como o 5-FU administrado isoladamente causaram toxicidade hepática revelada por aumento da atividade das enzimas aspartato amino trasaminases (ATS), no entanto, não houve cativas entre os tratamentos. Portanto, a toxicidade hepática promovida pelo tratamento com o 5-FU na concentração de 15 mg/m<sup>2</sup> não foi potencializada com a administração dos alginatos V e +V na concentração de 25 mg/m<sup>2</sup> por via oral. Os animais transplantados com o Sarcoma 180 e tratados com salina (grupo tumor) não apresentaram diferenças significativas em relação aos animais sem tumor e não tratados (grupo normal).

Geralmente, os compostos com atividade anticâncer apresentam diversos efeitos, tais como hepatotoxicidade e nefrotoxicidade. O composto â tetimustine, potencialmente antitumoral para o carcinoma ascítico de Ehrlich, Sarcoma 180 e Linfoma de Dalton, promove um aumento da atividade das

enzimas hepáticas glutamina oxilacetato transaminases e glutamina piruvato transaminases, bem como aumenta o nível sérico de uréia nitrogenada após 9 dias de tratamento em camundongos inoculados com o tumor de Ehrlich. Neste estudo foi demonstrado que os animais inoculados com o tumor de Ehrlich e não tratados apresentaram aumento da atividade da enzima hepática glutamina oxilacetato transaminase após 9 dias e aumento do nível de uréia após 21 dias (Grosh *et al.*, 1999).

De acordo com a análise hematológica, os animais transplantados com o Sarcoma 180 e tratados com os alginatos -V e +V por via oral na concentração de 25 mg/m<sup>2</sup>, bem como o grupo não tratado não apresentaram alterações do número de leucócitos totais, porém houve uma diminuição significativa do número de linfócitos em relação ao grupo de animais sem tumor e não tratados (controle normal). O tratamento somente com o 5-FU na concentração de 15 mg/m<sup>2</sup> causou uma intensa depressão do sistema imunológico, revelado pelo quadro de leucocitopenia e linfocitopenia. No entanto, o tratamento associado do 5-FU aos alginatos -V e +V na concentração de 25 mg/m<sup>2</sup> apresentou um aumento do número dos leucócitos totais e linfócitos em relação ao grupo administrado somente com o 5-FU na concentração de 15 mg/m<sup>2</sup>. Sendo assim, os alginatos -V e +V administrados na concentração de 25 mg/m<sup>2</sup> por via oral foram capazes de prevenir o quadro de leucocitopenia e linfocitopenia apresentado nos animais tratados com o 5-FU na concentração de 15 mg/m<sup>2</sup>. Logo, pode ser sugerido que os alginatos -V e +V de *S. vulgare* possuam propriedades imunoestimulatórias, mesmo na concentração de 25 mg/m<sup>2</sup>.

Zhou *et al.*, em 2004, demonstraram que a ð-carragenina, galactana sulfatada isolada da alga marinha vermelha *Chondrus ocellatus*, possui atividades antitumoral e imunomoduladora *in vivo* contra o tumor Sarcoma 180 e H22. Recentemente, este grupo demonstrou que a ð-carragenina de baixo peso molecular ativa linfócitos *in vitro*, e que o 5-FU diminui significativamente a proliferação de linfócitos *in vivo* em relação ao controle. Os animais



## 7. Conclusão

Este trabalho nos permite concluir que os alginatos -V e +V administrados por via oral e intraperitoneal foram capazes de inibir o crescimento tumoral em camundongos transplantados com o Sarcoma 180, sendo a via oral mais eficaz. A ausência de efeito nos ensaios *in vitro* revelou que a atividade antitumoral dos alginatos -V e +V deve estar ligada a mecanismos indiretos, dependentes do hospedeiro. Baseado em outros trabalhos de polissacarídeos, e em estudos prévios com esses compostos, bem como na análise histopatológica do baço, verificou-se que os alginatos -V e +V possuem propriedades imunomoduladoras que podem ser relevantes para a sua atividade anticâncer *in vivo*. Observamos, ainda, no presente estudo que o efeito antitumoral do alginato +V é potencialmente maior em relação ao alginato -V, porém os efeitos toxicológicos foram mais evidentes por parte do alginato -V. Estas diferenças entre os alginatos podem estar relacionadas com a viscosidade e/ou os grupamentos de ácido manurônico e gulurônico. Além disso, a associação do alginato +V com o 5-FU mostrou ser uma interessante estratégia terapêutica para redução da toxicidade dos compostos, mantendo a eficácia antitumoral do tratamento.

## 8. Referências Bibliográfica

- Abdulla, M. and Gruber, P. 2000. Role of diet modification in cancer prevention. **Biofactors**. Vol. 12, p. 45-51.
- Adam, K. J.; Odhav, B. and Bhoola, D. K. 2003. Immune response in cancer. **Pharmacology & Therapeutics**. Vol. 99, p. 113-132.
- Albertus J. Smit. 2004. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review. *Journal of Applied Phycology*. Vol. 16, p. 245-262.
- Ballow, M and Nelson, R. 1997. Immunopharmacology: immunomodulation and immunotherapy. **JAMA**. Vol. 278, p. 2008-2017.
- Banks, W. J. 1992. Histologia veterinária aplicada. **Editora Manole Ltda, Brasil**, p. 376-381.
- Barbier, P.; Guise, S.; Huitorel, P.; Amade, P.; Pesando, D.; Briand, C. and Peyrot, V. 2001. Caulerpenyne from *Caulerpa taxifolia* has antiproliferative activity on tumor cell line SK-N-SH and modifies the microtubule network. **Life Science**. Vol. 70, p. 415-429.
- Barbosa, P.; Martins, A.; Havt, A.; Toyama, D.; Evangelista, J, Ferreira, D.; Joazeiro, P.; Beriam, L.; Toyama, M.; Fonteles, M. and Monteiro, H. 2005. Renal and antibacterial effects induced by myotoxin I e II isolated from *Botrops jararacussu* venom. **Toxicon**. Vol. 46, p. 376-386.
- Blunden, G. 1993. Marine algae as sources of biologically active compounds. **Interdiscipl. Sci. Rev.** Vol. 18, p. 73-80.
- Bold, H. C. 1988. O reino vegetal. Edgard Blucher, São Paulo, p.189
- Bowersock, H.; HogenEsch, H.; Park, H. and Park, K. 1994. Uptake of alginate microspheres by the peyer's patches. **Proc. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater., Control. Rel. Soc.** Vol. 21, p. 839-840.



- Bowersock, T. H.; HogenEsch, H.; Park, H. and Parck, K. 1994. Uptake of alginate microspheres by the Peyer's patches. **Proc. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. , Control. Rel. Soc.** Vol. 21, p. 839-840.
- Bowman, R.H.; Maack, T. 1974. Glucose transport by the isolated perfused rat kidney. **Am. J. Physiol.** Vol. 222, p. 1499-1504.
- Bremers, A. J. A. and Parmiani, G. 2000. Immunology and immunotherapy of human cancer: present concepts and clinical developments. **Critical Reviews in Oncology/Hematology.** Vol. 34, p. 1-25.
- Butler & Dawson. 1992. Cell culture. Blackwell, **Scientific Publications.**
- Calumpong, P. H; Maypa, P. A; Magbanua, M. 1999. Population and alginate yield and quality assessment of four Sargassum species in Negros Island, central Philippines. **Hydrobiologia.** Vol. 398/399, p. 211-215.
- Cao, Q-Z and Lin, Z-B. 2004. Antitumor and anti-angiogenic activity of Ganoderma lucidum polysaccharide peptide. **Acta Pharmacol Sin.** Vol. 25, p. 833-838.
- Carte, B. K. 1996. Biomedical potential of marine natural products. **Bioscience.** Vol. 46, p. 271-286.
- Chang Raymond. 2002. Bioactive Polysaccharide from Tradicional Chinese Medicine Herbs as Anticancer Adjuvants. **The Journal of alternative and complementary medicine.** Vol. 8, p. 559-565.
- Chihara, G. 1992. Biochemistral studies of effect of mushrooms and isolated polysaccharide on tumors transplanted in mice. **2 International Conference of the Federation of African Society of Biochemists and Molecular Biologists.** Potshfostroom, South Africa.
- Chihara, G.; Hamuro, J.; Meada. Y.; Arai, Y. and Fukuoka, F. 1970. Fractionation and purification of polysaccharide with marked antitumoral activity, especially Lentinan from Lentinus edodes (Bark) sing, an edible mushroom. **Cancer Res.** Vol. 30, p. 2776-2781.

- Choy, Y.; Leung, K.; Cho, C.; Wong, K.; Pank, K. 1994. Immunopharmacological studies of low molecular weight polysaccharide from *Angelica sinensis*. **Am. J. Chin. Med.** Vol. 22, p. 137-145.
- Cleary, A.; Kelly, G. E.; Husband, A. J. 1999. The effect of molecular weight and beta 1,6 linkages on priming of macrophage function in mice by (1,3)- beta-D-glucan. **Immunol. Cell Biol.** Vol. 77, p. 395-403.
- Coelho, H. E. 2002. Patologia Veterinária. Editora Manole Ltda, Brasil, p. 185-189.
- Costa-Lotufo, L.; Cunha, A.; Farias, M.; Viana, B.; Cunha, K.; Pessoa, C.; Moares, M.; Silveira, R.; Gramosa, N. 2002 and Rao, N. 2000. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. **Toxicon.** Vol. 40, p. 1231-1234.
- Curran, R. C. 1990. Colon atlas of histopathology, 3<sup>th</sup> ed. **Oxford University Press**, New York.
- Daba, A. S. and Ezeronye, O. U. 2003. Anti-cancer effect of polysaccharide isolated from higher basidiomycetes mushrooms. **African Journal of Biotechnology.** Vol. 2, p. 672-678.
- Daigo, K.; Wada, Y.; Yamada, C.; Okuda, S.; Okada, M. and Miyazato, T. 1981. Pharmacological studies of sodium alginate. I: Protective effects of sodium alginate on mucous membranes of upper-gastrointestinal tract. **Yakugaku Zasshi** (in Japanese). Vol. 101, p. 452-457.
- Daigo, K.; Yamada, C.; Wada, Y., Yamaji, M.; Okuda, S.; Okada, M. and Miyazato, T. 1981b. Pharmacological studies of sodium alginates. II. Hemostatic effects of sodium alginate on gastrointestinal bleeding. **Yakugaku Zasshi** [in Japanese]. Vol. 101, p. 458-463.
- Damonte, E. B.; Neyts, J.; Pujol, C. A.; Snoeck, R.; Andrei, G.; Ikeda, S.; Witvrouw, M.; Reymen, D.; Haines, H.; Matulewic, M. C.; Ceezo, A.; Coto, C.E. and De Clercq, E. 1994. Antiviral activity of a sulfated polysaccharide

- from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*. **Biochem. Pharmacol.** Vol. 47, p. 2187-2192.
- Damonte, E.; Neyts, J.; Pujol, C.; Snoeck, R.; Andei, G.; Ikeda, S.; Witvrouw, M.; Reymen, D.; Haines, H.; Matulewicz, M.; Cerezo, A.; Coto, C.; De Clercq, E. 1994. Antiviral activity of a sulfated polysaccharide from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*. **Biochem. Pharmacol.** Vol. 47, p. 2187-2192.
- David G. I. Kingston. 1996. Natural Products as Pharmaceuticals and Sources for Lead Structures. **The Practical of Medicinal Chemistry**, Academic Press Limited.
- Dermine, S.; Armstrong, A.; Hawkins, R. E. and Stern, P. L. 2002. Cancer vaccines and immunotherapy. **Br. Med. Bull.** Vol. 62, p. 149-162.
- Donald Renn. 1997. Biotechnology and the red seaweed polysaccharide industry: status, needs and prospects. **Tibtech.** Vol. 15
- Donia, M. and Hamann, M. T. 2003. Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. **The Lancet.** Vol. 3, p. 338-348.
- Dunn, P. G.; Old, J. L. and Schreiber, D. R. 2004. The Three Es of Cancer Immunoeediting. **Annual Reviews Immunology.** Vol. 22, p. 329-360.
- Ehrke, J. 2003. Immunomodulation in cancer therapeutics. **International Immunopharmacology**, vol. 3, p. 1105-1119.
- Espinosa, E.; Zamora, P.; Feliu, J. and Baron G. 2003. Classification of anticancer drugs- a new system based on therapeutic targets. **Cancer Treatment Reviews.** Vol. 29, p. 515-523.
- Falini, B.; Flenghi, L.; Fagioli, M.; Stein, H.; Schwarting, R.; Riccardi, C.; Manocchio, I.; Pileri, S.; Pelicci, P. and Lanfranccone, L. 1989. Evolutionary conservation in various mammalian species of the human proliferation-associated epitope recognized by the Ki-67 monoclonal antibody. **J. Biologic. Chem.** Vol. 269, p. 30533-30560.
- Flo, H. T.; Ryan, L.; Latz, E.; Takeuchi, O.; Monks, G. B.; Lien, E.; Halaas, Ø.; Akira, S.; Skjak-Braek, G.; Golenbocks, T. D. and Espevik, T. 2002.

- Involvement of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in cell activation by Mannuronic Acid Polymers. **The Journal of Biological Chemistry**. Vol. 227, p. 35489-35495.
- Fonteles, M.; Cohen, J. J.; Black, A. J.; Wertheim, S. J. 1983. Support of renal kidney function by long-chain fatty acids derived from renal tissue. *Am. J. Physiol.* Vol. 244, p. 235-246.
- Fonteles, M. and Jeske, A. 1980. Vasoactivity and vascular escape in isolated perfused kidneys from normotensive versus spontaneously hypertensive rats. **Gen. Pharmacol.** Vol. 11, p. 292-296.
- Fujihara, M. and Nagumo, T. 1992. The effect of the content of D-mannuronic acid and L-guluronic acid blocks in alginates on antitumor activity. **Carbohydrate Research**. Vol. 224, p. 343-347.
- Fujihara, M. and Nagumo, T. 1993. An influence of the structure of alginate on the chemotactic activity of macrophages and the antitumor activity. **Carbohydrate Research**. Vol. 243, p. 211-216.
- Fujihara, M.; Iijima, N.; Yamamoto, I. and Nagumo, T. 1984. Purification and chemical and physical characterisation of an antitumour polysaccharide from the brown seaweed *Sargassum fulvellum*. **Carbohydrate Research**. Vol. 125, p. 97-106.
- Fujii, T.; Sugita, N.; Kobayashi, Y.; Saito, K.; Iijima, H.; Matsunaga, K.; Ando, T.; Oguchi, Y.; Morita, I.; Yoshikumi, C. and Nomoto, K. 1989. Treatment with krestin combined with mitomycin c, and effect on immune response. **Oncology**. Vol. 46, p. 49-53.
- Furue, H. and Kitoh, I. 1981. Phase 111-study on lentinan. **Japanese J. Cancer Chemotherapy**. Vol. 8, p. 944-960.
- Gan, L.; Zhang, H. S.; Yang, L. X. and Xu, B. H. 2004. Immunomodulation and antitumor activity by a polysaccharide-protein complex from *Lycium barbarum*. **International Immunopharmacology**. Vol. 4, p.563-569.

- Gebbia, V. and Puozzo C. 2005. Oral versus intravenous vinorelbine: clinical safety profile. **Expert Opin Drug Saf.** Vol. 4, p. 915-928.
- Gerdes, J.; Schwab, U.; Lemke, H.; Stein, H. 1983. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. **Int. J. Cancer.** Vol. 31, p. 13-20.
- Gombotz, W. R; Chandy, T. and Wee, S.F. 1998. Protein release from alginate matrices. **Adv. Drug Del. Rev.** Vol. 31, p. 267-285.
- Gonda, R.; Tomoda, M.; Kanari, M.; Shimizu, N, and Yamada, H. 1990. Constituents of the seed of *Malva verticillata*. VI. Characterization and immunological activities of a novel acidic polysaccharide. **Chem Pharm. Bull (Tokyo).** Vol. 38, p. 2771-2774.
- Grosh, M.; Sadhu, U.; Bhattacharya, S.; Dutta, S.; Bhattacharya, B. and Sanyal, U. 1999. Evaluation of toxicity of  $\beta$ -tethymustine, a new anticancer compound, in mice. **Cancer Letters.** Vol. 138, p. 107-114.
- Hamann, T. and Scheuer, J. 1993. Kahalalide F: A bioactive depsipeptide from the sacoglossan mollusk, *Elysia rufescens* and the Green alga *Bryopsis* sp. **J. Am. Chem. Soc.** Vol. 115, p. 5825-5826.
- Hamilton, R. L.; Benny, N. M.; Williams, M. C.; Severinghaus, E. M. 1974. A simple and inexpensive membrane "lung" for small organ perfusion. **J. Lipid. Res.** Vol. 15, p. 182-186.
- Hammann, M. T.; Otto, C. S.; Scheuer P. J. and Dunbar, D. C. 1996. Kahalalides: Bioactive peptides from a marine mollusk *Elysia rufescens* and its algal diet *Bryopsis* sp. **J. Org. Chem.** Vol. 61, p. 6594-6600.
- Han, B. S.; Lee, W. C.; Jeon, J.Y.; Hong, D. N; Yoo, D. I.; Yang, K-H. and Kim, M. H. 1999. The inhibition effect of polysaccharide isolated from *Phellinus linteus* on tumor growth and metastasis. **Immunopharmacology.** Vol. 41, p. 157-164.

- Harada, H.; Yamashita, U.; Kurihara, H, et. Al. 2002. Antitumor activity of palmitic acid found as a selective cytotoxic substance in a marine red alga. **Anticancer Res.** Vol. 22, p. 2587-2590.
- Hardman, G. and Limbird, L. 1996. The pharmacological basis of therapeutics. 9<sup>th</sup> ed. **International Edition.**
- Harvey, A. 2000. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drugs Discover Today.** Vol. 5, p. 294-300.
- Haug, A. and Larsen, B. 1971. Biosynthesis of alginate. Part I: Composition and structure of alginate produced by *Azotobacter vinelandii* (Lipman). **Carbohydrate Research.** Vol. 17, p. 281.
- Hongen, F. D. delos Santos, D. B.; Gotees, G.; Sakamoto, B.; Kan, Y.; Nagai, H. and Scheuer, P. J. 2000. A new depsipeptide from the sacoglossan mollusk *Elysia ornate* and the green alga *Bryopsis* species. **J. Nat. Prod.** Vol. 63, p. 152-154.
- Hoshino, T.; Uchina, A.; Iho, S.; Kura, F. and Takahashi, T. 1986. Immunopharmacological aspects of OK-432 in the treatment of malignant disease with a special reference to an induction of autologous tumor killing activity. In: G. Kelen and Uchina, A. (Eds). **Univ. of Tokyo Press**, Japan, p. 5-15.
- Ichimura, O.; Suzuki, S.; Satio, M.; Sugawara, Y. and Ishida, N. 1986. Augmentation of interleukin 1 and interleukin 2 production by OK-432. **Inter. J. Immunopharmac.** Vol. 7, p. 263-270.
- Inagaki, N.; Komatsu, Y.; Sasaki, H.; Kiyohara, H.; Yamada, H.; Ishibashi, H.; Tansho, S.; Yamaguchi, H. and Abe, S. 2001. Acidic polysaccharides from rhizomes of *Atractylodes lancea* as protective principle in *Candida*-infected mice. **Planta Medica.** Vol. 67, p. 482-431.
- Ireland C. M.; Copp, B. R.; Foster, M. P.; McDonald, L. A; Radisky, D. C.; Swersey, J. C. 1993. Biomedical potential of marine natural products. In

- Attaway DH, Zaborsky OR (eds). **Marine Biotechnology**. Vol. 1, Pharmaceuticals and Bioactive Natural Products, Plenum Press, NY, p. 1-43.
- Itoh, H.; Noda, H.; Amano, H. and Ito, H.1995. Immunological Analysis of Inhibition of Lung Metástases by Fucoidan (GIV-A) prepared from Brown Seaweed *Sargassum thunbergii*. **Anticancer Research- International Journal of Cancer Research and Treatment**. Vol. 15, p. 1937-1945.
- Jha, K. R. and Zi-rong, X. 2004. Biomedical Compounds from Marine organisms. **Marine Drugs**. Vol. 2, p. 123-146.
- Junginger, H. E. 1991. Mucoadhesive hydrogels. **Pharm. Ind.** Vol. 53, p. 1056-1065.
- Katsuta, S.; Kaneko, Y.; Tsutsui, K.; Tamaki, S.; Iyata, H.; Chen, D. R.; Susuki, S.; Natsuume-Sakai, S and Yamamoto, A. 1989. Interleukin-1 inducing activity of a streptococcal preparation OK-432 and its fractions by human monocytes. **J. Clin. Lab. Immunol.** Vol. 28, p. 129-136.
- Kawakubo, A.; Makino, H.; Ohnishi, J-I, Hirohara, H. Hori K.1997. The marine red alga *Eucheuma serra* J. Agardh, a high yielding source of two isolectins. **J. Appl. Phycol.** Vol. 9, p. 331-338.
- Kawata, A.; Une, Y.; Hosokawa, M.; Wakizaka, Y.; Namieno, T. and Uchino, J. 1995. Adjuvant chemoimmunotherapy for hepatocellular carcinoma patients. Adriamycin, interleukin-2, and lymphokine-activated killers cells versus Adrimycin alone. **Am. J. Clin. Oncol.** Vol. 18, p. 257-262.
- Kim, K.; Kim, W.; Hong, S.; Shin, H.; Chon, Y.; Kim, K. and Yang, C. 2000. Antitumor, genotoxicity and anticlastogenic activities of polysaccharide from *Curcuma zedoaria*. **Mol. Cells**. Vol. 10, p. 392-398.
- Kimura, Y.; Watanabe, K. and Okuda, H. 1996. Effects of soluble alginate on cholesterol excretion and glucose tolerance in rats. **Journal of Ethnopharmacology**. Vol. 54, p. 47-54.

- Kinoshita, A.; Suzuki, I.; Sakurai, T and Yadomae, T. 1992. Oral administration of a streptococcal agent OK-432 activates alveolar macrophages in mice. **Int. J. Immunopharmac.** Vol. 14, p. 205-211.
- Klimp, H. A; Vries de E.G.E; Scherphof, L. G. and Daemen, T. 2002. **Critical Reviews in Oncology/Hematology.** Vol. 44, p. 143-161.
- Kolender, A. A.; Matulewicz, M. C and Cerezo, A. S. 1995. Structural analysis of -D-(1,3)-linked mannans. **Carbohyd. Res.** Vol. 273, p. 179-185.
- Krishna, V.; Fouant, M.; Bradley, S. 1989. Effects of pyran copolymer on host resistance of mice to Plasmodium yoelii. **Journal of Parasitology.** Vol. 75, p. 405-410.
- Kulcsar G. 1997. Theoretical and literary evidence for the existence of the passive antitumor defense system. **Cancer Biother. Radiopharm.** Vol. 12, p. 281-286.
- Kulcsar, G. 1997b. Theoretical and literary evidence for the existence of the passive antitumor defence system. **Cancer Biother. Radiopharm.** Vol. 121, p. 281-286.
- Kummar, V.; Abbas, A.; Fausto, N. 2004. Robbins & Cotran pathology basis of disease, 7th ed. WB Saunders, China.
- Lee, Y.; Chung, S.; Lee, R.; Kim, H.; Hong, S.; Yun, S. 1997. Activation of multiple effector pathways of immune system by the antineoplastic immunostimulator acidic polysaccharide ginsan isolated from *Panax ginseng*. **Anticancer Research.** Vol. 17, p. 323-331.
- Lehninger, A.; Nelson, D. and Cox, M. Princípios de Bioquímica. **Editores Sarvier**, Brasil, 2000.
- Lei, L. and Lin, Z. 1993. Effects of Ganoderma polysaccharides on the activity of DNA polymerase alpha of splenocytes and immune function in aged mice **Acta Pharmaceutical Sinica.** Vol 28, p. 577-582.



- Lincoln, R. A. Strupinski K. and Walter J. M. 1991. Bioactive compounds from algae. **Life Chem. Rep.** Vol. 8, p. 97-183.
- Liu, J.; Huang, S.; Hsu, L.; Chen, C.; Lin, W.; Lu, F. and Chang, W. 2004. Antitumor effects of the partially purified polysaccharide from *Antrodia camphorata* and the mechanism of its action. **Toxicology and Applied Pharmacology.**
- Liu, J.; Yoshida, Y.; Wang, M.; Okai, Y. and Yamashita, U. 1997. B cell stimulating activity of seaweed extracts. **International Journal of Immunopharmacology.** Vol. 19, p. 135-142.
- Liu, Y. ; Zhang, W.; Chan, T.; Saxena, A and Xiang, J. 2002. Engineered fusion hybrid vaccine of IL-4 gene-modified myeloma and relative mature dendritic cells enhances antitumor immunity. **Leuk. Res.** Vol. 26, p. 757-763.
- Lizima-Mizui, N.; Fujihara, M.; Himeno, J.; Komiyama, K. and Umezawa, J. 1985. Antitumor activity of polysaccharide fraction from the brown seaweed *Sargassum kjellmanianum*. **Kitasato Arch. Exp. Med.** Vol. 58, p. 59-71.
- Macedo, N.; Costa-Lotufo, L.; Wilke, D.; Bomfim, L.; Pessoa, C.; Moraes, M. and Ramos, M. 2005. Embryotoxic activity and differential binding of plant-derived carbohydrate-recognizing proteins towards the sea urchin embryo cells. **International Journal of Biological Macromolecules.** Vol. 36, p.90-97.
- Maeda, Y. and Kimura, Y. 2004. Antitumor effects of various Low-Molecular-Weight Chitosans are due to natural killer activity of intestinal intraepithelial lymphocytes in Sarcoma 180-bearing mice. **Nutrition and Cancer.** p. 945-950.
- Maede, Y.; Sakaizumi, M.; Moriwaki, K. and Yonekawa, H. 1991. Genetic control of the expression of two biological activities of an antitumor polysaccharide, Lentinan. **Inter. J. Immunopharmacol.** Vol. 13, p. 977.
- Martinez-Maldonado, M.; Monteiro, H. S. A.; Stawroulaki-Tsapara, A.; Tsapara, N.; Suki, W. N.; Eknoyan, G. 1978. Renal effects of lithium administration in rats: alteration in water and eletrolyte metabolism and the response to

vasopressin and cyclic-adenosine monophosphate during prolonged administration. **J. Lab. Clin. Med.** Vol. 80, p. 445-46.

Martins, A.; Lima, A.; Toyama, M.; Marangoni, S.; Fonteles, M. and Monteiro, H. 2002. Renal effects of supernatant from macrophages activated by *Crotalus durissus cacavella* venom: The role of phospholipase A2 and cyclooxygenase. **Pharmacology & Toxicology**. Vol. 92, p. 14-20

May, T.; Shinabarger, D.; Maharaj, R.; Kato, J.; Chu, L.; DeVault, D.; Roychoudhury, S.; Zielinski, A.; Berry, A. and Rothmel, K. 1991. Alginates synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*: a key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients. **Clin. Microbiol. Rev.** Vol. 4, p. 191-206.

Mayer, M. A. and Lehmann, B. V. 2000. Marine Pharmacology in 1998: Marine Compounds with Antibacterial, Anticoagulant, Antifungal, Antiinflammatory, Anthelmintic, Antiplatelet, Antiprotozoal, and Antiviral Activities; with actions on the Cardiovascular, Endocrine, Immune, and Nervous Systems; and other Miscellaneous Mechanism of Action. **Marine Pharmacology**. Vol. 42.

Mayer, S. A and Gustafson, R. K. 2004. Marine Pharmacology in 2001-2: antitumour and cytotoxic compounds. **European Journal of Cancer**.

McCarthy, P. J. and Pomponi, S. A. 2004. A search for new Pharmaceutical Drugs from marine organisms. **Marine Biomed. Res**, p. 1-2.

McDowell, R. H. 1977. **Properties of alginate**, 4<sup>th</sup> ed. London alginate Industries Ltd., London.

Medzhitov, R. and Janeway, C. Jr. 2000. The Toll receptor family and microbial recognition. **N. Engl. J. Med.** Vol. 343, p. 338-344.

Ministério da Saúde (2005). <http://www.inca.gov.br>.

Mitchell, S. M. 2003. Immunotherapy as part of combinations for the treatment of cancer. **International Immunopharmacology**. Vol. 3, p. 1051-1059.

- Mizuno, T. 1995. Bioactive biomolecules of mushrooms: food functions and medicinal effects of mushroom fungi. **Food Rev. Int.** Vol. 11, p. 7-21.
- Mocellin, S.; Rossi, R. C.; Pilati, P. and Nitti, D. 2005. Tumor necrosis factor, cancer and anticancer therapy. **Cytokine & Growth Reviews.** Vol. 16, p. 35-53.
- Moe, T. S.; Draget, I. K.; Skjak-Braek, G.; Smidsrød, O. 1995. Alginates
- Moretão, M.; Zampronio, R.; Gorin, P.; Iacomini, M. and Oliveira, M. 2004. Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages activated by an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco). **Immunology Letters.** Vol. 93, p. 189-197.
- Mosman, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods.** Vol. 16, p. 55 – 63.
- Mueller, A.; Raptis, J.; Rice, P. J.; Kalbfleisch, J.H.; Stout, R. D. Ensley, H. E.; Browder, W. and Williams, D. L. 2000. The influence of glucan polymer structure and solution conformations on binding to (1-3)-beta-D-glucan receptors in a human monocyte-like cell line. **Glycobiology.** Vol. 10, p. 339-346.
- Newman, J. D; Cragg, M. G and Snader, M. K. 2003. Natural Products as Sources of New Drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products.** Vol. 66, p. 1022-1037.
- Nishiitsutji-Uwo, G. M.; Ross, B. D.; Kerbs, H. A. 1967. Metabolic activities of the isolated perfused rat kidney. **Biochem. J.** Vol. 103, p. 852-862.
- Nobre, A.; Jorge, M.; Menezes, D.; Fonteles, M. and Monteiro, H. 1999. Effects of microcystin-LR in isolated perfused rat kidney. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** Vol. 32, p. 985-988.
- Okai, Y.; Okai, K.; Ishizaka, S and Yamashita, U. 1997. Enhancing effects of polysaccharides from an edible brown alga, *Hizikia fusiforme* (Hiziki), on

- release of tumor necrosis factor-  
nonresponder C3H/HeJ mice. **Nutrition and cancer**. Vol. 27, p. 74-79.
- Olsen, S., & Solez, K. 1994. Acute tubular necrosis and toxic renal injury. In: C.C. Tisher, & B.M. Brenner, *Renal Pathology: with clinical and functional correlations* (pp. 769-809). **Philadelphia: J.B. Lippincott Company**.
- Ooi, C. V. and Liu, F. 2000. Immunomodulation and Anti-Cancer Activity of Polysaccharide-Protein Complexes. **Current Medicinal Chemistry**. Vol. 7, p. 715-729.
- Otterlei, M., Ostgaard, K. Skjak-Braek, G., Smidsrod, O., Soon-Shiong, P., & Espevik, T. 1991. Induction of cytokine production from human monocytes stimulated by arginate. **Journal of Immunotherapy**. Vol. 10, 286-291.
- Panikkar, R., Brasch, D. J. 1996. Composition and block structure of alginates from New Zealand brown seaweeds. **Carbohydrate Research**. Vol. 293, 119-132
- Parkin M.; Bray, I. and Devesa, S. 2001. Cancer burden in the year 2000. The global picture. **European Journal of Cancer**. Vol. 37, p. 4-66.
- Pasquali, P.; Zalcman, A.; Murtas, S.; Adone, R.; Brambilla, G.; Marianelli, C.; Cagiola, M. and Cruchini, F. 2005. In vitro stimulation of murine peritoneal monocytes induced by alginate. **Arch. Pharm. Res**. Vol. 28, p. 936-941.
- Paula, E. J. 1988. O gênero *Sargassum* C. Agardh (Phaeophyta- Fucales) no litoral do Estado de São Paulo, Brasil. **Boletim de Botânica, Universidade** . Vol. 10, p. 65-118.
- Paula, E. J. and Oliveira Filho, E. C. 1980. Aspectos fenológicos de duas populações de *Sargassum cymosum* (Phaeophyta-Fucales) do litoral de São Paulo, Brasil. **Boletim de Botânica, Universidade de São Paulo**. Vol. 8, p. 21-39.
- Pec M. K, Aguirre, A.; Fernandez, J. J, et al. 2002. Dehydrothyriferol does not modulate multidrug resistance-associated protein 1 resistance: a functional

- screening system for MRP1 substrates. *Inter. J. Mol. Med.* Vol. 10, p. 605-608.
- Pessoa, C. 2000. Determinação do mecanismo de ação citotóxica de alguns compostos extraídos de plantas do nordeste brasileiro. **Tese de Doutorado em Farmacologia**, Universidade Federal do Ceará, Curso de Pós-graduação em Farmacologia, Fortaleza.
- Plunkett, T. A and Miles, D. W. 2002. New biological therapies for breast cancer. **Int. J. Clin. Pract.** Vol. 56, p. 261-266.
- Pott, P. 1987. Cirurgical observations relative to cancer of the scrtum. In: *Classics in Oncology*. New York: **American Cancer Society**. p. 9-17.
- Prokch, P.; Edrada, R. A and Ebel, R. 2002. Drugs from the seas-current status and microbiological implications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** Vol. 59, p. 125-134.
- Quinn, C. and Wright, N. 1990. The clinical assessment of proliferation and growth in human tumours: evaluation of methods and applcation as prognostic variables. **J. Pathol. Chinchester.** Vol. 160, p. 93-102.
- Rang, H. P and Dale, M. M. 1991. *Pharmacology*, 2<sup>th</sup> ed. **Churchill Livingstone**, Hong Kong.
- Raven, P.; Evert, F. and Eichhorn, S. 1996. *Biology of Plants*. Worth Publishers, 5 ed. New York.
- Reddy, L.; Odhav, B. and Bhoola, D.K. 2003. Natural products for cancer prevention: a global perspective. **Pharmacology & Therapeutics**. Vol. 99, p. 1-13.
- Renn, D. W. 1997. Biotechnology and the red seaweed polysaccharide industry: status needs and prospects. **Tibtech**. Vol. 15, p. 9-15.
- Richer C.; Gogyadze, V.; Schlapbach, R.; Schweizer, M. and Schlegel, J. 1994. Nitric oxide kills hepatocytes by mobilizing mitochondrial calcium. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** Vol. 205, p. 1143.

- Ríhova, B. 2002. Immunomodulating activities of soluble synthetic polymer-bound drugs. **Advanced Drug Delivery Reviews**. Vol. 54, p. 653-674.
- Ross, B. D. 1978. The isolated perfused rat kidney. **Clin. Sci. Mol. Med.** Vol. 55, p. 13-21.
- Ross, G. D.; Vetvicka, V.; Yan, J.; Xia, Y. and Vetvickova, J. 1999. Therapeutic intervention with complement and Beta-glucan in cancer. **Immunopharmacology**. Vol. 42, p. 61-74.
- Round, E. F. 1973. *Biologia das algas*. 2 ed., Rio de Janeiro.
- Ruppert E. and Barnes B. 1996. *Zoologia dos Invertebrados*. Ed. Rocca Ltda. 6ª
- Saito, K.; Nishijima, M. and Miyazaki, T. 1992. Structure of a heteroglycan isolated from the fungus *Omphalia lapidescens*. **Carbohydrate Research**. Vol. 224, p. 209-217.
- Salgaller L. and Lodge A. 1998. Use of cellular and cytokine adjuvants in the immunotherapy of cancer. **J. Surg. Oncol.** Vol. 68, p. 122-138.
- Scheuer P. J.; Haman, M. T. and Gravalos, D. G. 2000. Cytotoxic and antiviral compound. **US Patent Number 6011010**.
- Scheuer, P. J. and Lefkowitz, J.H. 2000. Drugs and toxins. In: Scheuer, P.J., Lefkowitz, J.H (Eds.), *Liver biopsy interpretation*, 6<sup>th</sup> ed. **WB Saunders**, London, p. 134-150.
- Schwartzmann, G.; Rocha, A.; Berlinck, R. and Jimeno, J. 2001. Marine organisms as a sources of new anticancer drugs. **Annual Oncology**. Vol. 2, p. 221-225.
- Sehabel, F. Jr. 1977. Surgical adjuvant chemotherapy of metastatic murine tumors. **Cancer**. Vol. 40, p. 558-568.
- Sevgi, T.; Ocak, O. and Acarturk, F. 1998. Formulation and investigation of nicardipine HCl- alginate gel beads with factorial designed - based studies. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. Vol. 6, p. 241-246.

- Shan, E.; Yoshida, Y.; Kuroda, E. and Yamashita, U. 1999. Immunomodulating activity of seaweed extracts on human lymphocytes *in vitro*. **International Journal of Immunopharmacology**. Vol. 21, p. 59-70.
- Sharon, N. and Lis, H. 1993. Carbohydrates in cell recognition. **Scientific American**. p. 74-81.
- Shimizu, J.; Urara, F.; Mano, H.; Matahira, Y.; Kawaguchi, M and Wada, M. 2005. Proportion of murine cytotoxic T cell is increased by high molecular-weight fucoidan extracted from *Okinawa mozuku (Cladosiphon okamuranus)*. **Journal of Health Science**. Vol. 51, p. 394-397.
- Singer, M. and O'Hagan D. 1998. The preparation and characterization of polymeric antigen delivery systems for oral administration. **Advanced Drug Delivery Reviews**. Vol. 34, p. 285-304.
- Smit, A. 2004. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review. **Journal of Applied Phycology**. Vol. 16, p. 245-262.
- Son, E.; Yang, K.; Rhee, D. and Pyo, S. 2005. Immunomodulatory function of murine NK cell activity by alginate. **Arch. Pharm. Res**. Vol. 28, p. 1282-1286.
- Son, H.; Moon, Y.; Rhee, K. and Pyo, S. 2001. Stimulation of various functions in murine peritoneal macrophages by high mannuronic acid-containing alginate (HMA) exposure *in vivo*. **International Immunopharmacology**. vol.1, p. 147-157.
- Soon-Shiong, P.; Henitz, R.; Merideth, N.; Yao, Q.; Zheng, T. 1994. Insulin independence in a type I diabetic patient after encapsulated islet transplantation. **Lancet**. Vol. 343, p. 950.
- Sparidans, R. W.; Stokvis, E.; Jimeno, J. M; Lopez-Lazaro, L.; Schellens, J. H and Beijnen, J. H. 2001. Chemical and enzymatic stability of a cyclic depsipeptide, the novel, marine-derived, anti-cancer agent Kahalalide F. **Anticancer Drugs**. Vol. 12, p. 575-582.
- Spieler, R. 2002. Seaweed compound's anti-HIV efficacy will be tested in southern Africa. **Lancet**. Vol. 395, p. 1675.

- Stokvis, E.; Rosing, H.; López-Lázaro, L.; Rodriguez, I.; Jimeno, J. M.; Supko, J.G.; Schellens, J. H. M. and Beijnen J. H. 2002. Quantitative analysis of the novel depsipeptide anticancer drug Kahalalide F in human plasma by high-performance liquid chromatography under basic conditions coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. **J. mass Spectrom.** Vol. 37, p. 992-1000.
- Suga, T.; Meada, Y. Y.; Uchida, H.; Rokutanda, M. and Chihara, G. 1986. Macrophage mediated acute-phase transport protein production induced by lentinan. **Int. J. Immunopharmacol.** Vol. 8, p. 691.
- Szechy, M. and Paula, E. 2000. Padrões estruturais quantitativos de bancos de *Sargassumi* (Phaeophyta- Fucales) do litoral dos Estados do Rio de Janeiro e São Paul, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica.** Vol. 23, p. 121-132.
- Takaguchi, N.; Saito, N.; Nunoura, M.; Kouda, K.; Oda, K.; Furuyama, N. 2001. Use of 5-FU plus hyperbaric oxygen for treatment malignant tumors: evaluation of antitumor effect and measurement of 5-FU in individual organs. **Cancer Chemother Pharmacol.** Vol. 47, p. 11-14.
- Takahashi, K.; Harauchi, D.; Kimura, S.; Saito, S. and Monden, Y. 1998. OK-432 develops CTL and LAK activity in mononuclear cells from regional lymph nodes of lung cancer patients. **International Journal of Immunopharmacology.** Vol. 20, p. 375-388.
- Thomas, A., Harding, K.G., & Moore, K. 2000. Alginates from wound dressings activate human macrophages to secrete tumour necrosis factor- $\alpha$ . **Biomaterials.** Vol. 21, p. 1797-1802.
- Torres, M.R. 2003. Purificação, caracterização físico-química, atividades inflamatória e imunoadjuvante de alginatos da alga marinha *Sargassum vulgare* C. Agardh. **Tese de Doutorado em Bioquímica e Biologia Molecular.** Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.



- Tzianabos, O. A. 2000. Polysaccharide immunomodulators as therapeutics agents: structural aspects and biologic function. **Clinical Microbiological Reviews**. Vol. 13, p. 523-533.
- Uchida, A. and Micksche, M. 1981. In vitro augmentation of natural killer activity by OK-432. **Int. J. Immunopharmac**. Vol. 3, p. 365-375.
- Uchida, A. and Micksche, M. 1981. In vitro augmentation of natural killer activity by OK-432. **Int. J. Immunopharmac**. Vol. 3, p. 365-375.
- Usui, S.; Murashima, K.; Sakai, M.; Kiho, T. and Ukai, S. 1994. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. Vol. 17, p. 1165-1170.
- Walson, M.; Davidson, G. and Orloff, J. 1955. The renal clearance of alkali-stable inulin. **Jornal of Clinical Investigation**. Vol. 34, p. 1520-1523.
- Weiss, J. 1959. Autoregulation of flow in isolated rat kidney in the absence of red cells. **Am. J. Physiol**. Vol. 195, p. 1115-1118.
- Whistler, R.; Bushway, A.; Singh, P. 1976. Noncytotoxic, antitumor polysaccharides. **Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry**. Vol. 32, p. 235-275.
- Witvrouw, M.; Este J.; Mateu, M.; Reymen, D.; Andei, G.; Snoeck, R.; Ikeda, S.; Pauwels, R.; Bianchini, N.; Desmyter, J. and de Clercq, E. 1994. Activity of a sulfated polysaccharide extracted from the red seaweed *Aghardhiella tenera* against human immunodeficiency virus and other enveloped viruses. **Antiviral Chem. Chemotheraphy**. Vol. 5, p. 297-303.
- Wong, C. K.; Leung, K. N.; Fung, C.P. and Choy, Y. M. 1994. Immunomodulatory and anti-tumor polysaccharides from medicinal plants. **Journal International from Medicine Research**. Vol. 22, p. 229-312.
- Wynne, M. J & Bold, H. C. 1978. Introduction to the algae structure and reproduction, 3 ED. **Prentice & Hall Inc. Englewood Cliffs, New Jersey**, p. 706.

- Xu, N.; Fan, X.; Yan, X. and Tseng, K. 2004. Screening marine algae from China for their antitumor activities. **Journal of Applied Phycology**, p. 1-6.
- Yamamoto, A.; Nagamura, M.; Usai, H.; Sugawara, Y.; Watanabe, N.; Niitsu, Y. and Urushizaki, I. 1986. Release of tumor necrosis factor (TNF) into mouse peritoneal fluids by OK-432, a streptococcal preparation. **Immunopharmacology**. Vol. 11, p. 79-86.
- Yamamoto, I.; Nagumo, T.; Yagi, K.; Tominaga, H. and Aoki, M. 1974. Antitumor effect of seaweeds. I: Antitumor effect of extracts from *Sargassum* and *Laminaria*. **Jpn. J. Exp. Med.** Vol. 44, p. 543-546.
- Yang, Q.; Jong, S.; Li, X.; Zhou, J.; Chen, R. and Xu, L. 1992. **Journal of Immunology and Immunopharmacology**. Vol. 12, p. 29-34.
- Yoshizawa, Y.; Enomoto, A.; Todho, H.; Ametani, A. and Kaminogawa, S. 1993. Activation of murine macrophages by polysaccharide fractions from marine alga (*Porphyra yezoensis*). **Biosc. Biotech. Biochem.** Vol. 57, p. 1862-1866.
- Zeitlin, L.; Whaley, K.; Hegarty, T.; Moench, T. and Cone, R. 1997. Test of vaginal microbicides in the mouse genital herpes model. **Contraception**. Vol. 56, p. 329-335.
- Zhou, G.; Sheng, W.; Yao, W. and Wang, C. 2006. Effect of molecular lambda-carrageenan from *Chondrus ocellatus* on antitumor H-22 activity of 5-Fu. **Pharmacology Research**. Vol. 53, p. 129-134.
- Zhou, G.; Sun, Y.; Xin, H.; Zhang, Yuna.; Li, Zhien.; Xu, Zuhong. 2004. In vivo antitumor and immunomodulation activities of different molecular weight lambda-carrageenans from *Chondrus ocellatus*. **Pharmacological Research**. Vol.50, p. 47-53.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)