



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ – UECE**  
**ALBERTINA ANTONIELLY SYDNEY DE SOUSA**

**GALACTANA SULFATADA DA ALGA MARINHA VERMELHA**  
***Gelidium crinale* (TURNER) LAMOUREUX: respostas na inflamação**  
**e nocicepção**

**FORTALEZA-CEARÁ**  
**2010**

**ALBERTINA ANTONIELLY SYDNEY DE SOUSA**

**GALACTANA SULFATADA DA ALGA MARINHA VERMELHA**  
***Gelidium crinale* (TURNER) LAMOUREUX: respostas na inflamação**  
**e nocicepção**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual do Ceará como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Maria Sampaio Assereuy

**FORTALEZA-CEARÁ**  
**2010**

**ALBERTINA ANTONIELLY SYDNEY DE SOUSA**

**GALACTANA SULFATADA DA ALGA MARINHA VERMELHA**  
***Gelidium crinale* (TURNER) LAMOUREUX: respostas na inflamação**  
**e nocicepção**

Aprovada em: 12/ 05/ 2010

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Ana Maria Sampaio Assereuy (Orientadora)  
Universidade Estadual do Ceará- UECE

---

Profa. Dra. Norma Maria Barros Benevides  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Profa. Dra. Maria Goretti Rodrigues Queiroz  
Universidade Federal do Ceará – UFC

*Ao meu bom Deus, fonte inesgotável de amor e minha inabalável fortaleza, pelo dom da vida, pela luz que Ele irradia em meus caminhos e por todas as graças concedidas sempre,*

*Aos meus amados pais, Otacílio e Fátima, pelo amor e apoio incondicionais em todos os aspectos de minha vida.*

*Aos meus queridos familiares, pelo incentivo e orgulho em mim depositados,*

*Aos amigos do LAFIN, Mestrado e da vida que me brindaram lindamente com o verdadeiro significado da palavra amizade.*

*Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

À professora doutora Ana Maria Sampaio Assereuy, pela incomensurável dedicação e solicitude na orientação e correção deste trabalho, além da contribuição para a minha formação como pesquisadora.

À professora doutora Maria Gonçalves Pereira pela co-orientação deste trabalho.

Às professoras colaboradoras Norma Maria Barros Benevides e Maria Goretti Rodrigues de Queiroz, da Universidade Federal do Ceará, pela concessão da galactana sulfatada utilizada neste estudo e disponibilização das instalações laboratoriais para o ensaio de toxicidade, respectivamente.

Aos alunos de Iniciação Científica (UECE): Paulo Alcântara, Pâmela de Aguiar, Ana Carolina Andrade, Felipe Fiúza; e doutorandos (UFC): Thamires Maria Fontenele Moraes e Daniel Freire de Sousa, que acompanharam o desenvolvimento deste trabalho e contribuíram de forma ativa em sua execução. Muito obrigada pela disposição e dedicação às longas horas de experimento.

Aos demais integrantes do LAFFIN que contribuíram de forma direta ou indireta para o desenvolvimento deste trabalho, mantendo sempre a harmonia do ambiente de trabalho e o verdadeiro espírito de equipe: Alana de Freitas Pires, Lívia Pereira, Pedro Bringel e demais pós-graduandos e alunos de Iniciação Científica.

À Gabriela Fernandes Oliveira Marques Domingos, bolsista de apoio técnico da FUNCAP, pelas inúmeras colaborações na execução deste trabalho.

Aos colegas e amigos do Curso de Mestrado pelo enriquecimento da experiência da pós-graduação, bem como pelo aprendizado científico.

Ao corpo docente do Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas pelos ensinamentos e incentivo compartilhados.

Ao Cleidson, pela intensa e incansável dedicação no cuidado aos nossos animais, bem como a solicitude e presteza em nos ajudar sempre que necessário.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de Mestrado, bem como à Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pelos convênios e auxílios concedidos.

*“A vontade de Deus nunca irá levá-lo aonde a graça Dele não posso protegê-lo”.*

*(Autor desconhecido)*

## RESUMO

Galactanas sulfatadas são macromoléculas encontradas em grande quantidade nas algas marinhas vermelhas, sendo exploradas por suas ações anticoagulante e antitrombótica. No entanto, estudos envolvendo seu papel em eventos inflamatórios e nociceptivos ainda são escassos. Investigou-se o efeito da galactana sulfatada de *Gelidium crinale* (GS) em modelo de inflamação aguda e nocicepção, bem como possível toxicidade. Foram utilizados ratos Wistar machos (150-250g) nos estudos de inflamação e toxicidade e camundongos Swiss machos (25-35g) na nocicepção. Na inflamação foi utilizado o modelo de edema de pata analisando os parâmetros: edema (pletismometria) e permeabilidade vascular (extravasamento protéico). A GS foi testada localmente quanto à atividade pró-inflamatória, nas doses de 0,01; 0,1 e 1 mg/Kg por via s.c. intraplantar, sendo que somente esta última induziu significativos edema e aumento da permeabilidade vascular; e sistemicamente quanto a atividade anti-inflamatória, por via endovenosa (e.v.) nas mesmas doses, 30 min. antes da injeção s.c. dos estímulos inflamatórios: carragenina (300 µg/pata), dextrana (300 µg/pata) zimosan (1mg/pata), histamina (100 µg/pata), composto 48/80 (10 µg/pata), serotonina (20 µg/pata), bradicinina (30 µg/pata), fosfolipase A<sub>2</sub> (30µg/kg; s.c.) ou L-arginina (15 µg/kg; s.c.) nas patas dos animais. O tratamento com a GS inibiu os edemas de pata induzidos por dextrana e carragenina, mas não por zimosan, inibindo em 31,5% o aumento de permeabilidade induzida pelo primeiro agente. Observando-se os padrões de inibição da GS sobre os diferentes estímulos, investigou-se quais os mediadores envolvidos no efeito antiedematogênico da mesma. Para tanto, comprovou-se que a GS inibiu em 49% e 32%, respectivamente, os edemas de pata induzidos por histamina (100 µg) e composto 48/80 (10 µg), mas não inibiu os edemas induzidos por serotonina (20 µg) e bradicinina (30 µg), sugerindo a participação de histamina neste efeito. A GS também inibiu em 44% o edema induzido por fosfolipase A<sub>2</sub> (30 µg/Kg), substância que forma metabólitos do ácido araquidônico, mas não inibiu o edema induzido por L-arginina (15 µg/Kg), um substrato para formação de óxido nítrico, correlacionando a ação inibitória da GS sobre prostaglandinas e, possivelmente, leucotrienos. Na nocicepção foram utilizados modelos que utilizam estímulo químico (teste da formalina), térmico (placa quente) e mecânico (hipernocicepção mecânica). A GS (0,1; 1 e 10 mg/Kg) foi administrada e.v. 30 min. antes da exposição aos estímulos e inibiu as fases neurogênica e inflamatória do teste da formalina nas três doses testadas, bem como reduziu para 19% e 26% o número de respostas (retirada da pata) dos animais estimulados com o filamento de von Frey, na 1ª e 3ª horas do teste, respectivamente. O tratamento dos animais com a GS (1 mg/Kg; e.v.) durante 10 dias, não revelou sinais de toxicidade, apenas alterações numéricas pouco representativas dos padrões hematológicos e bioquímicos, em relação ao controle de salina. Logo, conclui-se que a galactana sulfatada de *G. crinale* apresenta atividades pró- e anti-inflamatória dependendo da via de administração, sendo esta última dependente de histamina e prostaglandinas, bem como apresenta atividade antinociceptiva, principalmente sobre a dor inflamatória, a qual envolve a participação de receptores opióides. Além destas atividades, a GS não mostra sinais de toxicidade.

**Palavras-chave:** Galactana sulfatada. *Gelidium crinale*. Inflamação. Nocicepção

## ABSTRACT

Sulfated galactans are macromolecules found in great amount in red marine algae, being explored for its anticoagulant and antithrombotic actions. However, your role in inflammatory and nociceptive events are still rare. The effects of a sulfated galactan (SG) from *Gelidium crinale* were investigated in models of acute inflammation and nociception, as well the possible toxicity. Male Wistar rats were used (150-250 g) in inflammation and toxicity studies and male Swiss mice (25-35 g) in nociception. Paw edema model was used to evaluate two parameters: edema (plethysmography) and vascular permeability (protein leakage). SG was locally injected to evaluate its pro-inflammatory activity, at doses of 0.01; 0.1 and 1 mg/Kg per intraplantar subcutaneous (s.c.) route, and only the last dose induced significantly edema and raise of vascular permeability; and systemically, by intravenous (i.v.) route, to evaluate its anti-inflammatory activity, at the same doses, 30 min. before s.c. injection of the inflammatory stimuli: carrageenin (300 µg/paw), dextran (300 µg/paw), zymosan (1 mg/paw), histamine (100 µg/paw), bradykinin (30 µg/paw), serotonin (20 µg/paw), compound 48/80 (10 µg/kg), phospholipase A<sub>2</sub> (30 µg/kg; s.c.) and L-arginine (15 µg/Kg; s.c.). The treatment with GS inhibited the paw edema induced dextran and carrageenin, but did not by zimosan, and reduced in 31.5% the raise of vascular permeability induced by dextran. Observing the standard of inhibition by SG on different stimuli, it was investigated which inflammatory mediators were involved in its antiedematogenici effect. This way, it was proved that SG inhibited in 49% and 32%, respectively, the paw edema induced by histamine (100 µg) and compound 48/80 (10 µg), but did not inhibit paw edema induced by serotonin (20 µg) and bradykinin (30µg/paw), suggesting the participation of histamine in this effect. SG also inhibited in 44% the paw edema induced by phospholipase A<sub>2</sub> (30 µg/kg), substance that generates arachidonic acid metabolities, but did not inhibited the edema induced by L-arginine (15 µg/Kg), a substrate to nitric oxid formation, correlating the inhibitory effect of SG on prostaglandins and, possibly, leukotriens. In nociception, it was used models that promote chemical (formalin test), thermal (hot plate) and mechanical (mechanical hypernociception) stimuli. SG (0.1; 1 and 10 mg/Kg) was administered i.v. 30 min. before animal exposition to stimuli and inhibited the neurogenic and inflammatory phases of formalin test at all the doses tested, as well reduced to 19% and 26% the flinch reaction of animals stimulated by von Frey filament, ate 1<sup>st</sup> and 3<sup>rd</sup> hours of the test, respectively. Animal treatment with SG (1 mg/Kg) during 10 days did not reveal toxicity signs, only numeric and few representative alterations in hematologic and biochemical standards, when compared to saline. Thus, it is concluded that sulfated galactan from *G. crinale* presents pro- and anti-inflammatory activities depending on the administration route, and the last one is dependent of histamine and prostaglandins, as well presents antinociceptive effect, mainly on inflammatory pain, which involves the participation of opioid receptors. Moreover, SG did not show toxicity.

**Keywords:** Sulfated galactan. *Gelidium crinale*. Inflammation. Nociception



**LISTA DE FIGURAS**

|                  |   |           |
|------------------|---|-----------|
| <b>FIGURA 1</b>  | <b>Alga marinha vermelha <i>Gelidium crinale</i> (Turner)<br/>Lamouroux</b>   | <b>20</b> |
| <b>FIGURA 2</b>  | <b>Adesão e diapedese de neutrófilos</b>  | <b>28</b> |
| <b>FIGURA 3</b>  | <b>Ilustração cômica dos cinco sinais cardinais da inflamação</b>   | <b>32</b> |
| <b>FIGURA 4</b>  | <b>Estrutura da galactana sulfatada de <i>Gelidium crinale</i></b>  | <b>35</b> |
| <b>FIGURA 5</b>  | <b>A galactana sulfatada de <i>G. crinale</i> induz edema e aumento de permeabilidade vascular</b>  | <b>43</b> |
| <b>FIGURA 6</b>  | <b>A galactana sulfatada de <i>G. crinale</i> não inibe o curso temporal do edema de pata induzido por zimosan</b>                                      | <b>45</b> |
| <b>FIGURA 7</b>  | <b>A galactana sulfatada de <i>G. crinale</i> inibe as fases inicial e tardia do edema de pata induzido por carragenina</b>                             | <b>47</b> |
| <b>FIGURA 8</b>  | <b>A galactana sulfatada de <i>G. crinale</i> inibe o edema de pata e o aumento da permeabilidade vascular induzidos por dextrana</b>                   | <b>49</b> |
| <b>FIGURA 9</b>  | <b>A atividade anti-edematogênica da galactana sulfatada de <i>G. crinale</i> ocorre via inibição de histamina, mas não de serotonina e bradicinina</b> | <b>51</b> |
| <b>FIGURA 10</b> | <b>A atividade anti-edematogênica da galactana sulfatada de <i>G. crinale</i> ocorre via inibição de prostaglandinas, mas não de óxido nítrico</b>      | <b>53</b> |
| <b>FIGURA 11</b> | <b>Atividade antinociceptiva da galactana sulfatada de <i>G. crinale</i> no teste da formalina</b>  | <b>59</b> |
| <b>FIGURA 12</b> | <b>Participação da via opióide na atividade antinociceptiva da galactana sulfatada de <i>G. crinale</i> (Gs) no teste da formalina</b>                  | <b>60</b> |
| <b>FIGURA 13</b> | <b>A atividade antinociceptiva da galactana sulfatada de <i>G. crinale</i> não se manifesta no teste da placa quente</b>                                | <b>62</b> |
| <b>FIGURA 14</b> | <b>A galactana sulfatada de <i>G. crinale</i> inibe a hipernocicepção induzida por carragenina</b>  | <b>63</b> |

## LISTA DE TABELAS

|                 |   |           |
|-----------------|---|-----------|
| <b>TABELA 1</b> | <b>Avaliação do peso corporal e de órgãos após tratamento subcrônico com a galactana sulfatada de <i>G. crinale</i></b>       | <b>55</b> |
| <b>TABELA 2</b> | <b>Parâmetros hematológicos dos animais após tratamento subcrônico com a galactana sulfatada de <i>G. crinale</i></b>         | <b>56</b> |
| <b>TABELA 3</b> | <b>Parâmetros bioquímicos do plasma dos animais após tratamento subcrônico com a galactana sulfatada de <i>G. crinale</i></b> | <b>57</b> |

## LISTA DE ABREVIÇÕES

|   |   |
|---|---|
| 5-HT  | 5-Hidroxitriptamina (serotonina), do inglês <i>5-Hydroxytryptamine</i>  |
| AA  | Ácido araquidônico, do inglês <i>Arachdonic Acid</i>  |
| C3a e C5a   | Componentes 3a e C5a da cascata do complemento designados anafilotoxinas  |
| COX-1 e -2  | Enzimas ciclooxygenase 1 e 2, respectivamente, do inglês <i>cyclooxygenase</i>  |
| GM-CSF  | Fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos, do inglês <i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i> |
| GS  | Galactana sulfatada (de <i>Gelidium crinale</i> )   |
| ICAM-1  | Molécula de adesão intercelular 1, do inglês <i>Intercellular Adhesion Molecules</i>  |
| IL  | Interleucina, do inglês <i>Interleukin</i>  |
| LFA-1 e CR3   | Integrinas presentes nos leucócitos   |
| LPS   | Lipopolissacarídeo  |
| LTB <sub>4</sub> , LTC <sub>4</sub> , LTD <sub>4</sub> , LTE <sub>4</sub> | Leucotrienos B <sub>4</sub> , C <sub>4</sub> , D <sub>4</sub> e E <sub>4</sub>  |
| LXA , LXB   | Lipoxinas A e B, do inglês <i>Lipoxins</i>  |
| MCP-1   | Proteína quimioatrativa de monócitos – 1, do inglês <i>Monocyte Chemoattractant Protein</i>                                 |
| MIP   | Proteína inflamatória de macrófagos, do inglês <i>Macrophage Inflammatory Protein</i>                                       |
| NO  | Óxido Nítrico, do inglês <i>Nitric Oxide</i>  |

|  |  |
|--|--|
| eNOS   | Isoforma endotelial da enzima óxido nítrico sintase, do inglês <i>Endothelial Nitric Oxide Sintase</i>       |
| iNOS   | Isoforma induzida da enzima óxido nítrico sintase, do inglês <i>Induced Nitric Oxide Sintase</i>             |
| nNOS   | Isoforma neuronal da enzima óxido nítrico sintase, do inglês <i>Neuronal Nitric Oxide Sintase</i>            |
| PAF  | Fator ativador de plaquetas, do inglês <i>Platelet Activating Factor</i>                                     |
| PGs  | Prostaglandinas, do inglês <i>prostaglandins</i>   |
| PGI <sub>2</sub> , PGE <sub>2</sub> , PGD <sub>2</sub> | Prostaglandinas I <sub>2</sub> (prostaciclina), E <sub>2</sub> e D <sub>2</sub>                              |
| PLS  | Polissacarídeo(s) sulfatado(s)   |
| TGF- $\beta$   | Fator transformador beta, do inglês <i>Transforming Growth Factor-<math>\beta</math></i>                     |
| TNF- $\alpha$  | Fator de necrose tumoral alfa, do inglês <i>Tumor Necrosis Factor-<math>\alpha</math></i>                    |
| VCAM-1   | Molécula de adesão celular vascular, do inglês <i>Vascular Adhesion Molecules</i>                            |
| VLA-2 e VLA-6  | Integrinas que permitem a ligação de leucócitos à fibronectina, do inglês <i>Very Late Antigen</i>           |
| LXA , LXB  | Lipoxinas A e B, do inglês <i>Lipoxins</i>   |
| VLA-4 e VLA-5  | Integrinas que permitem a ligação de leucócitos à laminina e ao colágeno, do inglês <i>Very Late Antigen</i> |

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b>   | <b>15</b> |
| <b>2 OBJETIVOS</b>  | <b>17</b> |
| <b>2.1 Geral</b>  | <b>17</b> |
| <b>2.2 Específicos</b>  | <b>17</b> |
| <b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b>  | <b>18</b> |
| <b>3.1 Algas marinhas</b>   | <b>18</b> |
| <b>3.1.1 Algas vermelhas</b>  | <b>19</b> |
| 3.1.2 <i>Gelidium crinale</i> (Turner) Lamouroux  | 19        |
| <b>3.2 Carboidratos</b>   | <b>20</b> |
| 3.2.1 Polissacarídeos sulfatados  | 21        |
| 3.2.2 Atividades biológicas de polissacarídeos sulfatados   | 22        |
| <b>3.3 Resposta inflamatória</b>  | <b>23</b> |
| 3.3.1 Eventos celulares e vasculares da resposta inflamatória   | 25        |
| 3.3.2 Mediadores químicos da inflamação   | 28        |
| 3.3.3 Sinais cardinais da inflamação  | 32        |
| <b>3.4 Dor inflamatória</b>   | <b>33</b> |
| <b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b>  | <b>34</b> |
| <b>4.1 Animais</b>  | <b>34</b> |
| <b>4.2 Galactana sulfatada de <i>Gelidium crinale</i></b>   | <b>34</b> |
| <b>4.3 Drogas e reagentes</b>   | <b>35</b> |
| <b>4.4 Avaliação da atividade da galactana sulfatada de <i>G. crinale</i> em modelos experimentais de inflamação em ratos</b> | <b>35</b> |
| 4.4.1 Modelo de edema de pata   | 35        |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>4.5 Avaliação da toxicidade da galactana sulfatada de <i>G. Crinale</i></b>   | <b>37</b> |
| <b>4.6 Avaliação da atividade da galactana sulfatada de <i>G. crinale</i> em modelos experimentais de nocicepção em camundongos</b>  | <b>39</b> |
| 4.6.1 Teste da formalina   | 39        |
| 4.6.2 Teste da placa quente  | 39        |
| 4.6.3 Hipernocicepção mecânica   | 40        |
| <b>4.7 Análise estatística</b>   | <b>41</b> |
| <b>5 RESULTADOS</b>  | <b>42</b> |
| <b>5.1. A galactana sulfatada de <i>Gelidium crinale</i> injetada por via local apresenta atividade edematogênica e induz aumento de permeabilidade vascular</b>                                 | <b>42</b> |
| <b>5.2 A galactana sulfatada de <i>Gelidium crinale</i> injetada por via sistêmica não inibe o curso temporal do edema de pata induzido por zimosan</b>  | <b>44</b> |
| <b>5.3 A galactana sulfatada de <i>Gelidium crinale</i> injetada por via sistêmica inibe as fases inicial e tardia do edema de pata induzido por carragenina</b>                                 | <b>46</b> |
| <b>5.4. A galactana sulfatada de <i>Gelidium crinale</i> injetada por via sistêmica inibe tanto o edema de pata quanto a permeabilidade vascular induzidos por dextrana</b>                      | <b>48</b> |
| <b>5.5 A atividade anti-edematogênica da galactana sulfatada de <i>Gelidium crinale</i> ocorre via inibição de histamina, mas não de bradicinina e serotonina</b>                                | <b>50</b> |
| <b>5.6 A atividade anti-edematogênica da galactana sulfatada de <i>Gelidium crinale</i> ocorre via inibição de prostaglandinas, mas não de óxido nítrico</b>                                     | <b>52</b> |
| <b>5.7 O tratamentos subcrônico de ratos com a galactana sulfatada de <i>G. crinale</i> não produz toxicidade sistêmica</b>  | <b>54</b> |
| <b>5.8 A galactana sulfatada de <i>Gelidium crinale</i> apresenta atividade antinociceptiva sobre as fases neurogênica e inflamatória do teste da formalina, com envolvimento da via opióide</b> | <b>58</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>5.9 A atividade antinociceptiva da galactana sulfatada de <i>Gelidium crinale</i> parece não ocorrer a nível central</b> | <b>61</b> |
| <b>5.10 A galactana sulfatada de <i>G. crinale</i> inibe a hipernocicepção induzida por carragenina</b>                     | <b>63</b> |
| <b>6 DISCUSSÃO</b>  | <b>64</b> |
| <b>7 CONCLUSÕES</b>   | <b>75</b> |
| <b>REFERÊNCIAS</b>  | <b>76</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

O interesse científico nos ramos das Ciências Biomédicas tem impulsionado à investigação e identificação de moléculas biologicamente ativas oriundas de produtos naturais. Já foram identificados compostos provenientes de diversas fontes, destacando-se os organismos aquáticos, com ampla aplicabilidade biotecnológica.

Os polissacarídeos sulfatados (PLS) estão entre as macromoléculas de origem natural mais estudadas. Apresentam-se como polímeros formados por unidades repetitivas de açúcares carregados negativamente, devido à presença de radicais sulfato, o que possibilita sua ligação a um grande número de proteínas em solução no organismo. Esta característica físico-química é a responsável pela diversidade de atividades biológicas apresentadas por estas macromoléculas.

As algas marinhas, organismos eucariontes pertencentes ao reino protista, se constituem em uma das principais fontes de PLS com propriedades biológicas já estudadas. Nestes organismos, os PLS podem ser encontrados na forma de fucanas ( $\alpha$ -L-fucose), galactanas (resíduos de  $\alpha$ - e  $\beta$ -D-galactose) e arabino-galactanas (D-manose e galactose), açúcares predominantes nas algas pardas, vermelhas e verdes, respectivamente. Dentre as atividades biológicas mais estudadas dos PLS, destacam-se a anticoagulante e a antitrombótica, além das atividades antiviral, antibacteriana, antioxidante, imunoestimulante, antitumoral, antinociceptiva e antiinflamatória.

No que se refere aos efeitos de PLS no processo inflamatório há uma clássica atribuição de resposta antiinflamatória a fucanas sulfatadas em relação ao padrão pró-inflamatório de galactanas sulfatadas. No entanto, os estudos contemplando galactanas sulfatadas na inflamação ainda são escassos, permitindo às novas pesquisas revelar outros padrões de resposta destas macromoléculas.

Em nosso laboratório, a investigação de polissacarídeos sulfatados mostrou que aquele isolado da alga vermelha *Champia feldmannii* apresenta atividade quimiotática para neutrófilos e edematogênica, acompanhada de aumento de permeabilidade vascular, bem como ação imunoestimulante. Também foi demonstrado o efeito vasodilatador *in vivo* e *in vitro* para o PLS da alga vermelha *Solieria filiformis*. Por outro lado, a fucana sulfatada da alga *Lobophora variegata* apresenta atividade antiinflamatória frente a agentes flogísticos clássicos em vários



modelos utilizando roedores, sendo esta atividade melhor evidenciada no edema de pata induzido por zimosan.

A galactana sulfatada da alga *Gelidium crinale*, objeto de estudo deste trabalho, é encontrada em abundância no litoral cearense e já possui estrutura caracterizada, sendo descrita por seus efeitos anticoagulante e antitrombótico. No entanto, não há relatos na literatura acerca do seu papel em processos de cunho inflamatório e/ou na nocicepção. Contudo, resultados preliminares de nosso laboratório demonstraram que esta galactana apresenta tanto ações anti- quanto pró-inflamatórias, contrariando a linha geral que vem sendo estabelecida sobre o efeito de fucanas e galactanas na inflamação.

Embora a inflamação se constitua em um importante mecanismo de defesa do organismo contra diversos tipos de agressão, pode apresentar potencial lesivo aos tecidos. Portanto, pesquisas que estudem as moléculas participantes do processo inflamatório bem como a caracterização de novas substâncias mais eficazes e inócuas, que interfiram neste processo são de extrema relevância.

Logo, o objetivo deste trabalho se fundamenta em três premissas: a) o processo inflamatório visto como uma resposta de defesa do sistema imune, porém com potencial lesivo aos tecidos, sendo causa de morbidade e mortalidade em várias doenças; b) na eficiência da terapêutica antiinflamatória atual, fundamentada na inibição da geração de metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos) e na corticoterapia, mas que induz sérios efeitos colaterais, incluindo-se as drogas de última geração; c) nos resultados preliminares obtidos em nosso laboratório sobre o efeito dual da galactana de *G. crinale*. Assim, o presente estudo visa investigar a capacidade da galactana sulfatada de *G. crinale* em inibir ou ativar os eventos celulares e vasculares da inflamação e sua interferência na dor inflamatória.

Os resultados desta investigação poderão sugerir o uso de polissacarídeos sulfatados como ferramentas importantes para a compreensão da fisiopatologia e/ou controle farmacológico da resposta inflamatória e talvez, no futuro, gerar um produto biotecnológico, diagnóstico e/ou terapêutico alternativo com estas substâncias na melhora do prognóstico de várias doenças de cunho inflamatório tais como asma, choque séptico e artrite reumatóide e/ou como imunoestimulantes em várias condições patológicas de imunossupressão tais como AIDS, tuberculose e câncer.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Avaliar a atividade da galactana sulfatada da alga marinha vermelha *Gelidium crinale* sobre os aspectos celulares e vasculares da inflamação aguda, sua interferência na dor inflamatória e possíveis sinais de toxicidade decorrentes do tratamento com a galactana em modelos animais.

### 2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Avaliar a atividade inflamatória da galactana sulfatada de *G. crinale* no modelo de edema de pata em ratos, analisando:

- a) edema
- b) permeabilidade vascular;

2.2.2. Avaliar a atividade antiinflamatória da galactana sulfatada no modelo de edema de pata em ratos, analisando:

- a) edema;
- b) permeabilidade vascular;
- c) participação de mediadores inflamatórios;

2.2.3. Avaliar a toxicidade causada pela galactana sulfatada em ratos;

2.2.4 Avaliar a atividade antinociceptiva da galactana sulfatada nos testes da formalina, placa quente e na hipernocicepção mecânica.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Algas marinhas

As algas são organismos encontrados em ambientes marinhos e continentais, com função comparável aos vegetais terrestres, e servem de alimento para diversos organismos microscópicos, invertebrados e peixes. Apresentam grande variação de forma e possuem, assim como as plantas, parede celular composta de celulose. São organismos eucariontes, autotróficos fotossintetizantes, uni ou multicelulares com dois tipos de reprodução (sexuada e assexuada) (ROCHA et al., 2004). Como resultado da fotossíntese, as algas produzem oxigênio e carboidratos, que são utilizados por outros organismos, inclusive os animais. Segundo a nova regra taxonômica, todas as algas eucariontes pertencem ao reino protista (PERFETO et al., 2004).

As algas marinhas são classificadas em algas verdes (*Chlorophyta*), vermelhas (*Rhodophyta*) e pardas (*Phaeophyta*) (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001), dependendo da predominância do pigmento encontrado. Os três tipos apresentam elevada quantidade de polissacarídeos sulfatados (PLS) presentes nas algas pardas na forma de fucanas ( $\alpha$ -L-fucose), nas vermelhas em forma de galactanas (resíduos de  $\alpha$ - e  $\beta$ -D-galactose) e nas verdes em forma de arabino-galactanas (D-manose e galactose) (PERCIVAL; MCDOWEL, 1967).

Nas algas marinhas, os polissacarídeos constituintes da matriz extracelular desempenham funções correlacionadas à regulação mecânica, osmótica e iônica, adaptando-as ao ambiente marinho (KLOAREG; QUATRANO, 1998).

Além de serem utilizadas em muitos países orientais como suplemento alimentar, as algas marinhas possuem diversas aplicabilidades nas indústrias têxtil, cosmética e farmacêutica, destacando-se nesta última como agentes anticoagulantes e antiinflamatórios (ARMISEN, 1995).

### 3.1.1 Algas vermelhas

As algas vermelhas são organismos pluricelulares particularmente abundantes em águas tropicais quentes. As espécies marinhas são as representantes mais significativas, enquanto observa-se um número muito reduzido de espécies de água doce (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

As algas vermelhas apresentam grande importância industrial, delas se extrai o ágar utilizado na fabricação de gomas, laxantes ou, ainda, como meio de cultura para bactérias. Outro composto obtido é a carragenana, um hidrocolóide usado na produção de alimentos, para substituir o amido e a gordura, principalmente nas indústrias de laticínios e enlatados, na fabricação de gelatinas e geléias, e como espessante, emulsificante e estabilizante (STANLEY; GOOF; SMITH; 1996; STEPHEN, 1995).

As galactanas sulfatadas, açúcares majoritários das algas marinhas vermelhas, são geralmente compostos de cadeias lineares de resíduos de  $\beta$ -D-galactopiranosose unidos por ligações glicosídicas 1 $\rightarrow$ 3 (unidades A) e resíduos de  $\alpha$ -galactopiranosose unidos através de ligações 1 $\rightarrow$ 4 (unidades B). Esses resíduos são arranjados em uma seqüência alternada na forma (AB)<sub>n</sub> (PAINTER apud ASPINALL, 1983).

Além das algas vermelhas, outros organismos marinhos também apresentam expressivas quantidades de galactanas sulfatadas dentre os quais os invertebrados (POMIN, 2010; MOURÃO; PERLIN, 1987) e um grupo de plantas vasculares que ocorre no ambiente marinho (AQUINO et al., 2005).

### 3.1.2 *Gelidium crinale* (Turner) Lamouroux

*Gelidium crinale* é uma alga marinha vermelha pertencente ao reino *Protoctysta*, divisão *Rhodophyta*, classe *Florideophyceae*, ordem *Gelidiales*, família *Gelidiaceae*, gênero *Gelidium*, cuja exsicata se encontra depositada no Herbário Prisco Bezerra do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, sob o número 35.579.

Há aproximadamente 272 espécies no gênero *Gelidium* com ampla distribuição em águas tropicais e temperadas (SANTELICES, 1991), crescendo em

praias rochosas em profundidades de 0 a 17 m (McHUGH, 1991; SALINAS, 1991) (Figura 1).



**Figura 1.** Alga marinha vermelha *Gelidium crinale* (Turner) Lamouroux  
Fotografia: da autora, março de 2008.

### 3.2 Carboidratos

Os carboidratos são as biomoléculas mais abundantes da Terra, sendo compostos primariamente de átomos de carbono ligados a hidrogênio e grupos hidroxila. Nos vegetais, são sintetizadas pelo processo de fotossíntese, sendo convertidos, a cada ano, mais de 100 bilhões de toneladas de CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O em celulose e outros produtos vegetais. Certos carboidratos, como os açúcares simples e amido, são a base da dieta universal e a sua oxidação é a principal via metabólica fornecedora de energia para a maioria das células não-fotossintéticas (LEHNINGER; NELSON; COX, 2006).

Os carboidratos são predominantemente poliidroxiáldeídos ou poliidroxicetonas cíclicos, substâncias que liberam esses compostos por hidrólise. Muitos têm fórmulas empíricas (CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>; alguns contêm nitrogênio, fósforo ou enxofre. São divididos de acordo com o seu tamanho, em monossacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos, sendo a terminação “sacarídeo” derivada do grego *sakcharon* que significa açúcar.

As funções fisiológicas apresentadas pelos carboidratos incluem sua atuação como elementos estruturais e de proteção nas paredes celulares bacterianas e de vegetais e nos tecidos conjuntivos de animais; como lubrificante

das articulações esqueléticas e, quando ligados covalentemente a proteínas ou lipídios, como sinalizadores de localização intracelular ou do seu destino metabólico. Além disso, os carboidratos são matérias-primas importantes para as indústrias de madeira, papel, fibras têxteis, produtos alimentícios e farmacêuticos (LEHNINGER; NELSON; COX, 2006).

O advento da Glicobiologia tornou possível o avanço das pesquisas sobre estes compostos, revelando seu envolvimento no reconhecimento e sinalização celular, nos mecanismos moleculares de doenças genéticas ou adquiridas decorrentes de defeitos no metabolismo de carboidratos (galactosemia, intolerância à lactose e diabetes), bem como na ação farmacológica de alguns polissacarídeos e no desenvolvimento de novos compostos com ação terapêutica (POMIN; MOURÃO, 2006).

### **3.2.1 Polissacarídeos sulfatados**

Os polissacarídeos sulfatados compreendem um grupo complexo de macromoléculas com estrutura química rica em poliânions, sendo amplamente distribuídas entre os seres vivos. Por sua natureza química, apresentam inúmeras possibilidades de ligações a proteínas em solução tanto na matriz celular como no plasma sanguíneo (ARFORS; LEY, 1993).

No tocante à sua distribuição, os PLS podem ser encontrados no tecido conjuntivo de vertebrados na forma de glicosaminoglicanos (MATHEWS apud KLEINZELLER; SPRINGER; WITMANN, 1975), em menor quantidade nos em invertebrados (CÁSSARO; DIETRICH, 1977; MOURÃO; ASSREUY, 1995) e em grande quantidade nas algas marinhas na forma de galactanas e fucanas sulfatadas (PAINTER apud ASPINALL, 1983; PERVICAL; MCDOWELL, 1967).

Até pouco tempo, os estudos sobre PLS se mostraram voltados para expressão em mamíferos, algas e invertebrados marinhos. Acreditava-se que plantas superiores não apresentassem estas macromoléculas; no entanto, já existem relatos de PLS encontrados na espécie *Ruppia maritima*, uma angiosperma marinha que cresce em ambientes de elevada salinidade (AQUINO et al., 2005).

As algas marinhas são organismos que apresentam uma grande quantidade de PLS com propriedades biológicas já exploradas. Aqueles encontrados nas algas vermelhas (*Rhodophyta*) apresentam como açúcar mais representativo a galactose (resíduos de  $\alpha$ - e  $\beta$ -D-galactose), sendo classificados como galactanas

(PERCIVAL; MACDOWELL, 1967). Nas algas verdes (*Chlorophyta*) são compostos principalmente por unidades de D-manose e galactose (RAMANA; RAO, 1991), sendo classificados como arabinogalactanas. Já os polissacarídeos sulfatados abundantes das algas pardas (*Phaeophyta*), por terem a  $\alpha$ -L-fucose como monômero majoritário, são conhecidos por fucanas (PATANKAR et al., 1993; BOISSON-VIDAL et al., 1995; ROCHA et al., 2004).

A estrutura dos PLS de algas é complexa e heterogênea (BERTEAU; MULLOY 2003; PEREIRA; MULLOY; MOURÃO, 1999) em relação aos polissacarídeos de angiospermas e invertebrados marinhos, que são compostos de unidades repetidas que variam de maneira espécie-específica (MOURÃO 2004, 2007; AQUINO et al. 2005).

As carragenanas e agaranas são abundantes nas algas marinhas vermelhas, ambas apresentando uma cadeia linear com ligações alternadas do tipo 3-  $\beta$ -D-galactopiranosose e 4- $\alpha$ -galactopiranosose entre os resíduos, mostrando uma unidade repetitiva de dissacarídeos similar aos glicosaminoglicanos. As unidades de  $\beta$ -galactose são sempre D-enantiômeros, enquanto os resíduos de  $\alpha$ -galactose podem estar presentes nas configurações D- ou L- (USOV, 1998).

Assim como as fucanas das algas pardas, ocorre uma variação estrutural considerável nas galactanas sulfatadas de diferentes espécies e em amostras coletadas em ambientes distintos, ou em diferentes estações do ano. A principal variação nestes polissacarídeos está no padrão de sulfatação, onde a distribuição do sulfato ao longo da cadeia de galactose é totalmente heterogênea como nos glicosaminoglicanos animais, e as quantidades de sulfato são marcadamente diferentes entre as espécies (PEREIRA et al., 2005).

### **3.2.2 Atividades biológicas de polissacarídeos sulfatados**

As atividades anticoagulante e antitrombótica estão entre as propriedades mais estudadas dos polissacarídeos sulfatados na busca de encontrar um substituto à heparina (MOURÃO; PEREIRA, 2000), cujos efeitos indesejados (doenças cardiovasculares, trombocitopenia, propensão a hemorragias), associados ao aumento da incidência de doenças tromboembólicas no mundo, motivam a pesquisa de novos agentes anticoagulantes e antitrombóticos.

Outras atividades de importância significativa vêm sendo extensamente exploradas. Já foram demonstradas as atividades anti-hiperlipidêmica (YU et al., 2003), antiviral (SINHA et al., 2010; DAMONTE et al., 1994), antibacteriana (NAIR; CHABHADIYA; CHANDA, 2007; VENKATESWARLU et al., 2007), antitumoral (LINS, et al., 2009; ZHOU et al. 2004), antiproliferativa (COSTA et al., 2010), antimetastática (ZACHARSKI; ORNSTEIN, 1998), antioxidante (HU et al., 2010); antiangiogênica (LINHARDT; TOIDA apud WITEZAK; NIEFORTH, 1997; CUMASHI et al., 2007), antiaterosclerótica (ENGELBERG, 1991) e antinociceptiva (VIEIRA et al., 2004; VIANA et al., 2002).

A atividade antiinflamatória também já foi relatada para PLS. Tal atividade foi observada em fucanas sulfatadas através de uma potente inibição do sistema do complemento *in vitro* (BLONDIN et al., 1994; TISSOT; DANIEL, 2003) e do rolamento venular de leucócitos e da adesão endotelial de linfócitos induzida por zimosan, provavelmente via ligação a L- ou P-selectinas (ARUFFO et al., 1991; WESTON; PARISH, 1991). Também foi observado que a heterofucana sulfatada da marinha *Lobophora variegata* apresentou atividade antiinflamatória através da inibição da migração de leucócitos e do edema de orelha induzido por óleo de *Croton* (MEDEIROS et al., 2008).

Recentemente foi demonstrado que a galactana sulfatada da alga marinha *Champia feldmannii* apresenta atividade pró-inflamatória, promovendo edema de pata e aumento da permeabilidade, bem como migração de leucócitos para a cavidade peritoneal de ratos, sugestiva de ação imunoestimulante (ASSREUY et al., 2008), que foi posteriormente comprovada pela demonstração da atividade antitumoral deste PLS (LINS et al., 2009).

### **3.3 Resposta inflamatória**

Inflamação é uma reação de defesa do organismo à penetração de um agente infeccioso, entrada de um antígeno ou dano celular. A inflamação se constitui em um processo biológico fundamental, com o objetivo de destruir, imobilizar ou diluir o agente lesivo, e como o mais freqüente sinal de doença (KULINSKY, 2007). Em seus aspectos microscópicos, pode se definir ainda como “uma reação da microcirculação induzida por uma agressão aos tecidos, com a consequente



movimentação de elementos intravasculares, como fluidos, células e moléculas, para o espaço extravascular” (SIQUEIRA JR.; DANTAS, 2000).

Para fins didáticos, a resposta inflamatória pode ser classificada como aguda (do latim *acutus*) ou crônica (do latim *chronos* = tempo). As diferenças entre essas duas fases residem na duração, natureza da inflamação, células envolvidas e características do tecido lesado (ROCHA e SILVA, 1979; SIQUEIRA JR.; DANTAS, 2000).

A resposta inflamatória aguda é de curta duração, usualmente não excedendo de dois a três dias. Faz parte da imunidade inata induzida de caráter inespecífico, cuja sequência de eventos independe do tipo de agente agressor. Se o agente que evocou uma resposta inflamatória aguda não for eliminado, este tipo de resposta evolui para um quadro crônico, que pode ter longa duração. Em algumas doenças não tratadas a inflamação crônica pode durar meses a anos (ROBBINS; CONTRAN, 2005). Comumente, a resposta inflamatória aguda é a primeira linha de defesa do organismo

A inflamação aguda é de natureza exsudativa, caracterizada por aumento de permeabilidade vascular, que permite a saída de líquido e proteínas plasmáticas do compartimento intravascular para os tecidos; predominância de neutrófilos polimorfonucleares e um menor número de macrófagos no local afetado. O pH fisiológico do tecido (em torno de 7,2 a 7,4) tende a cair, tornando-se ácido (pH=6,5 ou menos) devido ao aumento de ácido láctico resultante da glicólise anaeróbica realizada por células inflamatórias. A estase sanguínea também permite o acúmulo de CO<sub>2</sub>, que contribui para a queda de pH. A resposta inflamatória crônica é caracterizada pela presença de células mononucleares (linfócitos, plasmócitos e macrófagos), fibroblastos, vasos sanguíneos neoformados e, em determinadas situações, fibras nervosas em estado de proliferação. A presença desses elementos celulares estabelece uma estreita relação entre a inflamação crônica e o processo de reparo. Por outro lado, o aumento da vascularização associado à inflamação crônica faz com que o pH se eleve, alcançando a neutralidade, ou ficando ligeiramente alcalino (KULINSKY, 2007; SIQUEIRA JR.; DANTAS, 2000).

Todas as respostas envolvidas nos eventos inflamatórios, em qualquer fase do processo, são originadas por mediadores químicos oriundos do plasma sanguíneo ou de células que se encontram no local da “lesão”, sejam elas constantemente presentes (residentes; ex.: fibroblastos, mastócitos e macrófagos)

ou não (migratórias; ex.: neutrófilos e eosinófilos). Estes mediadores participam da resposta inflamatória amplificando e influenciando sua evolução (BAUHMANN; GAULDIE, 1994).

Em determinadas condições fisiológicas ou patológicas, o processo inflamatório pode se tornar prejudicial às células normais do indivíduo, sendo necessário que os mediadores inflamatórios envolvidos sejam modulados negativamente. Isto justifica a busca de novas drogas que, idealmente, possam controlar as conseqüências nocivas do processo inflamatório.

### **3.3.1 Eventos celulares e vasculares da resposta inflamatória**

Após a agressão tecidual, as arteríolas sofrem vasoconstrição transitória, mediada por fibras autônomas simpáticas. Em sequência, ocorre uma vasodilatação, inicialmente arteriolar, com conseqüente aumento da pressão hidrostática vascular, que caracteriza a hiperemia no sítio da lesão. Com o aumento da pressão hidrostática ocorre transudação de fluidos com baixo conteúdo protéico do meio intravascular (nível dos capilares). À medida que o sangue passa pelos vasos, os capilares e as vênulas também se tornam dilatados (ROBBINS; CONTRAN, 2005; SIQUEIRA JR.; DANTAS, 2000).

Há um aumento da permeabilidade vascular (aumento do espaço interendotelial induzido pela contração de células endoteliais) devido à ação de mediadores químicos e da pressão intravascular aumentada. As vênulas são os principais vasos envolvidos neste aumento de permeabilidade mediado por substâncias vasoativas. Em conseqüência, ocorre a saída de fluido rico em proteínas (exsudato) para o meio extravascular. A exsudação resulta na redução do fluxo sanguíneo e no aumento da viscosidade do sangue. Igualmente, a saída anormal de fluidos dos vasos induz aumento da pressão hidrostática tecidual, com conseqüente formação de edema (RANG et al., 2007).

Os neutrófilos polimorfonucleares deixam sua posição axial natural no leito vascular e assumem uma posição mais periférica, próxima ao revestimento endotelial (marginação). A marginação de neutrófilos aumenta a resistência ao fluxo sanguíneo, favorecendo a estase vascular. Os neutrófilos são as primeiras células que deixam os vasos e penetram o local da injúria. Estas células fagocitam bactérias, substâncias estranhas, complexos imunes e tecidos degenerados, mas

também podem perpetuar a resposta inflamatória por liberar enzimas, mediadores químicos e radicais livres tóxicos (ROBBINS; CONTRAN, 2005).

Após a marginação, os neutrófilos aderem ao endotélio vascular para atravessá-lo. A adesão e migração de leucócitos são determinadas pela ligação a moléculas específicas de adesão expressas na superfície endotelial. Estas moléculas pertencem a três famílias distintas: (1) selectinas, (2) imunoglobulinas e (3) integrinas (TEDDER et al, 1995).

A expressão e a avidéz das moléculas de adesão sobre leucócitos e células endoteliais ocorrem na superfície destas células poucos minutos depois da exposição a mediadores químicos como histamina, leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) ou C5a. As selectinas P, L e E são as principais moléculas envolvidas na movimentação dos neutrófilos durante o processo inflamatório, as quais se ligam a moléculas sialil-Lewis<sup>x</sup>, componente glicídico de algumas glicoproteínas da superfície de neutrófilos. A interação das selectinas com as glicoproteínas faz com que o fagócito adira de forma reversível às paredes vasculares. Como a adesão é fraca, o leucócito passa a rolar sobre a superfície endotelial, fase chamada de rolamento (OLOFSSON et al., 1994; TEDDER et al, 1995).

A segunda etapa envolve interações entre as integrinas LFA-1 e CR3 presentes nos leucócitos com moléculas ICAM-1, expressas pelo endotélio ativado por citocinas. A adesão promovida pelo LFA-1 e CR3 é usualmente fraca, mas a interleucina 8 (IL-8) induz alterações conformacionais nestas moléculas, potencializando sua afinidade de ligação. VCAM-1, da família das imunoglobulinas, é expressa de 4 a 6 horas e está envolvida na adesão de leucócitos que expressam a integrina VLA-4. A adesão mediada por tais moléculas é mais firme e interrompe o rolamento dos leucócitos (TEDDER et al, 1995).

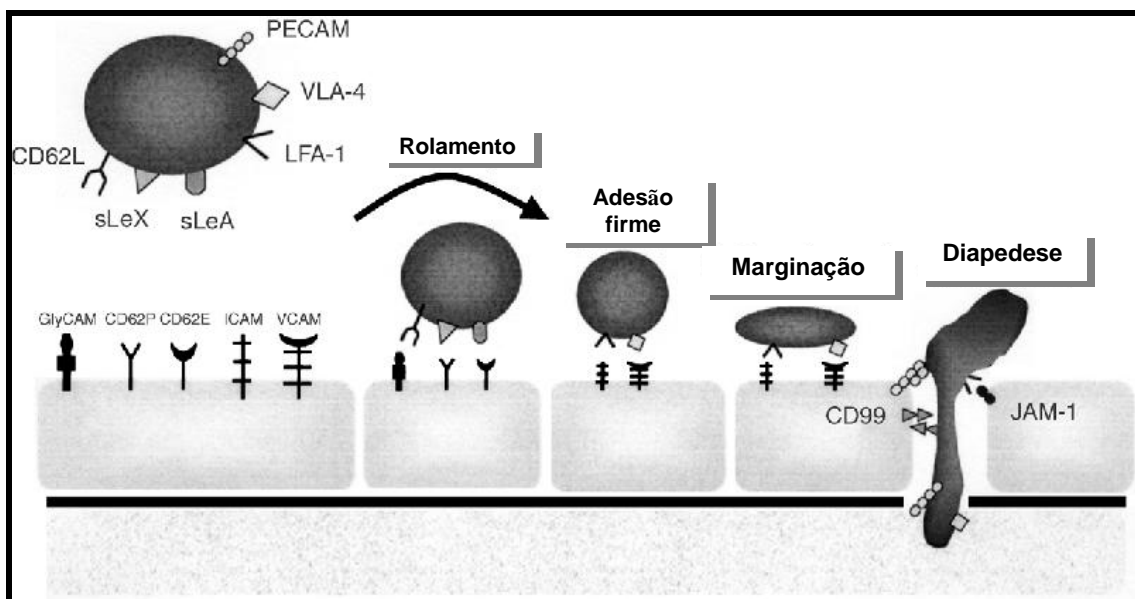
Em uma terceira etapa, o leucócito inicia a migração para o espaço extravascular. Isto envolve a presença da molécula CD31, expressa pelo leucócito e também nas junções intercelulares das células endoteliais. Após a adesão, a célula inflamatória emite pseudópodos, prolongamentos citoplasmáticos que permitem a sua locomoção, através das junções interendoteliais ampliadas pela ação de mediadores. Esta locomoção pode ser induzida por fatores liberados por diferentes tipos celulares, como IL-8 e proteína quimioatrativa de monócitos 1 (MCP-1). Atravessada a barreira endotelial, a célula fica entre esta e a membrana basal,

podendo permanecer momentaneamente nesta posição até passar a esta última, penetrando no tecido extravascular (SIQUEIRA JR.; DANTAS, 2000) (**Figura 2**).

Nas primeiras 24 h os neutrófilos predominam no local inflamado, sendo substituídos posteriormente por monócitos em 24 a 48 h. Tal sequência celular se deve principalmente ao curto ciclo de vida dos neutrófilos (apoptose após 24 a 48 h), maior concentração sanguínea de neutrófilos e maior velocidade de locomoção destas células (10-25µm/min) e à ativação de diferentes moléculas de adesão e fatores quimiotáticos específicos em períodos diferentes.

Uma vez no compartimento extravascular, os leucócitos podem fagocitar partículas estranhas (neutrófilos e macrófagos), tornar-se ativados (linfócitos e monócitos) ou deixar os tecidos via vasos linfáticos. Moléculas de superfície permitem a permanência de leucócitos no tecido inflamado. As integrinas VLA-4 e VLA-5 permitem a ligação de leucócitos à fibronectina, enquanto VLA-6 e VLA-2 permitem a ligação à laminina e ao colágeno, respectivamente (SIQUEIRA JR.; DANTAS, 2000).

Seguida a quimiotaxia, para que ocorra a fagocitose, faz-se necessário que os leucócitos reconheçam a partícula ou célula causadora da infecção promovendo, assim, a degradação e destruição do agente (ROBBINS; CONTRAN, 2005).



**Figura 2.** Adesão e diapedese de neutrófilos

Fonte: adaptado de <http://www.nature.com/ki/journal/v68/n2/images/4496115f2.gif>

### 3.3.2 Mediadores químicos da inflamação

Os mediadores inflamatórios são substâncias liberadas após agressão ou invasão tecidual, sendo responsáveis pela deflagração, condução e ampliação dos eventos inflamatórios. Podem ter origem plasmática ou tecidual (pré-formados ou sintetizados *de novo*) e agir tanto nas fases inicial e tardia do processo inflamatório agudo.

Os mediadores químicos envolvidos na inflamação, em geral, exercem suas funções biológicas por meio de ligação a receptores específicos sobre as células-alvo. Uma vez ativadas e liberadas, a maioria destas moléculas tem um ciclo de atividade curto, podendo haver diminuição de suas concentrações, inativação, inibição, neutralização e remoção (RANG et al., 2007; SIQUEIRA JR; DANTAS, 2000).

A seguir são apresentados alguns mediadores inflamatórios importantes envolvidos na resposta inflamatória aguda.

- **Aminas vasoativas**

Neste grupo, destacam-se a histamina e a serotonina.

A histamina é o mediador químico mais importante das fases iniciais da resposta inflamatória aguda. Isto se deve em grande parte, pelo fato de ser um mediador pré-formado, que se encontra estocado nos grânulos dos mastócitos e basófilos, ligado a um complexo heparina-proteína. Plaquetas após agregação, também podem liberá-la. Os estímulos que geralmente causam sua liberação são agentes físicos, reação imune mediada por Imunglobulina E, C3a e C5a, LPS e Interleucina 1 (IL-1). A histamina causa dilatação de pequenos vasos e aumento da permeabilidade vascular, principalmente agindo sobre os receptores H<sub>1</sub> e H<sub>2</sub> (RANG et al, 2007; SIQUEIRA JR; DANTAS, 2000).

A serotonina (5-HT) é liberada pela degranulação de mastócitos e por plaquetas, quando estas são ativadas, em casos de lesão tecidual. Nos vasos, podem atuar sobre o endotélio induzindo a liberação de óxido nítrico (NO) ou inibindo a liberação de noradrenalina das terminações nervosas. Promove agregação plaquetária, apresentando ação ambígua sobre os vasos: vasoconstrição quando em endotélio intacto e vasodilatação quando há dano endotelial. A sua ação sobre os vasos se deve principalmente à ação sobre o receptor do tipo 5-HT<sub>2</sub> (RANG et al, 2007).

- **Derivados do ácido araquidônico (eicosanóides)**

Após a ativação celular por uma variedade de estímulos, os lipídios da membrana citoplasmática são rapidamente remodelados e geram mediadores lipídicos biologicamente ativos. O ácido araquidônico (AA) é a principal fonte formadora de eicosanóides da inflamação; é um ácido graxo de 20 átomos de carbono liberado por meio da enzima fosfolipase A<sub>2</sub> após estímulos mecânicos, físicos ou químicos. Uma vez liberado, o AA pode ser oxidado por duas vias: da ciclooxigenase (gerando prostaglandinas e tromboxanos) e da lipoxigenase (gerando leucotrienos e lipoxinas) (RANG, et al., 2007; SIQUEIRA JR., DANTAS, 2000).

As prostaglandinas se apresentam subdivididas em vários tipos, sendo os mais relevantes para o processo inflamatório a PGI<sub>2</sub> (prostaciclina), PGE<sub>2</sub> e PGD<sub>2</sub>. Todas elas causam vasodilatação, sendo que a PGI<sub>2</sub> e a PGE<sub>2</sub> são produzidas por tecidos e vasos sanguíneos locais e promovem aumento da permeabilidade vascular potencializando o efeito da histamina e bradicinina sobre as vênulas pós-capilares, além de inibição da agregação plaquetária. A PGD<sub>2</sub> é liberada por mastócitos e potencializa formação de edema. Já o tromboxano A<sub>2</sub> é um ativador da agregação plaquetária e potente vasoconstritor, sendo importante no processo de hemostasia (KULINSKY, 2007; RANG et al., 2007).

Os leucotrienos se apresentam no processo inflamatório basicamente nos subtipos C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> e E<sub>4</sub>, que causam vasoconstrição, broncoespasmo e aumento da permeabilidade celular e LTB<sub>4</sub>, um potente agente quimiotático para neutrófilos polimorfonucleares, eosinófilos e monócitos. O papel das lipoxinas é incerto, tendo em vista que podem apresentar efeitos pró e anti-inflamatórios: lipoxina A (LXA) induz vasodilatação e lipoxina B (LXB) pode bloquear a atividade de células *Natural Killer* (NK) (SIQUEIRA, JR.; DANTAS, 2000).

- **Fator ativador de plaquetas (PAF)**

O PAF pode ser rapidamente produzido após estímulos, tais como formação de complexo imune, presença de trombina, colágeno ou outros mediadores químicos, sendo as principais células envolvidas na sua produção mastócitos, basófilos, neutrófilos, monócitos, células endoteliais, plaquetas e eosinófilos. O PAF ativa a degranulação de mastócitos e induz quimiotaxia, promove vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, além de induzir agregação de plaquetas, favorecendo a hemostasia após lesão vascular

(KULINSKY, 2007; SIQUEIRA JR; DANTAS, 2000).

- **Óxido nítrico (NO)**

O NO é uma radical livre produzido por células endoteliais, macrófagos e alguns neurônios específicos no cérebro. Nos processos inflamatórios, o NO produzido é devido à expressão da isoforma induzida da enzima óxido nítrico sintase (iNOS), principalmente pela estimulação de citocinas (NATHAN, 1997; THIEMERMAN, 1997). O NO tem participação no controle do fluxo sanguíneo (FORTES; HYSLOP; DENNUCI apud BRAIN; PAGE, 1994) e do aumento da permeabilidade vascular induzida por PAF e pela própria bradicinina (MAYHAN, 1992). Dependendo de sua expressão, o NO pode ter efeitos benéficos ou maléficos sobre o organismo (BECKMAN; KOPPENOL, 1996).

- **Citocinas**

As citocinas desempenham um importante papel na inflamação, estando envolvidas no controle de quase todas as substâncias reguladoras e efetoras das reações inflamatórias. Geralmente, a ação de citocinas é para- e/ou autócrina, mas também circulam no plasma sanguíneo. São representadas pelo fator de crescimento transformador- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e o fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF), e na inflamação também estão incluídos TNF- $\alpha$ , as interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6) e M-CSF (KULINSKY, 2007).

TNF- $\alpha$  e IL-1 são secretadas principalmente por macrófagos e ativam células sanguíneas (neutrófilos, eosinófilos, basófilos e plaquetas), mastócitos do tecido conjuntivo, e endotélio, enquanto que a IL-6 estimula a síntese de proteínas inflamatórias de fase aguda nos hepatócitos e inibe a apoptose (HODGE; HURT; FARRAR, 2005). Já o TGF- $\beta$ , IL-4, 10 e 13 são consideradas citocinas antiinflamatórias, podendo inibir a produção de outras citocinas (MARQUES; CIZZA; STERNBERG, 2007).

As quimiocinas são citocinas envolvidas na quimiotaxia de células inflamatórias. São produzidas principalmente nos leucócitos e células endoteliais, sendo as mais importantes IL-8, MCP-1, TNF- $\alpha$  e TNF- $\beta$ , proteína inflamatória de macrófagos (MIP), etc. Além de quimioatrativas para alguns tipos de leucócitos, as

quimiocinas estimulam a maturação e ativação de células, diferenciação de células imunes, angiogênese e auxiliam nos processos de regeneração (KULINSKY, 2007).

- **Cininas**

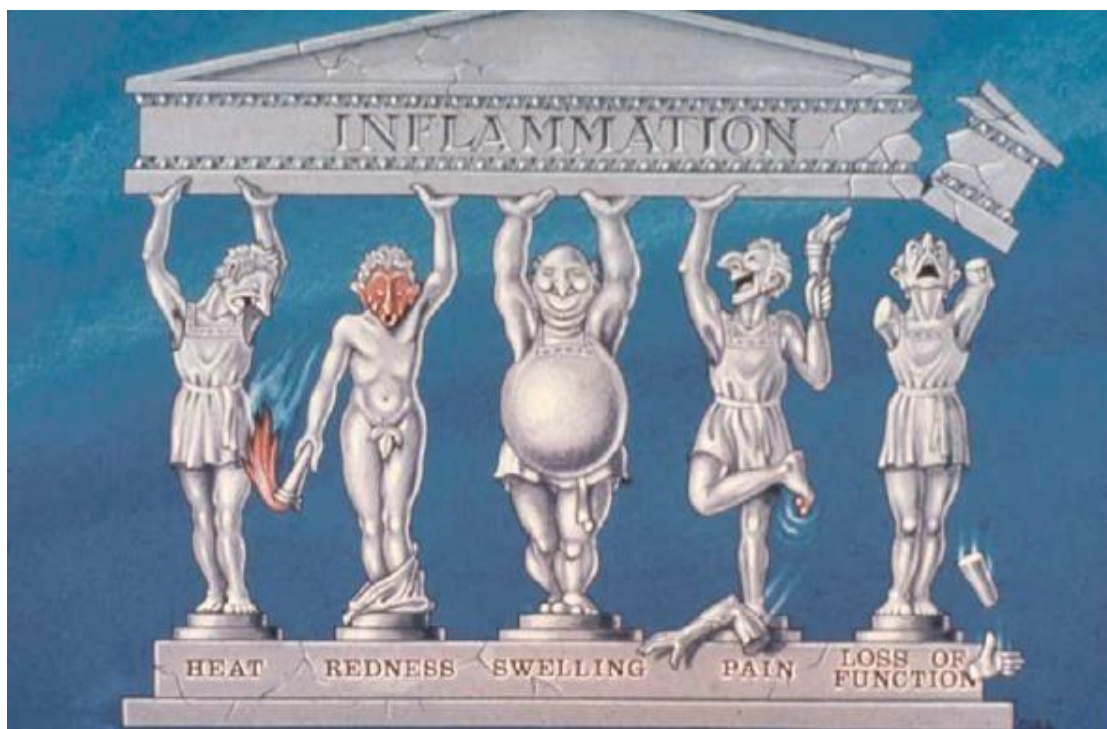
A bradicinina é sintetizada a partir do fator de Hageman, fator XII da cascata de coagulação e apresenta ação potente sobre a permeabilidade vascular, além de promover vasodilatação arteriolar e causar quimiotaxia para células inflamatórias. A bradicinina também pode induzir dor por ação direta sobre as fibras nervosas. Sua atuação se dá através dos receptores B1, cuja expressão é induzida na presença de inflamação e lesão tecidual, principalmente por ação da IL-1 (RANG et al., 2007).

### **3.3.3 Sinais cardinais da inflamação**

No primeiro século d.C., Celsus, um escritor romano, descreveu os quatro sinais cardinais da inflamação: calor, rubor, tumor e dor. Posteriormente, um outro sinal clínico, a perda da função, foi descrita por Virchow. Cada um destes sinais se deve à interação dos processos vascular e celular que ocorrem durante as duas fases da inflamação (ROCHA e SILVA, 1979; SIQUEIRA JR.; DANTAS, 2000).

O calor e o rubor são caracterizados pelo aumento da temperatura local e eritema, respectivamente, devidos à vasodilatação. O tumor ou edema é conseqüente ao aumento da permeabilidade vascular; a dor se deve à ação direta de mediadores químicos sobre as fibras nervosas ou devido ao aumento da permeabilidade vascular. O edema tecidual comprime as terminações nervosas livres, sendo a principal causa de dor associada à inflamação na maioria dos tecidos. E a perda da função, total ou parcial, é devida ao edema e dor associados. Em determinadas regiões do organismo, estados inflamatórios podem estar presentes sem a manifestação de todos estes sinais (SIQUEIRA JR.; DANTAS, 2000) (**Figura 3**).





**Figura 3.** Ilustração cômica dos cinco sinais cardinais da inflamação. Da esquerda para a direita: calor, rubor, edema, dor e perda da função.

Fonte: [http://www6.ufrgs.br/favet/imunovet/molecular\\_immunology/inflammation\\_cartoon.jpg](http://www6.ufrgs.br/favet/imunovet/molecular_immunology/inflammation_cartoon.jpg)

### 3.4 Dor inflamatória

A transmissão do estímulo doloroso ao sistema nervoso central envolve interações complexas com estruturas periféricas ativadas pela estimulação térmica, mecânica ou química, e centrais da superfície da pele ao córtex cerebral central (FÜRST, 1999). As células responsáveis pela captação destes estímulos são chamadas de nociceptores e estão localizadas na pele, músculos, vasos, fáscia, juntas e vísceras (GRUBB, 1998; BENSSON, 1999). Esses nociceptores apresentam terminações de neurônios mielinizados (fibras A), mas principalmente desmielinizadas (fibras C), que se caracterizam por não apresentar acomodação, e sim facilitação e aumento de sensibilidade por estímulos contínuos. O sinal doloroso proveniente da periferia, em decorrência da ativação de um dos tipos de nociceptores, é integrado a nível medular e a seguir projetado para o encéfalo pelo sistema ântero-lateral (GREGOR; WINDHORST, 1996). Além do trajeto pela via clássica, existem outras rotas possíveis envolvendo diferentes estruturas nervosas (BENSSON, 1999).

A intensidade da sensação dolorosa está diretamente relacionada à capacidade do estímulo de ocasionar dano tecidual, ocasião em que há liberação de mediadores químicos no local, a partir de terminações sensoriais primárias e células não neuronais como fibroblastos, mastócitos, neutrófilos e plaquetas. Entre os mediadores envolvidos nesse sinal estão os produtos da cascata do ácido araquidônico, como prostaglandinas e leucotrienos. O trauma também produz destruição de plaquetas, causando a liberação de serotonina, que age como vasodilatador, provocando edema local. Outros mediadores nociceptivos incluem a substância P, a histamina, a somatoquinina, os polipeptídeos vasoativos e a colecistoquinina, presentes em um pequeno diâmetro não mielinizado de neurônios aferentes primários que terminam no corno dorsal superficial. (HOKFELT; JOHANNSON; LJUNGDAHL, 1980; HUNT; KELLY; EMSOM, 1981). A liberação destas substâncias dos terminais periféricos destes nervos produz pápula cutânea e rubor, muito freqüentemente observados na dor provocada por trauma.

A ação direta ou indireta de mediadores químicos produzidos ou liberados em seguida ao dano tecidual, ou a ação de irritantes exógenos (formalina, ácido acético, capsaicina, venenos, etc.), são os grandes responsáveis pela multiplicidade de eventos que ocorre durante a transmissão da dor. Destacam-se: vasoconstrição, vasodilatação, contração muscular, edema, ativação de canais iônicos, alteração de permeabilidade iônica membranar, pápula, rubor, entre outros (FURST, 1999; MILLAN, 1999; CALIXTO et al., 2004). Além desses, demonstrou-se a importância de certas citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-8 e IL-4) na mediação da nocicepção resultante da estimulação de células residentes (THOMAZZI et al., 1997). Esses mediadores podem ser classificados em dois tipos: agentes ativadores diretos e agentes hiperalgésicos ou sensibilizadores de nociceptores (MONCADA et al., 1976). É provável que a sensibilização dos nociceptores seja um fator importante nas muitas formas de dor inflamatória.

O papel da dor inflamatória no processo de defesa do organismo é, claramente, o de sinalizar a ocorrência de dano tissular iminente, limitando a movimentação com o objetivo de reduzir a disseminação do agente etiológico ou de prevenir futuras lesões tissulares.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais

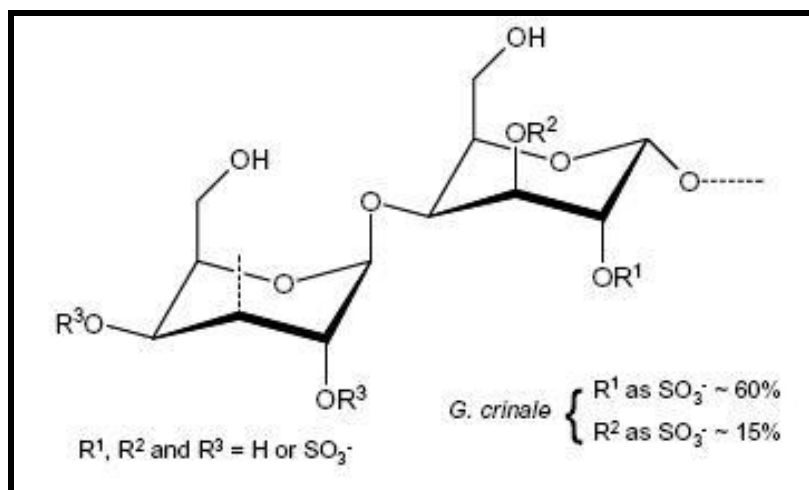
Foram utilizados ratos Wistar machos (250-300g) nos protocolos de inflamação e camundongos Swiss albinos (25-30g) nos protocolos de nocicepção. Os animais foram provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC) e permaneceram alojados no Biotério do Instituto Superior de Ciências Biomédicas (ISCB) da Universidade Estadual do Ceará (UECE), sob condições adequadas de luz (ciclo claro/escuro de 12 horas) e temperatura, com água e ração *ad libitum*.

Todos os protocolos experimentais (modelos de inflamação e nocicepção) foram realizados no Laboratório de Fisiologia-Farmacologia da Inflamação (ISCB-UECE), sendo previamente aprovados pelo Comitê de Ética da UECE (parecer nº. 05159924-4) e realizados sempre entre 08:00 h e 17:00 h precedidos de 1 hora de ambientação dos animais.

### 4.2 Galactana sulfatada de *Gelidium crinale*

A alga marinha vermelha *G. crinale* foi coletada em rochas do meso-litoral durante maré baixa na Praia do Pacheco, município de Caucaia-CE. A extração dos polissacarídeos sulfatados totais foi realizada segundo a metodologia descrita por Farias et al. (2000) e a purificação da galactana sulfatada foi realizada por cromatografia de troca iônica em gel de DEAE-celulose (PEREIRA et al., 2005), no Laboratório de Carboidratos e Lectinas (CARBOLEC) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará (UFC).

A estrutura da galactana sulfatada de *G. crinale* foi obtida através do método de ressonância magnética nuclear (NMR), apresentando-se como um polissacarídeo linear contendo unidades alternadas de  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3) e  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-galactopiranoses. A galactana mostrou um padrão de sulfatação variado, conferindo elevada heterogeneidade a este polissacarídeo, sendo os resíduos de 2,3-dissulfato representantes de aproximadamente 15% do total de unidades da galactana (PEREIRA et al., 2005).



**Figura 4.** Estrutura da galactana sulfatada de *Gelidium crinale*.  
Fonte: adaptado de Pereira et al., (2005).

### 4.3 Drogas e reagentes

Dextrana (de *Leuconostoc mesenteroides*; Mm= 64,000), carragenina  $\lambda$ , zimosan (de *Saccharomyces cerevisiae*), azul de Evans, bradicinina, histamina, serotonina (5-hidroxitriptamina), composto 48/80, fosfolipase  $A_2$ , L-nitro-arginina metil éster (L-NAME), L-arginina, formalina, hidrocloreto de morfina e hidrocloreto de naloxona obtidos da Sigma Chemical Company, St. Louis, USA; indometacina (Indocid®) obtida da Merck Sharp & Dohme, Northumberland, UK.

Todas as drogas foram dissolvidas em Cloreto de Sódio a 0,9% adquirido da indústria Isofarma, com exceção da indometacina, que foi dissolvida em dimetilsulfóxido (DMSO). Todos os reagentes utilizados foram de pureza analítica.

### 4.4 Avaliação da atividade da galactana sulfatada de *G. crinale* em modelos experimentais de inflamação em ratos

#### 4.4.1 Modelo de Edema de Pata

Este modelo foi utilizado para avaliar a capacidade da galactana sulfatada em estimular a formação de edema *per si* ou de inibir o edema induzido por agentes flogísticos, bem como o extravasamento de proteínas plasmáticas como medida indireta de aumento na permeabilidade vascular. O envolvimento de mediadores inflamatórios de fase inicial e tardia também foi avaliado neste modelo.

Na avaliação do edema de pata, os volumes de líquido deslocados pelas patas direitas de cada animal foram medidos por pletismometria antes (tempo zero) e após 30 min., 1-8h ou 24 h do desenvolvimento do edema provocado pela injeção subcutânea intraplantar (s.c.) dos estímulos inflamatórios (dextrana - 300 $\mu$ /pata; composto 48/80 – 10  $\mu$ g/pata; carragenina- 300  $\mu$ /pata; e zimosan – 1 mg/pata) ou da galactana sulfatada (0,01; 0,1 e 1 mg/Kg). O edema foi calculado como a diferença entre a medida dos volumes (mL) de líquido ou da área sob a curva-ASC dose-resposta (unidades arbitrárias) usando o método do Trapézio (LANDUCCI et al., 1995), nos vários tempos após o estímulo e antes do estímulo (tempo zero).

Na avaliação da alteração de permeabilidade vascular, os animais receberam azul de Evans (25 mg/Kg) por via sistêmica (seio venoso peniano) 1 hora antes do sacrifício, o qual foi realizado na hora de melhor inibição ou indução do edema de pata pela galactana sulfatada. Em seguida, as patas foram seccionadas abaixo do maléolo, pesadas e incubadas em formamida (1mL) a 37°C por 72 horas. A quantificação do azul de Evans extraído dos tecidos foi realizada por espectrofotometria ( $A_{600nm}$ ). Os dados obtidos em absorbância foram convertidos em  $\mu$ g de azul de Evans/g de pata, através de regressão linear baseado em uma curva padrão de azul de Evans (WILHELM, 1962).

#### **a) Avaliação da atividade edematogênica da galactana sulfatada de *G. crinale***

A galactana foi administrada como estímulo por via s.c., nas patas direitas dos animais, nas doses de 0,01; 0,1 e 1 mg/pata. O grupo controle negativo do edema recebeu salina (s.c.) na pata contralateral.

#### **b) Avaliação da atividade antiedematogênica da galactana de *G. crinale***

A galactana sulfatada foi administrada por via endovenosa (e.v.) nas doses de 0,01; 0,1 ou 1 mg/Kg (0,1mL/100g de massa corporal), 30 min antes da aplicação s.c. dos agentes flogísticos de natureza osmótica: dextrana (LO; ALMEIDA, BEAVEN, 1982) e composto 48/80 (MALING et al., 1974), ou celular: carragenina (LO; ALMEIDA, BEAVEN, 1982) e zimosan (DAMAS; PRUNESCO, 1990). Ao controle positivo do edema foi administrado o agente flogístico e ao controle negativo foi administrada salina estéril, ambos por via s.c., nas patas direita e esquerda, respectivamente.

### **c) Avaliação do efeito da galactana sulfatada de *G. crinale* sobre as alterações de permeabilidade vascular**

Foram utilizados dois protocolos: na avaliação da atividade anti-inflamatória, a galactana foi administrada por via e.v. na dose de 1 mg/Kg (melhor dose anti-inflamatória), 30 min antes da injeção de dextrana (300 µg/pata); na avaliação da atividade pró-inflamatória, a galactana foi o próprio estímulo (injeção local, s.c.). Os controles positivos se constituíram dos animais que receberam a dextrana ou a galactana sulfatada, e o negativo dos animais que receberam salina, ambos por via s.c.

### **d) Avaliação do envolvimento de mediadores inflamatórios no efeito antiedematogênico da galactana sulfatada de *G. crinale***

Os animais foram pré-tratados com a galactana na dose de melhor efeito antiedematogênico, 30 min antes da indução do edema de pata por mediadores inflamatórios de fase inicial (histamina, serotonina, bradicinina) ou ainda por catalisadores ou precursores de mediadores de fase tardia como NO e metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas) envolvidos nos edemas induzidos por dextrana e carragenina nas doses a seguir: histamina (100 µg/pata), serotonina (20 µg/pata), bradicinina (30 µg/pata), fosfolipase A<sub>2</sub> (30 µg/pata) e L-arginina (15 µg/pata) (CUZZOCREA et al., 1997; MALING et al., 1974).

## **4.5 Avaliação da toxicidade da galactana sulfatada de *G. Crinale***

Para o desenvolvimento deste ensaio, foram utilizados dois grupos de 7 ratos cada. O grupo experimental recebeu a galactana na dose de melhor efeito anti-inflamatório (1 mg/mL) por um período de 10 dias por via e.v. (veias peniana e caudal), em dose única diária (0,1mL da solução/ 100g de peso corporal), enquanto o grupo controle recebeu o mesmo volume de salina estéril.

Os procedimentos iniciais de pesagem dos animais e órgãos, bem como a coleta da amostra de sangue, foram realizados no Laboratório de Físio-Farmacologia da Inflamação (LAFFIN). Já as análises hematológicas e bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas (LACT) da UFC, segundo procedimentos operacionais padrão (POP).

No último dia de tratamento ( $D_{10}$ ) os animais foram submetidos a um jejum de 8 horas e após este período foram avaliados os seguintes parâmetros:

**a) Peso corporal e de órgãos:**

Os animais foram pesados antes e após o tratamento com a galactana sulfatada. Após o sacrifício, os órgãos (fígado, baço, rim, estômago e coração) foram removidos ainda úmidos e pesados, sendo o peso de cada órgão expresso por 100 g de peso corporal. Foram também observadas possíveis alterações macroscópicas como vermelhidão e focos hemorrágicos nos órgãos removidos.

**b) Parâmetros hematológicos e bioquímicos**

**b.1) Obtenção das amostras**

Após jejum de 8h, os animais foram levemente anestesiados para a coleta de sangue pelo plexo orbital. Para as determinações bioquímicas, coletou-se sangue heparinizado, o qual foi centrifugado a 3500 rpm durante 15 minutos e o plasma separado para as dosagens. Já para as análises hematológicas, coletou-se sangue total em Ependorff® contendo EDTA, sendo este o anticoagulante de escolha para análise de tais parâmetros. O sangue total também foi utilizado para a confecção de extensões sanguíneas destinadas a contagem diferencial dos leucócitos.

**b.2) Procedimentos Analíticos**

As análises bioquímicas de função renal (uréia e creatinina) e de função hepática (AST, ALT e proteínas totais) foram realizadas em aparelho semi-automático Labquest®, cuja metodologia baseia-se no princípio da absorbância. Para tanto, utilizou-se reagentes enzimáticos colorimétricos ou cinéticos, seguindo as recomendações técnicas contidas nos *kits* dos fabricantes.

As quantificações dos parâmetros hematológicos (hematócrito, hemoglobina, hemácias, plaquetas e leucócitos totais) foram realizadas no aparelho semi-automático Sysmex® modelo KX-21N, o qual utiliza a impedância como metodologia. As extensões sanguíneas foram coradas pelo método panótico (Laborclin®) e a morfologia celular, bem como a contagem diferencial dos leucócitos foram realizadas no microscópio óptico Olympus® BX 41.

## **4.6 Avaliação da atividade da galactana sulfatada de *G. crinale* em modelos experimentais de nocicepção em camundongos**

### **4.6.1 Teste da formalina**

O teste da formalina permite avaliar dois tipos de dor: uma de origem neurogênica, como resultado da estimulação direta dos neurônios nociceptivos, observada nos primeiros 5 min após a administração da formalina (fase inicial), e outra de origem inflamatória, caracterizada pela presença de mediadores inflamatórios, observada entre 15 e 30 min após a injeção da formalina (fase tardia) que representa a resposta tônica à dor (HUNSKAAR; ROLE, 1987). Para excluir fatores experimentais que, eventualmente, pudessem afetar o fluxo sanguíneo periférico devido à grande sensibilidade da fase tardia, os testes foram realizados à temperatura ambiente de 22-28°C (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001).

O teste da formalina consiste na injeção de 20 µl de formalina (s.c.; 2,5% v/v) na pata traseira dos camundongos e no registro do tempo, transcorrido em segundos, no qual os animais passam lambendo a pata durante as fases inicial e tardia. Logo após a injeção de formalina, os animais são colocados, individualmente, sob campânulas transparentes ao lado de espelhos para facilitar a observação.

A avaliação do efeito da galactana foi realizada após injeção da mesma em camundongos nas doses de 0,1; 1 e 10 mg/Kg por via e.v., 30 min antes da injeção intraplantar de formalina. Os animais controle receberam salina estéril pela mesma via.

A participação do sistema opióide no efeito da galactana foi avaliada após o tratamento i.p. dos camundongos com naloxona (13,7 µmol/Kg), um antagonista não-seletivo de receptores opióides, 30 min antes da administração e.v. da galactana (10 mg/Kg) ou 15 min antes da administração i.p. de morfina (13,3 µmol/Kg), um agonista não-seletivo de receptores opióides. Decorrido o tempo após a administração da galactana ou da morfina, os animais foram testados.

### **4.6.2 Teste da placa quente**

Este teste é utilizado para pesquisar substâncias que agem em nível de Sistema Nervoso Central (EDDY; LEIMBACH, 1953). O método consiste em dispor



os camundongos sobre uma placa quente ( $50 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ) e observar o tempo em que os animais levam para manifestar reações (balançar, lambear ou morder as patas posteriores, e/ou saltar sobre a placa) ao estímulo térmico.

No dia anterior ao experimento foram selecionados apenas os animais que apresentaram uma das reações anteriormente citadas, em um intervalo de tempo de até 15 seg, delimitadas como resposta basal.

Os animais foram tratados e.v. com a galactana na dose de 10 mg/Kg e o aumento da latência da resposta ao estímulo térmico foi avaliado colocando-se os camundongos sobre a placa quente imediatamente antes e 30, 60, 90, 120 e 150 min após o tratamento com a galactana. Os animais controle do experimento receberam salina estéril por via e.v., ou morfina (5 mg/Kg) por via i.p.

#### **4.6.3 Hipernocipação mecânica**

Este método é utilizado para avaliar a sensibilidade tecidual ao estímulo mecânico, no sentido de observar a influência de drogas sobre a resposta nociceptiva dos animais. Ele reproduz, experimentalmente, a dor de cunho inflamatório (VIVANCOS et al., 2004).

O método consiste em dispor os animais em caixas de acrílico com assoalho de rede de malha não maleável e aplicar, por entre as malhas da rede, uma pressão linearmente crescente no centro da planta da pata do camundongo com um filamento flexível de von Frey até que o mesmo produza uma resposta caracterizada como sacudida ou retirada da pata estimulada. Os estímulos são repetidos por até 6 vezes e se contabiliza o número de respostas apresentadas pelo animal.

A escolha do filamento flexível foi realizada por teste prévio através da indução de hipernocicepção com carragenina (300  $\mu\text{g/pata}$ ) em camundongos. Foram testados os filamentos de 0,4 e 0,8 mm, sendo o último considerado ideal, com resposta acima de 50%.

Os animais foram pré-tratados com a galactana (10 mg/Kg; e.v.) 30 minutos antes da administração s.c. de carragenina. A avaliação dos animais foi feita imediatamente antes (tempo zero) e 1 e 3 horas após a injeção do estímulo.

#### **4.7 Análise estatística**

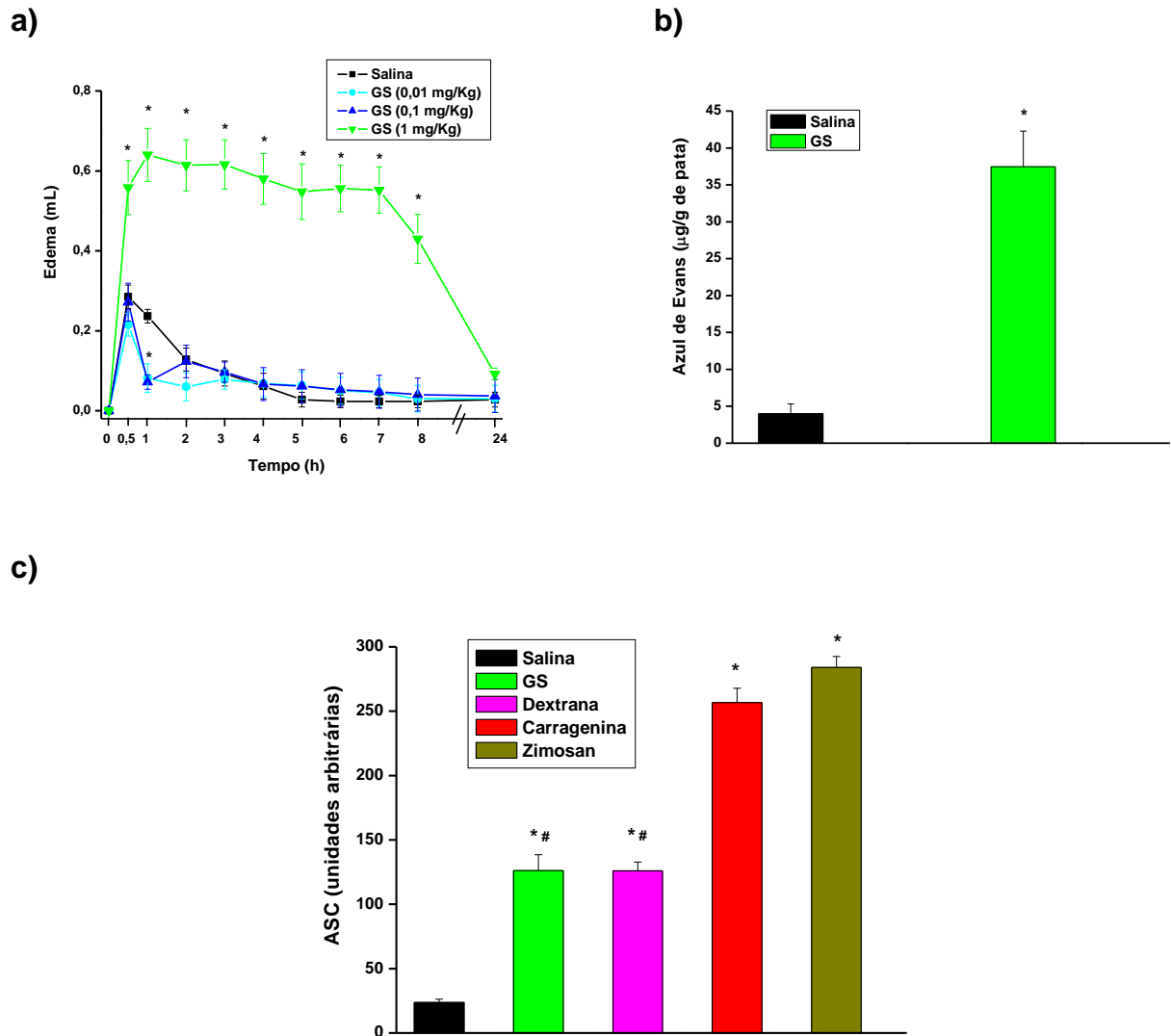
A análise estatística e a construção dos gráficos foram realizadas com o auxílio do software Origin 7.0<sup>®</sup> (OriginLab). Os resultados estão apresentados como Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (EPM) de n experimentos. Diferenças significantes, consideradas para valores de  $p < 0,05$ , foram determinadas utilizando-se Análise de Variância (ANOVA), seguido do teste corretivo de Bonferroni.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. A galactana sulfatada de *Gelidium crinale* injetada por via local apresenta atividade edematogênica e induz aumento de permeabilidade vascular

A galactana sulfatada (GS) de *G. crinale* injetada localmente por via s.c. em três diferentes doses (0,01; 0,1 e 1 mg/Kg) induziu significativo edema de pata, mas apenas na maior dose em relação ao controle de salina. A atividade edematogênica se mostrou significativa já nos 30 min iniciais (GS:  $0,56 \pm 0,06$  mL; salina:  $0,29 \pm 0,03$  mL), se apresentou máxima na 1ª h (GS:  $0,64 \pm 0,06$  mL; salina:  $0,243 \pm 0,01$  mL) e se estendeu até a 8ª h (GS:  $0,43 \pm 0,06$  mL; salina:  $0,02 \pm 0,02$  mL). Nas horas subsequentes, observou-se declínio nos valores de edema, apresentando completa resolutividade na 24ª h (GS:  $0,09 \pm 0,01$  mL; salina:  $0,03 \pm 0,02$  mL) (**Figura 5a**). A atividade edematogênica da galactana de *G. crinale* foi acompanhada de aumento significativo de permeabilidade vascular ( $37,5 \pm 4,8$  µg/g de pata) comparado ao controle ( $4,0 \pm 1,3$  µg/g de pata) (**Figura 5b**).

Observou-se que a galactana sulfatada de *G. crinale* apresenta atividade edematogênica semelhante à dextrana (ASC: GS:  $126,2 \pm 12,3$ ; dextrana:  $126 \pm 6,8$ ) e inferior ao zimosan (ASC:  $284 \pm 8,6$ ) e à carragenina (ASC:  $256,8 \pm 11,0$ ), correspondendo a 44% e 49% da capacidade edematogênica destes agentes, respectivamente (**Figura 5c**). A dextrana e o zimosan são polissacarídeos não-sulfatados derivado da bactéria *Leuconostoc mesenteroides* e da parede do fungo *Saccharomyces cerevisiae*, respectivamente, e a carragenina é um polissacarídeo sulfatado derivado de algas marinhas.

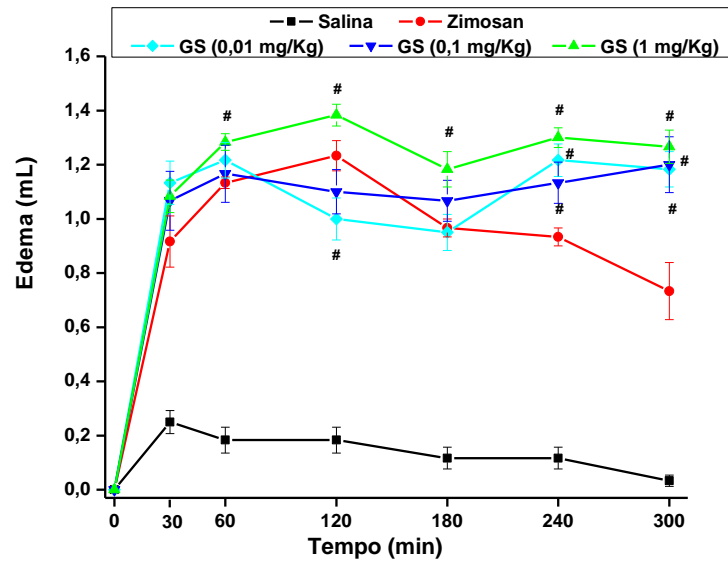


**Figura 5. A galactana sulfatada de *G. crinale* induz edema e aumento de permeabilidade vascular. (a)** edema (mL) induzido pela galactana (0,01; 0,1 e 1 mg/Kg; s.c.); **(b)** aumento de permeabilidade vascular ( $\mu\text{g/g}$  de pata) induzido pela galactana (1 mg/Kg; s.c.); **(c)** comparação do efeito da galactana (1 mg/Kg) com os agentes inflamatórios dextrana (300  $\mu\text{g/pata}$ ; s.c.), carragenina (300  $\mu\text{g/pata}$ ; s.c.) e zimosan (1 mg/pata; s.c.) (ASC-unidades arbitrárias). Média  $\pm$  E.P.M. (n= 6). \* $p > 0,05$  em relação à salina; # $p > 0,05$  em relação à carragenina e zimosan. GS: galactana sulfatada de *G. crinale*.

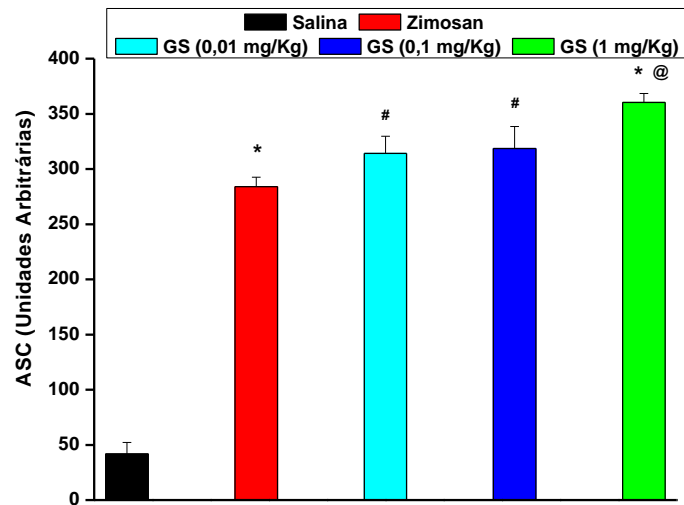
## 5.2 A galactana sulfatada de *Gelidium crinale* injetada por via sistêmica não inibe o edema de pata induzido por zimosan

Zimosan promoveu edema significativo ( $0,92 \pm 0,09$  mL) a partir de 30 min, com efeito máximo na 2ª h ( $1,2 \pm 0,06$  mL) em relação a salina ( $0,25 \pm 0,04$  mL). O tratamento e.v. com a galactana (0,01; 0,1 e 1 mg/Kg) não inibiu todo o curso edematogênico induzido por este estímulo, mas na dose de 0,01mg/Kg ( $1,0 \pm 0,07$  mL) preveniu a formação do edema de maneira discreta (19%), embora significativa somente na 2ª h (**figura 6a**). Ao contrário, observou-se que a galactana na dose de 1mg/Kg potencializou significativamente o edema induzido por zimosan durante todo o curso temporal (ASC: GS:  $360 \pm 8,1$ ; zimosan:  $284 \pm 8,6$ ), bem como nas doses de 0,01 e 0,1 mg/Kg na 4ª ( $1,2 \pm 0,06$  mL;  $1,1 \pm 0,07$  mL, respectivamente; Zimosan:  $0,9 \pm 0,03$  mL) e 5ª h ( $1,2 \pm 0,06$  mL;  $1,2 \pm 0,1$  mL, respectivamente; Zimosan:  $0,7 \pm 0,1$  mL) (**Figura 6b**).

a)



b)



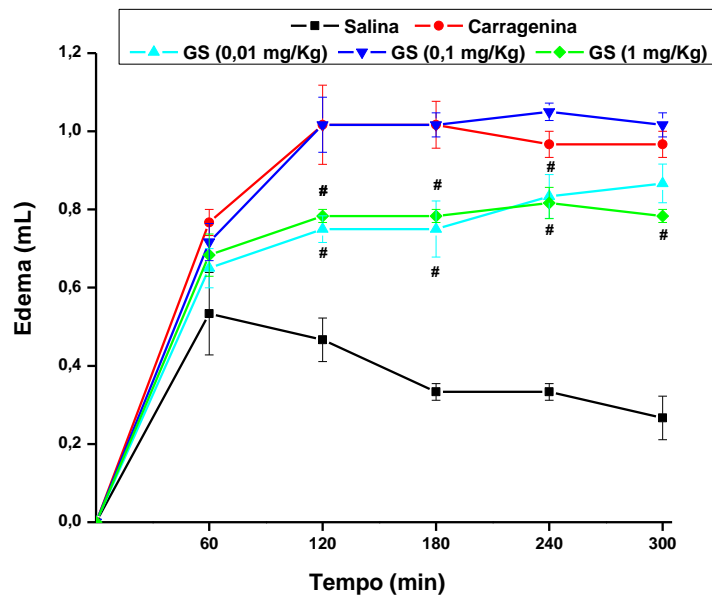
**Figura 6. A galactana sulfatada de *G. crinale* não inibe o curso temporal do edema de pata induzido por zimosan.** A galactana foi administrada (0,01; 0,1 e 1 mg/Kg; e.v.) 30 min antes da administração de zimosan (1 mg/Kg; s.c.). **a)** Curso temporal (mL) e **b)** ASC (unidades arbitrárias). Média  $\pm$  E.P.M. (n=6). \*p>0,05 em relação à salina; #p>0,05 em relação ao zimosan; @p>0,05 em relação à galatana (0,01 e 0,1 mg/Kg). GS: galactana sulfatada de *G. crinale*.

### 5.3 A galactana sulfatada de *Gelidium crinale* injetada por via sistêmica inibe as fases inicial e tardia do edema de pata induzido por carragenina

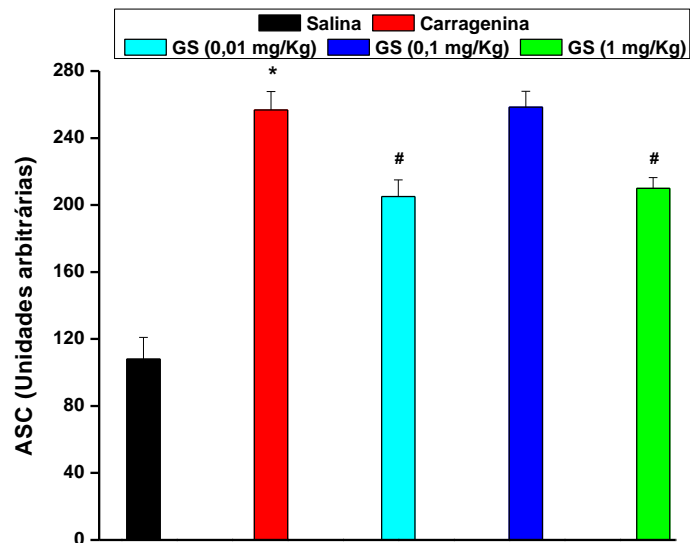
Carragenina promoveu edema significativo ( $0,8 \pm 0,03$  mL) em relação à salina ( $0,5 \pm 0,1$  mL) na 1ª h de seu desenvolvimento, atingindo efeito máximo na 2ª h ( $1,0 \pm 0,1$  mL) e mantendo-se elevado até a 5ª h ( $0,9 \pm 0,03$  mL). O pré-tratamento com galactana (0,01; 0,1 e 1 mg/Kg) promoveu inibição das fases inicial e tardia deste edema, nas doses de 0,01 (1ª e 2ª h: 26%; e 3ª h: 14%) e 1mg/Kg (1ª-3ª h: 23%; 4ª h: 16% e 5ª h: 19%) (**Figura 7a**).

A análise do gráfico de área sob a curva (ASC) do edema mostrou que a galactana nas doses de 0,01 ( $205 \pm 10$ ) e 1 mg/Kg ( $210 \pm 6,4$ ) apresenta inibição significativa (18% e 20%, respectivamente) sobre o edema promovido pela carragenina (ACS:  $257 \pm 11,0$ ) delineando, graficamente, a típica curva em sino da atividade de polissacarídeos sulfatados (ASSREUY et al., 2008) (**Figura 7b**).

a)



b)



**Figura 7. A galactana sulfatada de *G. crinale* inibe as fases inicial e tardia do edema de pata induzido por carragenina.** A galactana foi administrada (0,01; 0,1 e 1 mg/Kg; e.v.) 30 min antes da carragenina (300 µg/pata). **a)** Curso temporal (mL) e **b)** ASC (unidades arbitrárias). Média ± E.P.M. (n= 6). \*p>0,05 em relação à salina; #p>0,05 em relação à carragenina. GS: galactana sulfatada de *G. crinale*.

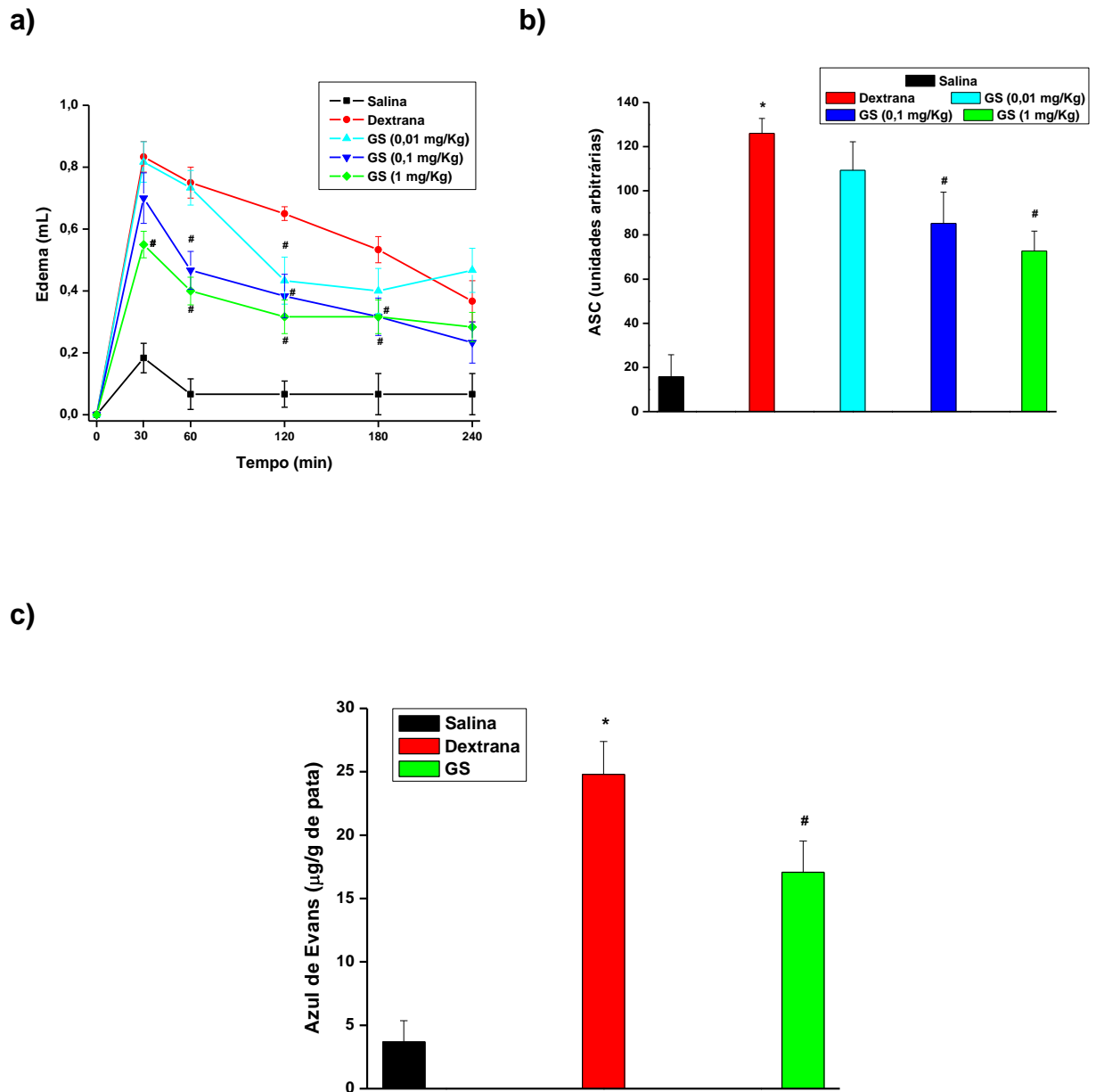


#### 5.4. A galactana sulfatada de *Gelidium crinale* injetada por via sistêmica inibe tanto o edema de pata quanto o aumento de permeabilidade vascular induzidos por dextrana

Dextrana causou um intenso edema, com efeito máximo nos primeiros 30 min ( $0,83 \pm 0,05$  mL), em relação ao grupo controle de salina ( $0,2 \pm 0,05$  mL), decrescendo ao longo do curso temporal. O pré-tratamento dos animais com a galactana (0,01; 0,1 e 1 mg/Kg) apresentou inibição significativa deste edema nos 30 min iniciais ( $0,55 \pm 0,04$  mL), perfazendo uma inibição em torno de 34%. Na 1ª h do edema ( $0,75 \pm 0,05$  mL), a galactana apresentou inibição significativa nas doses de 0,1 ( $0,5 \pm 0,06$  mL) e 1 mg/Kg ( $0,4 \pm 0,04$  mL), expressando inibições de 39% e 47%, respectivamente. Na 2ª h do edema ( $0,65 \pm 0,02$  mL), a galactana nas três doses: 0,01 ( $0,43 \pm 0,08$  mL); 0,1 ( $0,4 \pm 0,07$  mL) e 1 mg/Kg ( $0,4 \pm 0,04$  mL) promoveu inibições de 34%, 42% e 52%, respectivamente. A inibição do edema pela galactana foi mantida até a terceira hora ( $0,53 \pm 0,04$  mL), em torno de 42% observada nas doses de 0,1 ( $0,32 \pm 0,06$  mL) e 1 mg/Kg ( $0,32 \pm 0,05$  mL) (**Figura 8a**).

Analisando-se o gráfico da área sob a curva (ASC), verifica-se que a galactana nas doses de 0,1 (ASC:  $85,3 \pm 14,1$ ) e 1 mg/Kg (ASC:  $73,0 \pm 9,0$ ) inibiu significativamente o edema da dextrana (ACS:  $126 \pm 6,8$ ) em 32% e 42%, respectivamente (**Figura 8b**).

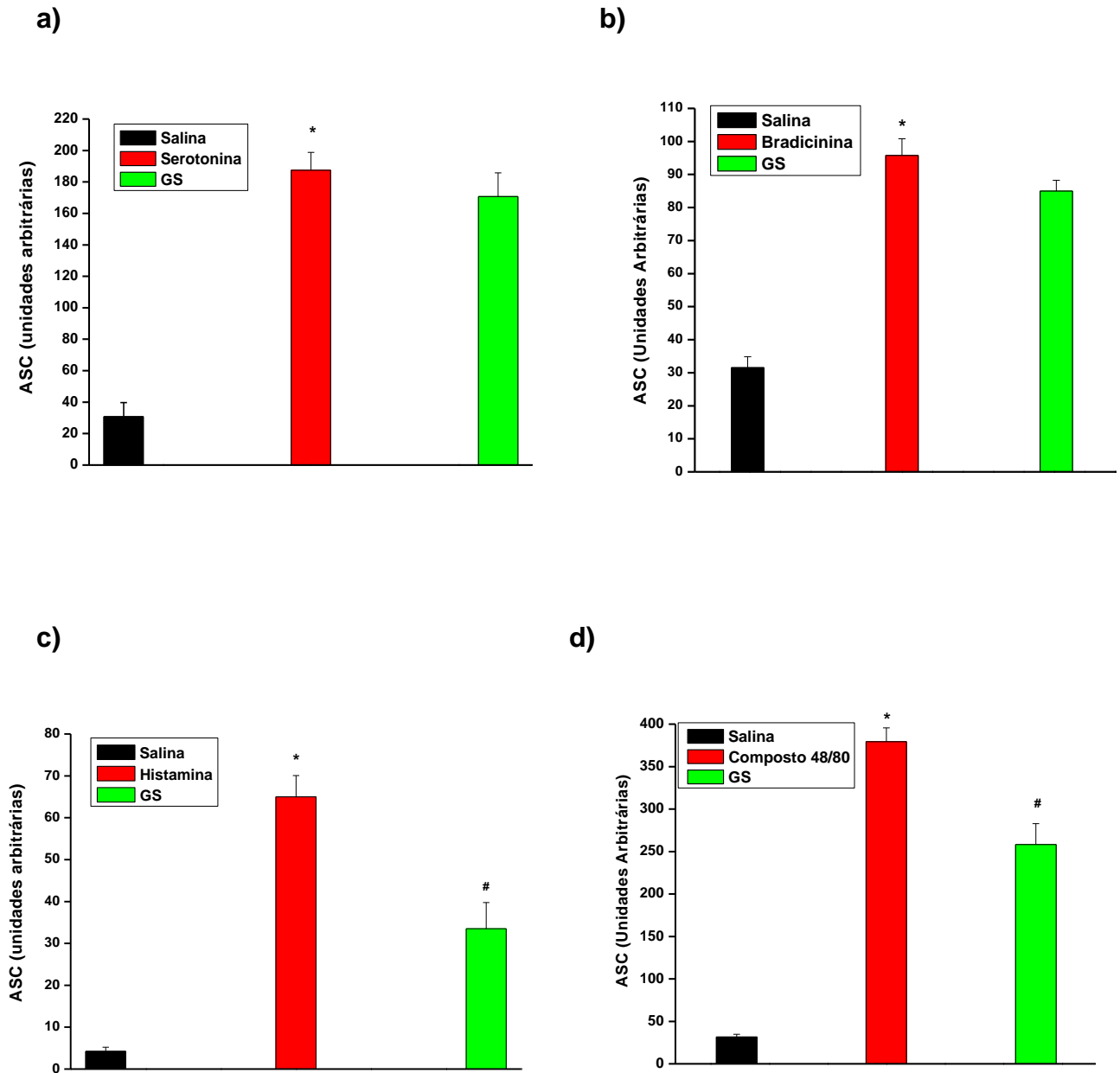
Avaliando-se um segundo parâmetro inflamatório no modelo de edema de pata, verificou-se que a dextrana induziu um edema típico (ver **Figura 8a**) acompanhado de aumento na permeabilidade vascular ( $24,8 \pm 2,3$  µg de azul de Evans/g de pata) após uma hora, em relação ao grupo salina ( $3,7 \pm 1,7$  µg de azul de Evans/g de pata). O pré-tratamento com a galactana sulfatada inibiu significativamente este aumento de permeabilidade vascular em cerca de 32% ( $17,0 \pm 2,5$  µg de azul de Evans/g de pata) (**Figura 8c**).



**Figura 8. A galactana sulfatada de *G. crinale* inibe o edema de pata e o aumento de permeabilidade vascular induzidos por dextrana. A galactana foi administrada (0,01; 0,1 e 1 mg/Kg; e.v.) 30 min antes da dextrana (300 µg/pata). (a) edema (mL); (b) ASC (unidades arbitrárias); (c) efeito inibitório da galactana (1 mg/Kg; e.v.) sobre o aumento de permeabilidade vascular (µg/g de pata) induzido por dextrana (300 µg/pata). Média ± E.P.M. (n= 6). \*p>0,05 em relação à salina; #p>0,05 em relação à dextrana. GS: galactana sulfatada de *G. crinale*.**

### 5.5 A atividade anti-edematogênica da galactana sulfatada de *Gelidium crinale* ocorre via inibição de histamina, mas não de bradicinina e serotonina

O pré-tratamento dos animais com a galactana (1 mg/Kg; e.v.) inibiu significativamente os edemas induzidos por histamina (ASC: GS:  $33,5 \pm 6,3$ ; histamina:  $65 \pm 5,0$ ) e composto 48/80 (ASC: GS:  $258 \pm 24,5$ ; composto 48/80:  $379 \pm 16,0$ ), em cerca de 49% e 32%, respectivamente (**Figura 9c e 9d**). Com relação ao edema induzido por bradicinina, a galactana apresentou discreta inibição, porém significativa, em torno de 18% na 1ª h (ASC: GS:  $0,53 \pm 0,02$ mL; bradicinina:  $0,65 \pm 0,02$ mL) (**dado não mostrado**) não revelando, porém, significância no gráfico da área sob a curva (ASC: GS:  $85 \pm 3,3$ ; bradicinina:  $96 \pm 5,0$ ) (**figura 9b**). A galactana também foi ineficaz sobre o edema promovido por serotonina (ASC: GS:  $171 \pm 15,0$ ; serotonina:  $187,5 \pm 11,4$ ) (**Figura 9a**).



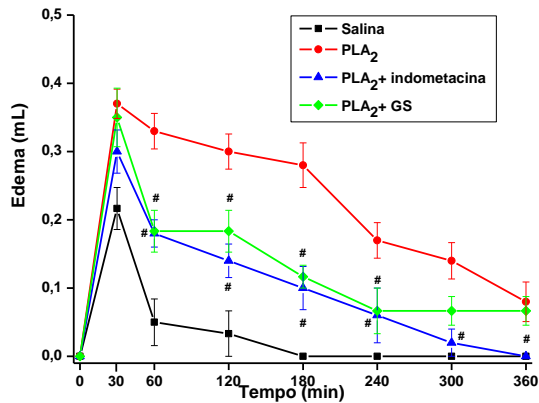
**Figura 9. A atividade anti-edematogênica da galactana sulfatada de *G. crinale* ocorre via inibição de histamina, mas não de serotonina e bradicinina.** A galactana foi administrada (1 mg/Kg; e.v.) 30 min antes da injeção s.c. intraplantar de **a)** serotonina (20  $\mu$ g/pata); **b)** bradicinina (30  $\mu$ g/pata); **c)** histamina (100  $\mu$ g/pata) e **d)** composto 48/80 (10  $\mu$ g/pata). Média  $\pm$  E.P.M. (n=6). \* $p > 0,05$  em relação à salina; # $p > 0,05$  em relação à histamina ou composto 48/80. GS: galactana sulfatada de *G. crinale*.

## 5.6 A atividade anti-edematogênica da galactana sulfatada de *Gelidium crinale* ocorre via inibição de prostaglandinas, mas não de óxido nítrico

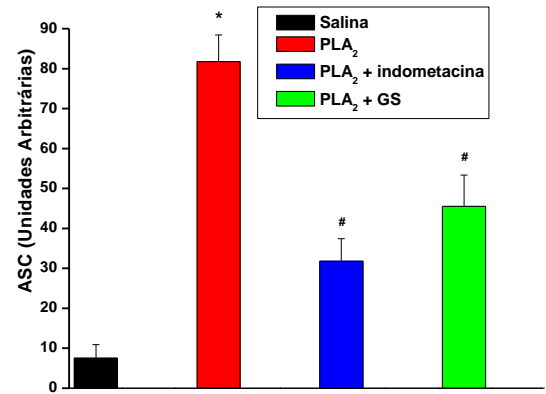
O edema induzido pela fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) apresentou início e efeito máximo aos 30 min ( $0,4 \pm 0,02$  mL) em relação ao controle de salina ( $0,2 \pm 0,03$  mL), com regressão nos tempos subsequentes. O pré-tratamento com a galactana inibiu significativamente o edema induzido por este agente a partir da 1<sup>a</sup> h (46%), seguindo-se até a 4<sup>a</sup> h (65%). O grupo controle de indometacina inibiu este edema a partir da 1<sup>a</sup> h (46%), estendendo-se até a 6<sup>a</sup> h (100%) (**Figura 10a**). No gráfico da área sob a curva, a inibição de 44% promovida pela galactana ( $45,5 \pm 7,9$ ) foi significativamente diferente da inibição de 61% promovida pela indometacina ( $32 \pm 5,6$ ) (**Figura 10b**).

O edema induzido por L-arginina teve seu início e atividade máxima aos 30 min ( $0,9 \pm 0,06$  mL), apresentando regressão ao longo do curso temporal. O tratamento prévio com a galactana preveniu a formação do edema em 24% apenas nos 30 min iniciais ( $0,65 \pm 0,05$  mL), com valor semelhante ao controle de L-NAME ( $0,7 \pm 0,05$  mL, com inibição de 23%) (**Figura 10c**). A análise do gráfico da área sob a curva revelou que a galactana sulfatada, diferente do L-NAME, não mostrou inibição significativa sobre o edema de L-arginina (ASC GS:  $96 \pm 8,7$ ; L-arginina:  $109 \pm 11,5$ ). O percentual de inibição promovido pelo controle de L-NAME ( $65 \pm 9,5$ ) foi de 41% (**Figura 10d**).

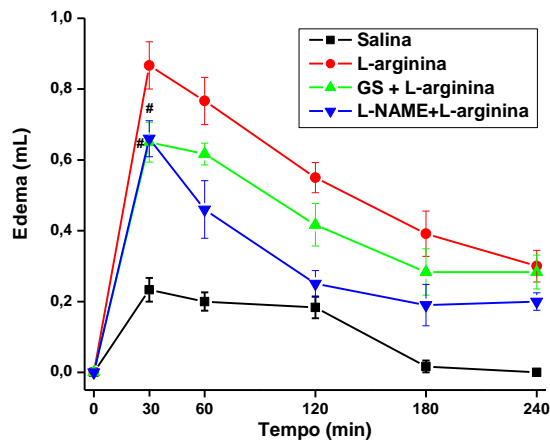
a)



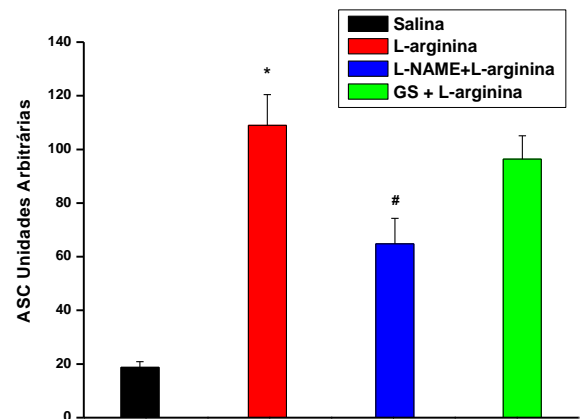
b)



c)



d)



**Figura 10.** A atividade anti-edematogênica da galactana sulfatada de *G. crinale* ocorre via inibição de prostaglandinas, mas não de óxido nítrico. A galactana foi administrada por via e.v. (1 mg/Kg) 30 min antes da injeção s.c. intraplantar de (a,b) fosfolipase A<sub>2</sub> (30 µg/pata) ou (c,d) L-arginina (15 µg/pata). Média ± E.P.M. (n= 6). \*p>0,05 em relação à salina; #p>0,05 em relação à fosfolipase A<sub>2</sub> ou L-arginina. GS: galactana sulfatada de *G. crinale*.

### **5.7 O tratamento subcrônico de ratos com a galactana sulfatada de *G. crinale* não produz toxicidade sistêmica**

O tratamento endovenoso com a galactana sulfatada, por 10 dias consecutivos, na dose em que produziu atividade anti-inflamatória máxima (1mg/kg) não alterou significativamente o peso corporal dos animais, no entanto, apresentou discreta diferença embora significativa, nos pesos do coração e estômago em comparação ao grupo controle injetado com salina (**Tabela 1**).

A avaliação macroscópica demonstrou morfologia normal e ausência de alterações em todos os órgãos, tendo o estômago demonstrado mucosas intactas, sem grau visível de lesão.

Os padrões hematológicos dos animais tratados com a galactana também revelaram discretas alterações com aumento nos valores de hematócrito, hemácias e leucócitos, e diminuição dos valores dos linfócitos, quando comparados ao controle de salina (**Tabela 2**).

A dosagem de creatinina, utilizada como parâmetro de função renal, apresentou-se alterada comparada ao controle de salina. O mesmo ocorreu com as dosagens das enzimas hepáticas aspartato amino transferase (AST) e alanina amino transferase (ALT), que foram significativamente menores em relação ao controle. Quanto às proteínas plasmáticas totais, avaliadas como controle de manutenção de equilíbrio osmótico, estas não se mostraram diferentes do controle (**Tabela 3**).

| <sup>b</sup> Peso corporal (g) e de órgãos (g/100 g peso corporal) | <sup>a</sup> Tratamento (100 µl/100 g) |              |
|--|--|--------------|
|  | SALINA (0,9%)                          | GS (1 mg/Kg) |
| Peso corporal antes do tratamento                                  | <sup>c</sup> 181,0 ± 5,8               | 192,0 ± 7,0  |
| Peso corporal depois do tratamento                                 | 191,0 ± 7,5                            | 207,0 ± 5,8* |
| Fígado   | 6,3 ± 0,3                              | 6,7 ± 0,2    |
| Rim  | 0,8 ± 0,03                             | 0,9 ± 0,03   |
| Coração  | 0,9 ± 0,06                             | 0,85 ± 0,07* |
| Baço   | 0,7 ± 0,06                             | 0,8 ± 0,02   |
| Estômago   | 1,8 ± 0,2                              | 1,5 ± 0,07*  |

**Tabela 1. Avaliação do peso corporal e de órgãos após tratamento subcrônico com a galactana sulfatada de *G. crinale*.**

<sup>a</sup> Ratos receberam a galactana ou salina (e.v.) durante 10 dias;

<sup>b</sup> Após o tratamento, os animais foram pesados, sacrificados e seus órgãos removidos e pesados ainda úmidos;

<sup>c</sup> Média ± E.P.M. (n=7);

\*p<0,05 em relação à salina.



| <sup>b</sup> Hemograma           | <sup>a</sup> Tratamento (100 µl/100 g) |              |
|----------------------------------|--|--------------|
|                                  | SALINA (0,9%)                          | GS (1 mg/Kg) |
| Hematócrito (%)                  | <sup>c</sup> 41,0 ± 0,4                | 45,4 ± 0,9*  |
| Hb (g/dL)                        | 13,9 ± 0,1                             | 14,7 ± 0,4   |
| Hemácias (10 <sup>6</sup> /µL)   | 7,0 ± 0,1                              | 7,6 ± 0,2*   |
| Plaquetas (10 <sup>3</sup> /µL)  | 846,0 ± 62,0                           | 945,0 ± 31,7 |
| Leucócitos (10 <sup>3</sup> /µL) | 8,0 ± 0,45                             | 10,5 ± 0,5*  |
| Linfócitos (%)                   | 78,0 ± 2,2                             | 67,3 ± 3,0*  |
| Monócitos (%)                    | 2,3 ± 0,2                              | 2,3 ± 0,7    |
| Eosinófilos (%)                  | 1,4 ± 0,3                              | 1,9 ± 0,5    |

**Tabela 2. Parâmetros hematológicos dos animais após tratamento subcrônico com a galactana sulfatada de *G. crinale*.**

<sup>a</sup> Ratos receberam galactana ou salina (e.v.) durante 10 dias;

<sup>b</sup> Após o tratamento, os animais foram sacrificados e coletadas amostras de sangue para a contagem de células;

<sup>c</sup> Média ± E.P.M. (n=7);

\*p<0,05 em relação à salina.

| <sup>b</sup> Dosagens   | <sup>a</sup> Tratamento (100 µl/100 g) |              |
|-------------------------|--|--------------|
|                         | SALINA (0,9%)                          | GS (1 mg/Kg) |
| Uréia (mg/dl)           | <sup>c</sup> 46,4 ± 3,1                | 40,0 ± 3,1   |
| Creatinina (mg/dl)      | 0,46 ± 0,01                            | 0,53 ± 0,04* |
| AST (U/L)               | 79,0 ± 3,7                             | 68,5 ± 3,0*  |
| ALT (U/L)               | 34,0 ± 2,0                             | 31 ± 1,0*    |
| Proteínas totais (g/dl) | 6,0 ± 0,1                              | 5,7 ± 0,03   |

**Tabela 3. Parâmetros bioquímicos do plasma dos animais após tratamento subcrônico com a galactana sulfatada de *G. crinale***

<sup>a</sup> Ratos receberam galactana ou salina (e.v.) durante 10 dias;

<sup>b</sup> Após o tratamento, os animais foram sacrificados e coletadas amostras de sangue para a avaliação dos marcadores de função renal e hepática

<sup>c</sup> Média ± E.P.M. (n=7);

\*p<0,05 em relação à salina;

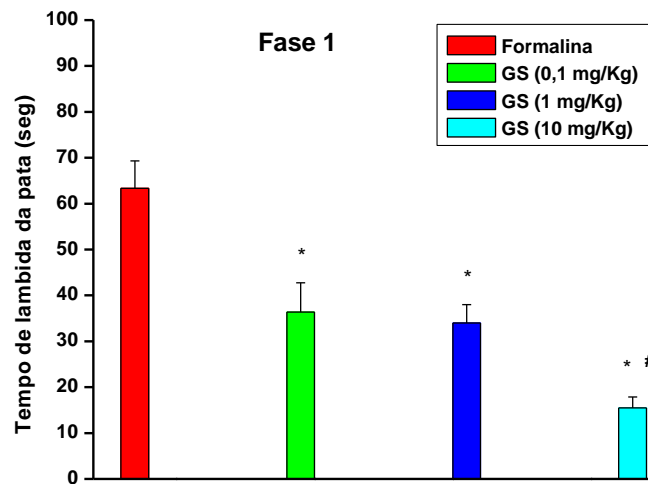
AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase.

### 5.8 A galactana sulfatada de *Gelidium crinale* apresenta atividade antinociceptiva no teste da formalina, com envolvimento da via opióide

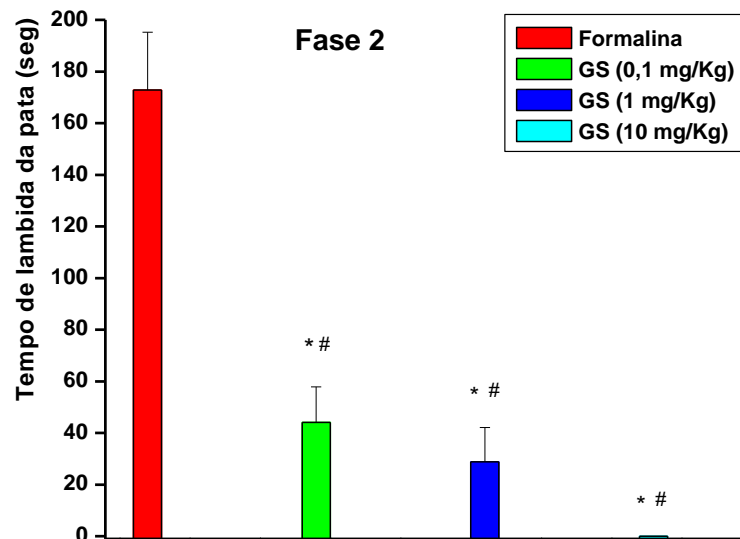
A galactana sulfatada de *G. crinale* (0,1; 1 e 10 mg/Kg) inibiu a primeira fase do teste da formalina, caracterizada pela dor do tipo neurogênica, diminuindo o tempo de lambida das patas ( $63,3 \pm 6,0s$ ) nas doses de 0,1 ( $36,4 \pm 6,3s$ ), 1 ( $34 \pm 4,0s$ ) e 10mg/Kg ( $15,5 \pm 2,3s$ ), em cerca de 43%, 46% e 76%, respectivamente (**Figura 11a**). Na segunda fase do teste, caracterizada pela dor inflamatória, a galactana também inibiu o tempo de lambida das patas ( $172,9 \pm 22,4s$ ) nas três doses: 0,1 ( $44,1 \pm 13,7s$ ), 1 ( $28,9 \pm 13,2s$ ) e 10 mg/Kg ( $0 \pm 0s$ ), com percentuais de inibição 75%, 83% e 100%, respectivamente (**Figura 11b**). Observou-se que, nesta fase, o efeito antinociceptivo da galactana foi mais pronunciado.

A morfina reduziu o tempo de lambida da pata em ambas as fases do teste (F1:  $7,7 \pm 2,3s$ ; F2:  $2,0 \pm 2,0s$ ), quando comparada ao controle de formalina (F1:  $25,4 \pm 2,0s$ ; F2:  $224 \pm 22,6s$ ), tendo sua atividade analgésica revertida quando associada à naloxona (F1:  $34,4 \pm 2,3s$ ; F2:  $166,3 \pm 20,0s$ ). Quando associado à naloxona, o pré-tratamento dos animais com a galactana mostrou atividade antinociceptiva reduzida em ambas as fases do teste (F1:  $20,1 \pm 4,3 s$  e F2:  $73,4 \pm 20,1 s$ ), decaindo para percentuais de inibição de 21% e 67%, em relação ao grupo controle de formalina (F1:  $25,4 \pm 2,0s$ ; F2:  $224 \pm 22,6 s$ ). Desta forma, evidenciou-se claramente a participação da via opióide neste efeito (**Figuras 12a e 12b**).

a)

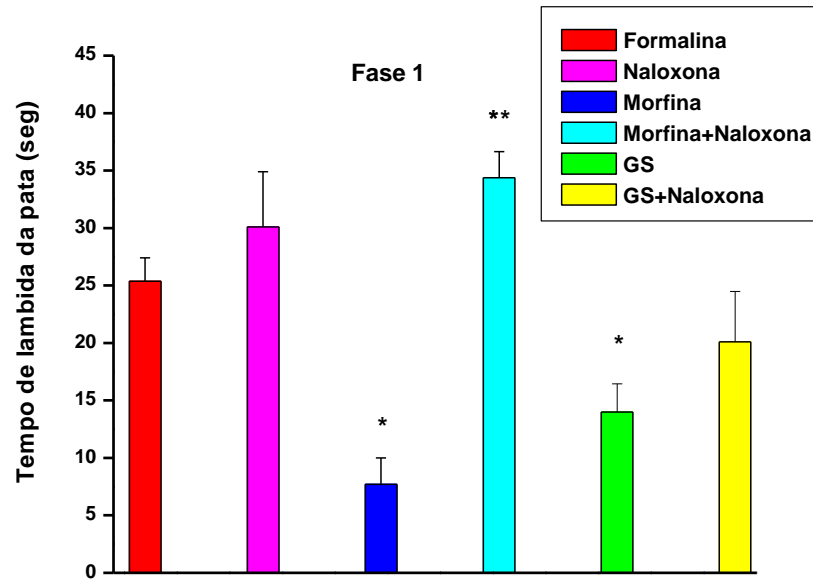


b)

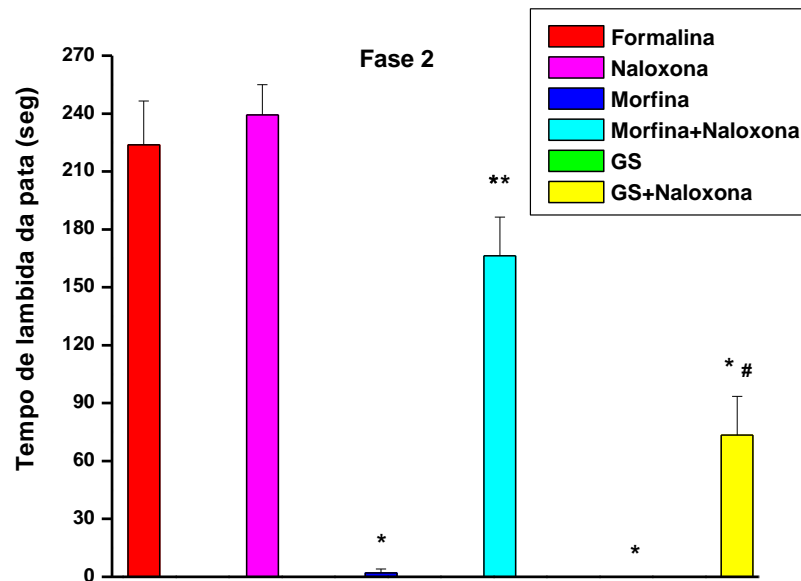


**Figura 11. Atividade antinociceptiva da galactana sulfatada de *G. crinale* no teste da formalina.** A galactana (0,01; 1 e 10 mg/Kg) foi aplicada 30 min antes da injeção s.c. intraplantar de formalina 2,5% (v/v). Fase neurogênica (a) e fase inflamatória (b). Média  $\pm$  E.P.M. (n= 8 - 10). \* $p < 0,05$  em relação à formalina, # $p < 0,05$  em relação aos grupos 0,1 e 1 mg/kg (a) ou aos grupos entre si (b). GS: galactana sulfatada de *G. crinale*.

a)



b)



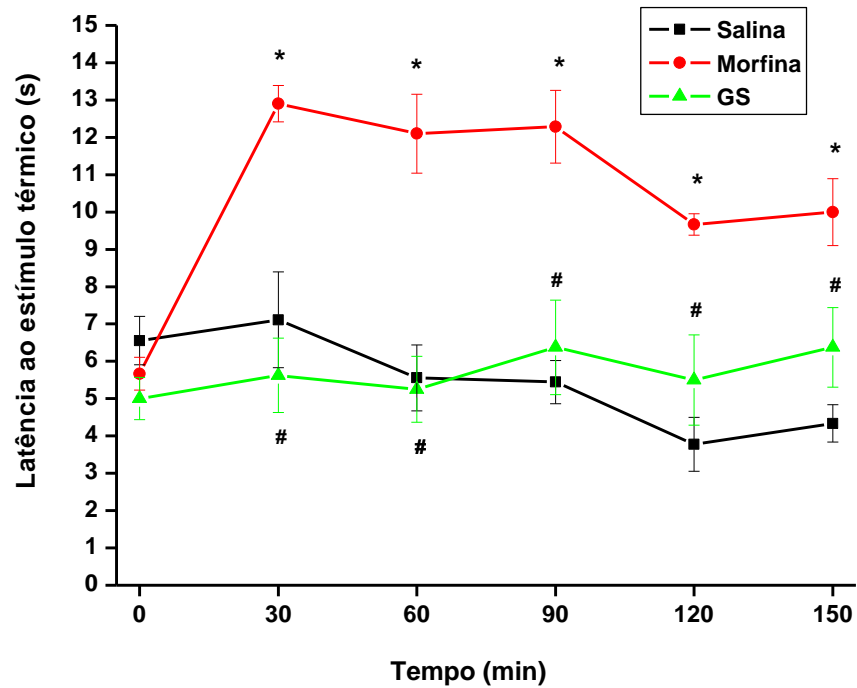
**Figura 12. Participação da via opióide na atividade antinociceptiva da galactana sulfatada de *G. crinale* no teste da formalina.** A galactana (0,01; 1 e 10 mg/Kg; e.v.) ou a morfina (13,3  $\mu$ mol/Kg; i.p.) foram aplicadas 30 minutos antes da injeção s.c. intraplantar de formalina 2,5% (v/v), em animais pré-tratados ou não com naloxona (13,7  $\mu$ mol/Kg; i.p.). Fase neurogênica (a) e fase inflamatória (b). Média  $\pm$  E.P.M. (n= 8 - 10). \*p<0,05 em relação à formalina; \*\*p<0,05 em relação à morfina; #p<0,05 em relação à galactana. GS: galactana sulfatada de *G. crinale*.

### 5.9 A atividade antinociceptiva da galactana sulfatada de *Gelidium crinale* parece não ocorrer a nível central

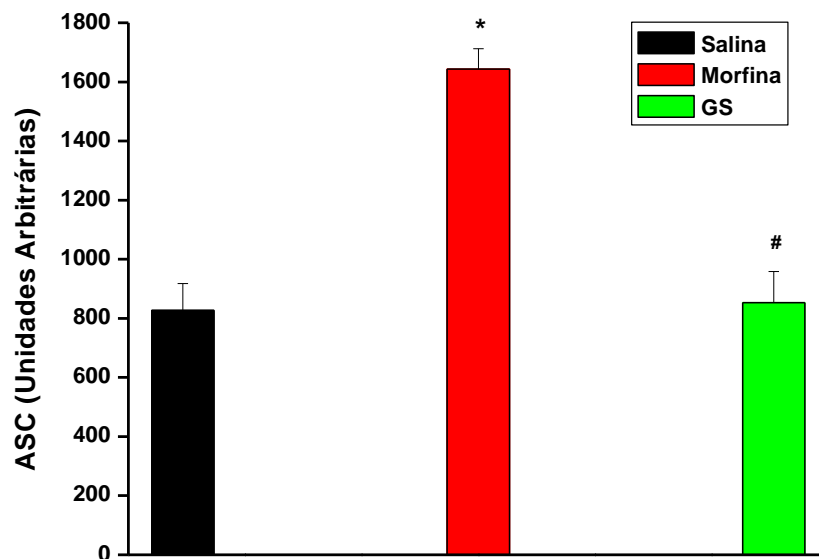
O tratamento dos animais com a galactana de *G. crinale* (10 mg/Kg) antes da exposição ao estímulo térmico, não mostrou efeito sobre a latência de manifestação de reações pelos animais a este estímulo em nenhum dos tempos mensurados, quando comparada ao controle de morfina (**Figura 13a**).

Analisando-se o gráfico da área sob a curva (ASC), a galactana sulfatada não mostrou aumento no tempo de latência dos animais ao estímulo térmico ( $853,0 \pm 105,0$ ), quando comparada ao controle de morfina ( $16443,0 \pm 69,0$ ) e com valores próximos ao controle de salina ( $827,0 \pm 91,0$ ) (**Figura 13b**).

a)



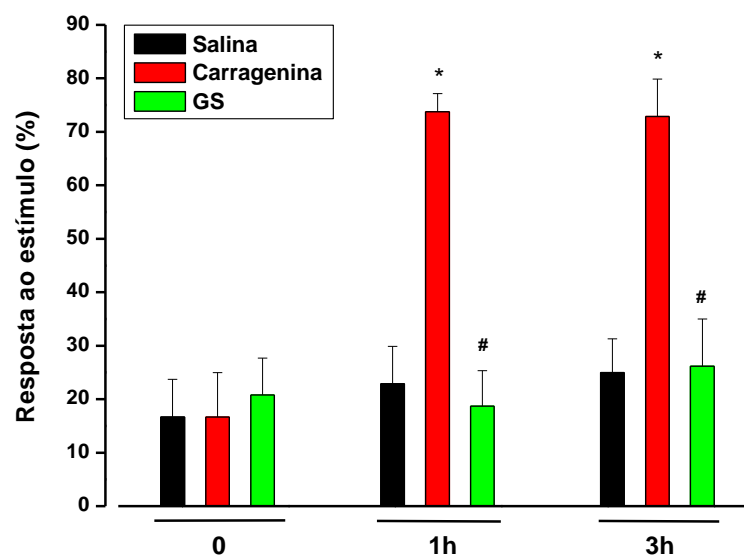
b)



**Figura 13.** A atividade antinociceptiva da galactana sulfatada de *G. crinale* não se manifesta no teste da placa quente. Os animais foram dispostos sobre a placa quente ( $50 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ) antes (tempo zero) e após a administração da galactana (10 mg/Kg, e.v.) ou morfina (5mg/Kg; i.p.), nos intervalos de 30, 60, 90, 120 e 150 min. **(a)** Latência ao estímulo térmico (s) e **(b)** ASC (unidades arbitrarias). Média  $\pm$  E.P.M. (n= 8 - 10). \* $p < 0,05$  em relação à salina; # $p < 0,05$  em relação à morfina. GS: galactana sulfatada de *G. crinale*.

### 5.10 A galactana sulfatada de *G. crinale* inibe a hipernociceção induzida por carragenina

Carragenina promoveu aumento significativo no número de sacudida/retirada das patas dos animais na 1<sup>a</sup> (74,0 ± 3,4%) e na 3<sup>a</sup> h (73,0 ± 7,0) em resposta à estimulação mecânica com o filamento flexível de Von Frey, comparada ao controle de salina (1<sup>a</sup>: 23,0 ± 7,0%; 3<sup>a</sup>: 25,0 ± 6,3). O tratamento com a galactana (10 mg/Kg) 30 min antes da indução da hipernociceção por carragenina, reduziu significativamente o número de respostas dos animais ao estímulo na 1<sup>a</sup> (19 ± 6,6%) e na 3<sup>a</sup> h (26 ± 8,8%) (**Figura 14**).



**Figura 14. A galactana sulfatada de *G. crinale* inibe a hipernociceção induzida por carragenina.** Os animais foram pré-tratados com a galactana (10 mg/Kg) 30 min antes da injeção s.c. de carragenina (300 µg/pata) e estimulados com o filamento flexível de von Frey antes (tempo zero) e após 1 e 3 h da administração de carragenina. Controle negativo: animais injetados com salina (e.v.). Média ± E.P.M. (n= 8 - 10). \*p<0,05 em relação à salina; #p<0,05 em relação à carragenina. GS: galactana sulfatada de *G. crinale*.



## 6 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho evidenciaram, de modo pioneiro, que a galactana sulfatada da alga marinha vermelha *Gelidium crinale* apresenta atividade pró- ou antiinflamatória em ratos dependendo da via de administração utilizada, bem como atividade antinociceptiva, principalmente sobre a dor periférica de caráter inflamatório em camundongos.

A atividade pró-inflamatória da galactana de *G. crinale* foi observada quando a mesma foi injetada localmente na pata dos animais, produzindo edema já nos 30 minutos iniciais, com resolutividade na 24<sup>a</sup> hora, caracterizando a indução de um processo inflamatório agudo. O efeito edematogênico induzido pela galactana foi acompanhado de aumento de permeabilidade vascular, respostas que já haviam sido demonstradas para o PLS da alga marinha vermelha *Champia feldmannii* (ASSREUY et. al, 2008). A atividade pró-inflamatória da galactana de *G. crinale* envolveu principalmente alterações na dinâmica vascular, de maneira similar ao efeito da dextrana, um polissacarídeo não-sulfatado que induz edema de natureza osmótica, acelular, com participação exclusiva de mediadores como histamina, serotonina e bradicinina (BERSTAD, 1980; LO; ALMEIDA; BEAVEN, 1982; MOODLEY; MONGAN; FOREMAN, 1982).

Por via sistêmica, a galactana de *G. crinale* apresentou ação anti-inflamatória, principalmente sobre o edema de pata induzido por dextrana, embora também tenha inibido, com menor potência, as fases inicial e tardia do edema elicitado por carragenina. Sobre o edema de pata induzido por zimosan, a galactana não apresentou inibição significativa de seu curso temporal, embora na maior dose, tenha inibido de maneira discreta (19%), a 2<sup>a</sup> hora de sua evolução.

O edema de pata causado por dextrana, um PLS de alto peso molecular, decorre do extravasamento plasmático induzido por ativação do sistema de cininas e liberação de histamina e serotonina originadas dos mastócitos (NISHIDA; KAGAWA; TOMIZAWA, 1979; BERSTAD, 1980; MOODLEY; MONGAN; FOREMAN, 1982; VAN WAUVE; GOOSENS, 1989) e aumento dos níveis tissulares de PGE<sub>2</sub> (GULATI; SHARMA; HAMMERSEN, 1983). Já o edema induzido por carragenina é composto de duas fases: a primeira acontece nas duas horas iniciais e é sustentada pela liberação de histamina e serotonina, também de origem mastocitária, e NO formado

pela nNOS (DIROSA; GIROUD; WILLOUGHBY, 1971); a segunda fase se desenvolve entre 3-6 h, envolve infiltrado de neutrófilos e é sustentada principalmente pela produção de PGE<sub>2</sub> e citocinas (destacando-se a IL-1 $\beta$ ) e NO formado pela iNOS (VINEGAR; SCHREIBER; HUGO, 1969; WEDMORE; WILLIAMS, 1981; SALVEMINI et al., 1996). Por outro lado, o edema induzido por zimosan é caracterizado pelo influxo de monócitos e ativação do sistema do complemento (DAMAS; PRUNESCO, 1990), com consequente produção da anafilotoxina C5a, um potente fator quimiotático para neutrófilos (CALHOUN; CHANG; CARLSON, 1987; CUZZOCREA et al., 1997). A fase inicial da resposta inflamatória a este agente também parece depender de serotonina e leucotrienos, enquanto a fase mais tardia envolve a participação de PAF, NO e prostaglandinas (TARAYRE et al., 1989; CUZZOCREA et al., 1997; PIERRETI et al., 2006).

Observando-se os padrões de inibição da galactana sulfatada de *G. crinale* sobre estes três tipos dinamicamente distintos de edema, sugere-se que o mecanismo do seu efeito antiedematogênico envolva principalmente a inibição de mediadores inflamatórios de fase inicial como histamina, serotonina e/ou bradicinina. No entanto, a participação de prostaglandinas e/ou NO não pode ser descartada em função da inibição causada pela galactana sobre a 2ª fase do edema promovido por carragenina. Por outro lado, pode-se inferir que a via do complemento não seja importante no mecanismo antiinflamatório da galactana de *G. crinale*, apesar de ser reconhecidamente importante na atividade anti-inflamatória de fucanas sulfatadas (BLONDIN et al., 1994; TISSOT; DANIEL, 2003). Na literatura, a importância desta via na atividade de galactanas sulfatadas ainda não foi descrita.

As alterações bioquímicas e celulares observadas na fase aguda do processo inflamatório são finamente reguladas pela liberação imediata e sequencial de moléculas solúveis e difusíveis, os mediadores inflamatórios, que podem ser derivados do plasma ou liberadas por células como mastócitos, plaquetas, neutrófilos e monócitos/macrófagos sempre que há lesão, infecção ou presença de agentes irritantes (SHARMA; BUCHANAN, 1994). A ausência do efeito inibitório da galactana de *G. crinale* sobre o edema de pata induzido por zimosan, bem como a inibição discreta sobre o edema induzido por carragenina, processos caracterizados pela presença de infiltrado celular, demonstram que o efeito antiinflamatório desta galactana parece não envolver diretamente a participação de leucócitos, estando mais relacionado a inibição de eventos vasculares promovidos pelos mediadores

inflamatórios de fase inicial histamina, serotonina e/ou bradicinina. Seguindo este raciocínio, a galactana, quando testada na dose de melhor efeito anti-inflamatório (1 mg/Kg), inibiu o edema promovido por histamina (49%) e pelo composto 48/80 (32%), mas não mostrou interferência sobre o edema induzido por bradicinina e serotonina.

A histamina é um mediador pré-formado que se encontra estocado nos grânulos dos mastócitos e basófilos e causa dilatação de pequenos vasos e aumento da permeabilidade vascular, principalmente agindo sobre os receptores H<sub>1</sub> e H<sub>2</sub>. A serotonina (5-HT) é liberada pela degranulação de mastócitos e por plaquetas, quando estas são ativadas, e podem atuar sobre o endotélio induzindo a liberação de óxido nítrico (NO); a sua ação sobre os vasos se deve principalmente à ação sobre o receptor do tipo 5-HT<sub>2</sub>. A bradicinina apresenta ação potente sobre a permeabilidade vascular, além de promover vasodilatação arteriolar e causar quimiotaxia para células inflamatórias (RANG et al, 2004; SIQUEIRA JR; DANTAS, 2000). O composto 48/80 é conhecido por induzir a liberação de histamina e serotonina dos mastócitos (PATON, 1951; FELDBERG; TALESNIK, 1953; RILEY; WEST, 1956) e seu efeito edematogênico é devido principalmente à serotonina. Em ratos, particularmente, a serotonina é um agente inflamatório mais potente do que a histamina (ROWLEY; BENDITT, 1956); é por esta razão que a administração de bloqueadores de receptores de histamina não inibe completamente a resposta inflamatória induzida pela degranulação de mastócitos (PARRAT; WEST, 1958). Este comportamento foi comprovado por Maling et al. (1974), o qual demonstrou que compostos que antagonizam somente a histamina, inibem cerca de 1/3 do edema do composto 48/80, enquanto que compostos que antagonizam somente a serotonina são capazes de inibir este edema em 2/3; e, quando associados, tais antagonistas apresentam supressão quase completa do edema.

Nossos resultados indicaram que a atividade antiedematogênica da galactana sulfatada de *G. crinale* tem como principal alvo a histamina agindo tanto através da inibição de sua liberação pelos mastócitos (inibição de 32% sobre o edema induzido pelo composto 48/80, cerca de 1/3 da citada participação da histamina), como pela inibição da ação da histamina sobre o receptor (inibição de 49% sobre o edema induzido pela própria histamina). Tais achados, também sugerem que o efeito inibitório da galactana sobre o aumento da permeabilidade vascular induzido por dextrana siga esta via. Sugere-se, ainda, que a ação inibitória

da galactana sulfatada envolva os receptores de histamina do tipo H<sub>1</sub>, uma vez que tais receptores são mais abundantes nas vênulas, estão relacionados à rápida indução de vasodilatação e possuem maior afinidade pela histamina do que os outros subtipos (SIQUEIRA JR; DANTAS, 2000). Entretanto, a participação de bradicinina neste efeito não deve ser completamente descartada, tendo em vista que o edema promovido por este mediador foi inibido pela galactana na 1ª hora de seu desenvolvimento.

Além do envolvimento de mediadores de fase inicial na atividade antiinflamatória da galactana sulfatada de *G. crinale*, também foi sugerida a participação dos mediadores de fase tardia (prostaglandinas e NO) presentes na segunda fase do edema induzido por carragenina, a qual foi inibida pela galactana. Sob condições inflamatórias ou em fases iniciais de muitas patologias caracterizadas por processos inflamatórios, NO e PGs são liberados simultaneamente em grandes quantidades devido principalmente à ativação de enzimas induzidas. A superprodução de NO e PGs pode ser prejudicial à sobrevivência celular, e há evidências de que ocorre produção destas moléculas no dano tecidual da artrite reumatóide, doenças crônico-degenerativas e processos neuroinflamatórios (MOLLACE et al., 2005).

As prostaglandinas são metabólitos do AA, formadas pela ação da COX, enzima encontrada sob duas isoformas principais: a constitutiva ou COX-1, que está presente em tecidos como os do estômago, intestino ou rins, aonde a produção de prostaglandinas desempenha um papel protetor na manutenção dos processos fisiológicos (WU, 1995); e a induzida ou COX-2, expressa em processos inflamatórios por muitas células incluindo fibroblastos, células endoteliais e macrófagos, que promove a liberação de grandes quantidades de prostaglandinas no sítio inflamatório (WU, 1995; FU et al., 1990; MASFERRER et al., 1990; 1992). Os subtipos de prostaglandinas mais relevantes para o processo inflamatório (PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> e PGI<sub>2</sub>) causam vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, potencializando o efeito da histamina e bradicinina sobre as vênulas pós-capilares, bem como a formação de edema e calor (KULINSKY, 2007). Já foi observado que a elevada produção de prostaglandinas pró-inflamatórias está intimamente relacionada à estimulação da atividade da COX pelo NO (SALVEMINI et al., 1993). Outros importantes metabólitos derivados do metabolismo do AA são os leucotrienos, formados pela ação da enzima 5-lipoxigenase, que estão basicamente envolvidos

em processos inflamatórios das vias aéreas, destacando-se os leucotrienos B<sub>4</sub>, um agente quimiotático para neutrófilos e macrófagos, e C<sub>4</sub>, um potente constritor da musculatura lisa (RANG et al., 2007).

O NO é um radical livre, que age como uma molécula sinalizadora tanto em processos fisiológicos como patológicos, o que lhe confere uma natureza dúbia ora benéfica, ora potencialmente tóxica. Sua síntese resulta da oxidação de um dos dois nitrogênios guanidino da L-arginina, que é convertida em L-citrulina, mediada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) (MARLETA, 1993; MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991). Esta enzima se apresenta sob duas isoformas categoricamente distintas: a NOS constitutiva (c-NOS), dependente do complexo cálcio-calmodulina e envolvida na sinalização celular, que compreende a NOS neuronal (n-NOS), presente normalmente nos neurônios (KNOWLES et al., 1989), e a NOS endotelial (e-NOS), presente normalmente nas células endoteliais vasculares (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991) e nas plaquetas (RADOMSKI et al., 1990); e a NOS induzível (i-NOS), produzida por citocinas e/ou endotoxinas em uma variedade de células, incluindo-se macrófagos, linfócitos T, células endoteliais, miócitos, hepatócitos, condrócitos, neutrófilos e plaquetas (MARLETA, 1993). Os efeitos benéficos do NO geralmente estão relacionados à sua produção pela eNOS, os quais se refletem através da inibição da agregação e adesão plaquetária (RADOMSKI et al., 1987), manutenção do tônus vascular (WENNEMALM, 1994) e regulação da pressão sanguínea (NAVA; LÜSCHER, 1995), do efeito antiproliferativo (GEWALTIG; KOJDA, 2002; SCOTT-BURDEN; VANHOUTTE, 1993) e antioxidante (WOLIN, 2000). Já o papel maléfico do NO é observado em sua produção advinda da i-NOS, expressa em processos inflamatórios, promovendo aumento da permeabilidade vascular e edema (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991) e da produção de prostaglandinas pró-inflamatórias (INOUE et al., 1993; DAVIDGE et al., 1995; SALVEMINI et al., 1994; SAUTEBIN et al., 1995), bem como em processos infecciosos e tumorais, através de um efeito citotóxico e citostático que pode afetar células sadias (BECKMAN; KOPPENOL, 1996; JAMES, 1995).

Ao se avaliar a participação de prostaglandinas e NO na atividade antiinflamatória da galactana sulfatada de *G. crinale*, observou-se que a mesma apresentou inibição sobre o edema induzido por PLA<sub>2</sub> (44%), mas não inibiu o edema induzido por L-arginina. Tais resultados mostram que a atividade antiinflamatória da galactana sulfatada de *G. crinale* envolve a participação de

prostaglandinas, e exclui o envolvimento de NO, não se podendo afirmar, no entanto, em que nível exato esta interação ocorre, podendo ser atribuída desde a inibição da ativação da COX-2 até a produção e ação de prostaglandinas. A participação de leucotrienos nesta atividade também não pode ser descartada, uma vez que a via da enzima lipoxigenase não foi bloqueada e a galactana sulfatada também tenha apresentado inibição discreta, porém significativa (19%), da 2ª h do edema induzido por zimosan, que envolve a participação de serotonina e leucotrienos (TARAYRE et al., 1989; CUZZOCREA et al., 1997; PIERRETI et al., 2006). No entanto, a participação deste mediador não parece ser importante no efeito antiinflamatório da galactana sulfatada de *G. crinale*.

Analisando o padrão pró- e anti-inflamatório da galactana sulfatada de *G. crinale*, observa-se que a clássica inferência de atividade antiinflamatória para fucanas sulfatadas (BLONDIN et al., 1994; PREOBRAZHENSKAYA et al., 1997) e pró-inflamatória para galactanas sulfatadas (ASSREUY et al., 2008) já não se mostra tão atraente. Apesar dos escassos relatos, há estudos mostrando a atividade antiinflamatória de galactanas sulfatadas. Em um estudo recente, foi confirmada a atividade anti-inflamatória *in vitro* de frações de PLS, contendo a galactose como açúcar majoritário, da alga vermelha *Delesseria sanguinea* (GROTH; GRÜNEWALD; ALBAN, 2009). Polissacarídeos sulfatados derivados de microalgas vermelhas também mostraram tal atividade, através da inibição da migração de leucócitos polimorfonucleares (PMNs) induzida por uma molécula quimioatrativa padrão, além de bloquear parcialmente a adesão dos PMNs às células endoteliais (MATSUI et al., 2003).

Salienta-se que os mecanismos anti-inflamatórios são distintos dos nociceptivos, apesar da inflamação e dor possuírem muitos mediadores em comum (JULIUS; BAUSBAUM, 2001). Dentre estes mediadores estão os produtos da cascata da molécula do ácido araquidônico, como prostaglandinas e leucotrienos, cuja formação é inibida por drogas não-esteroidais (KUMMER; COELHO, 2002; MASFERRER et al., 1994; SEIBERT et al., 1994). As prostaglandinas por si próprias não causam dor, mas aumentam fortemente a indução da mesma por outros agentes como a serotonina (5-HT) e a bradicinina, em parte inibindo canais de potássio e em parte, facilitando a abertura de canais de cálcio por agentes nociceptivos (RANG et al., 2007; BENSSON, 1999). Os principais metabólitos do

ácido araquidônico responsáveis por efeitos hiperalgésicos são as PGE<sub>2</sub> e PGI<sub>2</sub>, o leucotrieno B<sub>4</sub> e o ácido hidroxieicosatetraenóico (HETE) (MILLAN, 1999).

Tendo em vista que a dor geralmente compõe o quadro clínico do processo inflamatório e a busca por um analgésico ideal utilizando modelos de nocicepção e dor em animais tem se mostrado em franco desmontar, a avaliação da atividade da galactana de *G. crinale* sobre este sinal cardinal se mostrou interessante. Inicialmente, o efeito antinociceptivo da galactana foi demonstrado em modelo de nocicepção química, tanto na fase inicial, mas principalmente na fase tardia do teste da formalina. Neste teste, a fase inicial (0-5 min) é devida à estimulação direta dos nociceptores, predominantemente de fibras do tipo C, e em parte de fibras do tipo A $\sigma$  (HUNSKAAR; HOLE, 1987), e envolve mediadores como a substância P, glutamato e bradicinina. Já a fase tardia (15-30 min) é caracterizada pela dor de cunho inflamatório, desencadeada por uma combinação de estímulos que incluem inflamação nos tecido periféricos e mecanismos de sensibilização espinhal e central (TJØLSEN et al., 1992), envolvendo a participação de histamina, serotonina, prostaglandinas, NO e bradicinina (MALMBERG; YARSH, 1992; CORRÊA; CALIXTO, 1993). Observou-se ainda o envolvimento da via opióide no mecanismo antinociceptivo da galactana sulfatada de *G. crinale* neste modelo, visto que na presença do antagonista de receptores opióides naloxona, a atividade antinociceptiva da galactana, de forma similar à morfina, era reduzida em ambas as fases.

Analgésicos opióides parecem ter ação antinociceptiva sobre ambas as fases do teste da formalina, embora a segunda fase seja mais sensível a essas substâncias. Em contraste, os agentes anti-inflamatórios não-esteroidais como a indometacina parecem suprimir somente a segunda fase (HUNSKAAR; HOLE, 1987; MALMBERG; YAKSH, 1992; JOURDAN et al., 1997), especialmente quando a formalina é injetada em altas concentrações (YASHPAL; CODERRE, 1998).

A antinocicepção induzida por opióides clássicos como a morfina é principalmente atribuída aos seus efeitos sobre o sistema nervoso central (MACPHERSON, 2002), mas muitos estudos indicam um importante papel na antinocicepção de receptores periféricos (OBARA; PRZEWLOCKI; PRZEWLOCKA, 2004). Os receptores opióides  $\mu$  (um),  $\kappa$  (kappa) e  $\delta$  (delta) são sintetizados nos neurônios do gânglio da raiz dorsal para o foco inflamatório periférico via transporte axonal nos neurônios sensoriais. Periféricamente, a ativação da analgesia opióide é

mais eficiente sob condições inflamatórias, já que a inflamação aumenta a ligação da proteína G a receptores opióides com subsequente ativação da cascata de sinalização; além disso, a inflamação destrói a barreira perineural para difusão de substâncias hidrofílicas de alto peso molecular, facilitando o acesso à membrana neuronal de agonistas como a morfina e peptídeos opióides (RITTNER; STEIN, 2005). Os efeitos analgésicos periféricos de opióides exógenos são potencializados sob condições inflamatórias (JASON; STEIN, 2003).

A literatura relata que opióides podem exercer ações antiinflamatórias na periferia (BARBER; GOTTSCHILICH, 1992), incluindo inibição da liberação de peptídeos pró-inflamatórios das terminações nervosas periféricas (YAKSH, 1988). Opióides também reduzem a inflamação produzida pela injeção intrapleural de carragenina (PLANAS et al., 1999) e inibem o extravasamento de plasma e o fluxo sanguíneo induzido por formalina em ratos, através da interação com receptores periféricos, retardando a síntese e/ou liberação de compostos pró-inflamatórios (TAYLOR et al., 2000).

Além disso, todas as subpopulações de células imunes incluindo linfócitos, monócitos e granulócitos liberam peptídeos opióides no sangue periférico, bem como em nódulos linfáticos inflamados ou não. Linfócitos e macrófagos, que podem produzir  $\beta$ -endorfinas, migram para o tecido inflamado, onde o peptídeo é secretado (CABOT et al., 1997). Além disso, a injeção local do fator liberador de corticotropina (CRF), de IL-1, IL-6 e ou TNF- $\alpha$  em patas inflamadas produz antinocicepção que é resultado da liberação local de peptídeos opióides e pode ser revertida por antagonistas opióides, anticorpos para opióides endógenos e imunossupressores (CZLONKOWSKI; STEIN; HERZ, 1993). A inflamação aumenta a expressão de peptídeos opióides tanto *in vitro* quanto *in vivo*, os quais podem ser encontrados no foco de uma inflamação induzida experimentalmente. Análises quantitativas revelam que na fase inicial da inflamação, granulócitos são as maiores fontes de produção de peptídeos opióides, e no desenvolvimento desta, os monócitos e macrófagos se tornam as principais fontes (revisado por RITTNER; STEIN, 2005).

A seguir, a atividade antinociceptiva da galactana foi avaliada em modelo de nocicepção térmica no teste da placa quente que relata uma dor associada à neurotransmissão central. Experiências utilizando este teste revelam substâncias antinociceptivas de ação primariamente na medula espinhal ou em níveis mais altos do sistema nervoso central ou ainda por mecanismo indireto (HUNSKAAR; HOLE,



1987). No entanto, observou-se que a galactana não apresentou efeito antinociceptivo neste modelo. Diante dos resultados obtidos, confirma-se que a atividade antinociceptiva da galactana sulfatada de *G. crinale* não envolve a participação do sistema nervoso central, sendo esta atividade principalmente periférica. Sugere-se que a galactana sulfatada pode estar interferindo tanto sobre a dor mediada por fibras nociceptivas primárias sensibilizadas (neurogênica) bem como na liberação/ação de mediadores da dor inflamatória. A correlação entre a atividade antiinflamatória da galactana sulfatada com a atividade antinociceptiva sobre a dor inflamatória, também sugere que pode haver a inibição/ação de mediadores comuns aos dois processos. A participação de receptores opióides no mecanismo do efeito antinociceptivo da galactana também foi claramente revelada, sugerindo que esta ação seja semelhante à dos analgésicos opióides sob condições inflamatórias.

Como parâmetro comparativo dos resultados da galactana de *G. crinale*, tem-se o estudo realizado com as frações de carboidratos sulfatados das algas marinhas vermelhas *Bryothamnion triquetrum* e *Bryothamnion seaforthii* (VIANA et al., 2002). Nesse estudo, observou-se que as frações de carboidratos sulfatados das duas algas inibiram as contorções abdominais induzidas por ácido acético, bem como a primeira e segunda fase do teste da formalina (quando administradas por via oral) e inibição somente da segunda fase quando injetadas por via i.p. O envolvimento da via central na atividade antinociceptiva das frações de carboidratos sulfatados também foi confirmada no estudo pelo aumento da latência ao estímulo térmico. E por fim, confirmou-se a participação da via opióide na atividade antinociceptiva das frações nos modelos químico (teste da formalina) e térmico (teste da placa quente), uma vez que estas atividades foram revertidas pelo pré-tratamento com naloxona.

Frente aos resultados anteriormente apresentados, buscou-se confirmar a atividade antinociceptiva da galactana sulfatada sobre o modelo de hiperalgesia induzida por carragenina, que reflete a dor de cunho inflamatório. Segundo observado, os animais tratados com a galactana apresentaram redução do número de respostas, evidenciando a clara atividade antinociceptiva da galactana sulfatada de *G. crinale* sobre a dor de cunho inflamatório, resultado este reforçado com a inibição da segunda fase do teste da formalina.

Segundo a literatura, a indução da hiperalgesia evocada pela carragenina resulta da combinação de efeitos entre a liberação de produtos da COX-2 e aminas simpatomiméticas (NAKAMURA; FERREIRA, 1987) e que a cascata de liberação de citocinas precede a geração destes mediadores (CUNHA et al., 1992). A indução da hiperalgesia ocorre com a liberação inicial de bradicinina, a qual estimula a liberação de TNF- $\alpha$ . Este, por sua vez, induz a liberação de IL-1 $\beta$  e IL-6, as quais ativam a COX-2 e subsequente síntese de eicosanóides, bem como IL-8, que estimula a produção de mediadores simpatomiméticos (FERREIRA et al., 1988; CUNHA et al., 1991). Dependendo da intensidade e natureza do estímulo, a liberação de TNF- $\alpha$  precede a formação de bradicinina (CUNHA et al., 1992; FERREIRA; LORENZETTI; POOLE, 1993; POOLE et al., 1999).

Logo, especula-se que a atividade antinociceptiva da galactana sulfatada de *G. crinale* pode ocorrer por mecanismos distintos da atividade anti-inflamatória, visto que a bradicinina não apresentou envolvimento nesta última. Possivelmente, a atividade antinociceptiva da galactana sobre a dor inflamatória pode ocorrer via inibição da enzima COX-2 e/ou via inibição da liberação/ação de eicosanóides, principalmente prostaglandinas, como sugerido para a atividade antiinflamatória.

É importante salientar que o tratamento endovenoso dos animais com a galactana sulfatada parece não ter causado toxicidade sistêmica, tendo em vista que houve pouca ou nenhuma alteração nos órgãos e parâmetros bioquímicos avaliados. O número de células circulantes no sangue (hemograma) dos animais tratados com a galactana sulfatada se mostrou alterado nos valores de hematócrito, hemácias, leucócitos e linfócitos em relação ao controle, bem como nas dosagens de uréia e creatinina (indicadores da função renal) e aspartato amino transferase e alanina amino transferase (indicadores da função hepática). Já o equilíbrio osmótico, visto através das dosagens de proteínas plasmáticas totais, não foi alterado.

Apesar das diferenças em alguns padrões hematológicos e bioquímicos entre os grupos tratado e controle, estas não se mostraram acentuadas. Tais alterações são relatadas na literatura e são consideradas normais, tendo em vista que pode haver variações intraespécie relacionadas ao sexo, linhagem e genótipo decorrentes de fatores como idade, dieta, manuseio e de ordem ambiental, bem como variações ligadas à escolha do método de análise empregado (LILLIE et al., 1996; HALDELMAM; BLUE, 1993). A literatura também apresenta alguns estudos com valores de referência de parâmetros bioquímicos e hematológicos para ratos

Wistar que, quando comparados, apresentam diferenças entre si (LILLIE et al., 1996; WOLFORD et al., 1986). Logo, pode-se sugerir que as variações apresentadas entre os grupos tratado e controle do presente trabalho parecem não estar ligadas a um possível efeito tóxico da galactana sulfatada, visto que o tratamento com polissacarídeos sulfatados é bastante explorado na literatura e evidencia a baixa toxicidade destas substâncias, mesmo que haja diferenças sutis entre os parâmetros hematológicos e bioquímicos entre os grupos tratado e controle (GIDEON; RENGASAMY, 2008; LI; ZHANG; SONG, 2005).

Estes resultados sugerem que a galactana sulfatada da alga marinha *Gelidium crinale* pode ser utilizada como ferramenta importante na elaboração de novas substâncias com grande potencial anti-inflamatório e analgésico. Desta forma, abrem-se novas perspectivas envolvendo o estudo mais aprofundado das atividades biológicas desta galactana, os quais podem revelar uma substância com grande aplicabilidade biotecnológica.

## 7. CONCLUSÕES

A galactana sulfatada da alga marinha vermelha *Gelidium crinale* apresenta atividade pró- e anti-inflamatória, sendo tais atividades dependentes da via de administração e envolvendo os eventos vasculares da inflamação;

O efeito antiedematogênico da galactana parece ocorrer através da inibição da liberação e/ou ação da histamina, bem como através da inibição da ativação da COX-2;

A galactana sulfatada apresenta atividade antinociceptiva sobre as dores neurogênica e, principalmente inflamatória, sendo esta atividade predominantemente periférica com envolvimento de receptores opióides.

O tratamento de ratos com a galactana sulfatada não evidenciou toxicidade.

## REFERÊNCIAS

AQUINO, R. S. et al. Occurrence of sulfated galactans in marine angiosperms: Evolutionary implications. **Glycobiology**, v. 15, p.11–20, 2005.

ARFORS, K. E.; LEY, K. Sulfated polysaccharides in inflammation. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 121(2), p. 201-202, 1993.

ARMISEN, R. World-wide use and importance of *Gracilaria*. **J. of App. Phyc.**, v. 7, p.231-243, 1995.

ARUFFO, A. et al. CD26/P-selectin recognition of myeloid and tumor cell sulfatides. **Cell**, v. 67(1), p.35-39, 1991.

ASSREUY, A. M. S. et al. Biological Effects of a Sulfated-Polysaccharide Isolated from the Marine Red Algae *Champia feldmannii*. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 31(4), p. 691-695, 2008.

BAUHMANN, H.; GAULDIE, J. The acute phase response. **Immunol. Today**, v. 15, p. 74-80, 1994.

BARBER, A.; GOTTSCHILICH, R. Opioid agonists and antagonists: an evaluation of their peripheral actions in inflammation. **Med. Res. Rew.**, v. 12, p. 525-562, 1992.

BECKMAN, J. S.; KOPPENOL, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. **Am. J. Physiol.**, v. 271, p. 1424-1437, 1996.

BENSSON, J. M. The neurobiology of pain. **Lancet**, v. 353, p. 1610-1615, 1999.

BERTEAU, O.; MULLOY, B. Sulfated fucans, fresh perspectives: Structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. **Glycobiology**, v. 13, p. 29–40, 2003.

BERSTAD J. Dextran-induced release of serotonin from isolated rat peritoneal mast cells. **Acta Pharmacol. Toxicol.**, v.47, p. 213-216, 1980.

BLONDIN, C. et al. Inhibition of complement activation by natural sulfated polysaccharides (fucans) from brown seaweed. **Mol. Immunol.**, v. 31, p. 247-253, 1994.

BOISSON-VIDAL, C. et al. Biological activities of polysaccharides from marine algae. **Drug. Fut.**, v. 20 (4), p. 1237-1249, 1995.

CABOT, P. J. et al. Immune cell-derived beta-endorphin. Production, release and control of inflammatory pain in rats. **J. Clin. Invest.**, v. 100, p. 142-148, 1997.

CALHOUN, W.; CHANG, J.; CARLSON, R. P. Effect of selected anti-inflammatory agents and other drugs on zymosan, arachidonic acid, PAF and carrageenan induced paw edema in the mouse. **Agents Actions**, v.21, p. 306-309, 1987.

CALIXTO, J. B. et al. Kinin B1 receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. **Br. J. Pharmacol.**, v. 143(7), p. 803-818, 2004.

CÁSSARO, C. M. F.; DIETRICH, C. P. Distribution of sulfated mucopolysaccharides in invertebrates. **J. Biol. Chem.**, v. 252, p. 2254–2261, 1977.

CORRÊA, C. R.; CALIXTO, J. B. Evidences for participation of B1 e B2 kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse. **Br. J. Pharmacol.**, v. 10, p. 193-198, 1993.

COSTA, L. S. et al. Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. **Biomed. Pharmacother.**, v. 64, p. 21–28, 2010.

CUMASHI, A. Et al. Consorzio Interuniversitario Nazionale per la Bio-Oncologia, Italy. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. **Glycobiology**, v. 17, p. 541–552, 2007.

CUNHA, F.Q. et al. Interleukin- 8 as a mediator of sympathetic pain. **Br. J. Pharmacol.**,v. 104, p. 765–767, 1991.

\_\_\_\_\_ et al. The pivotal role of tumor necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, v. 107, p. 660–664, 1992.

CUZZOCREA, S. et al. Zymosan activated plasma induces paw oedema by nitric oxide and prostaglandin production. **Life Sciences**, v. 60, n. 3, p. 215-220, 1997.

CZLONKOWSKI, A.; STEIN, C.; HERZ, A. Peripheral mechanisms of opioid antinociception in inflammation: involvement of cytokines. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 242, p. 229-235, 1993.

DAMAS, J.; PRUNESCO, P. Presence of immunoreactive platelet-activating factor in peritoneal exudate induced by zymosan in rats. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.**, v. 322, p. 115-123, 1990.

DAMONTE, E. et al. Antiviral activity of a sulphated polysaccharide from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*. **Biochem. Pharmacol.**, v.15, n. 47(12), p. 2187-92, 1994.

DAVIDGE, S.T. et al. Nitric oxide produced by endothelial cells increases production of eicosanoids through activation of prostaglandin H synthase. **Circ. Res.**, v. 77, p. 274-283, 1995.

DiROSA, M.; GIROUD, J. P.; WILLOUGHBY, D. A. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **J. Pathol.**, v. 104 (1), p. 15-29, 1971.

EDDY, N. B.; LEIMBACH, D. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl- and dithienylbutylamines. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 107, p. 385-393, 1953.

ENGELBERG, H. Heparin, non-heparin glycosaminoglycans and heparinoids: an overview of their application in arteriosclerosis. **Semin. Thromb. Haemost.**, v. 17, p. 5-8, 1991.

FARIAS, W. R. L. et al. Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans. Isolation of a unique sulfated galactan from the red algae *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans from invertebrates. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 29299–29307, 2000.

FELDBERG, W.; TALESNIK, J. Reduction of tissue histamine by compound 48/80. **J. Physiol.**, v.120, p. 550-568, 1953.

FERREIRA, S.H. et al. Interleukin- 1b as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. **Nature**, v. 334, p. 698–700, 1988.

FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B. B.; POOLE, S. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, v.110, p. 1227–1231, 1993.

FORTES, Z. B.; HYSLOP, S.; DENNUCI, G. Endothelial-derived vascular relaxing factors: role of nitric oxide. In: BRAIN, S. D.; PAGE, C. **Immunopharmacology of Microcirculation**. New York: Academic Press, 1994. p. 16-42.

FU, J. Y. et al. The induction and suppression of prostaglandin H2 synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. **J. Biol. Chem.**, v. 265, p. 16737-16740, 1990.

FÜRST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Res. Bull.**, v. 48, p. 129-141, 1999.

GEWALTIG, M. T.; KOJDA, G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potencial. **Cardiovasc. Res.**, v. 55, p. 250-60, 2002.



GIDEON, T. P.; RENGASAMY, R. Toxicological evaluation of fucoidan from *Cladosiphon okamuranos*. **J. Med. Food**, v. 11 (4), p. 638-642, 2008.

GREGOR, R.; WINDHORST, U. **Comprehensive Human Physiology**. Berlin: Springer Verlag, 1996.

GRUBB, B. D. Peripheral and central mechanism of pain. **Br. J. Anaesth.**, v. 81, p. 8-11, 1998.

GROTH, I.; GRÜNEWALD, N.; ALBAN, S. Pharmacological profiles of animal and non-animal-derived sulfated polysaccharides - comparison of unfractionated heparin, the semisynthetic glucan sulfate PS3, and the sulfated polysaccharide fraction isolated from *Delesseria sanguinea*. **Glycobiology**, v.19 (4), p. 408–417, 2009.

GULATI, O. P.; SHARMA, S. C.; HAMMERSEN, F. Hemodynamic, biochemical and morphological changes in the dextran and D-galactosamine-induced edemas in rats. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.**, v. 263(2), p. 272-287, 1983.

HALDELMAN, C.T.; BLUE, J. Laboratory data: read beyond the numbers. In: **Veterinary laboratory medicine: in practice**. Trenton: Veterinary Learning Systems, 1993.

HODGE, D. R.; HURT, E. M.; FARRAR, W. L. The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer. **Eur. J. Cancer**, v. 41, p. 2502-2512, 2005.

HOKFELT, T.; JOHANNSON, O.; LJUNGDAHL, A. Peptidergic neurones. **Nat.**, v.284, p. 515-521,1980.

HU, T. et al. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Undaria pinnatifida* in vitro. **Int. J. Biol. Macrom.**, v. 46, p.193–198, 2010.

HUNSKAAR, S., ROLE, K., The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30(1), p.103-114, 1987.

HUNT, S. P., KELLY, J. S.; EMSOM, P. C. An immunohistochemical study of neuronal populations containing neuropeptides or gamma-aminobutyrate within the superficial layers of the rat dorsal horn. **Neuroscience**, v. 6, p. 1883-1898, 1981.

INOUE, T. et al. Nitric oxide mediates interleukin-1-induced prostaglandin E<sub>2</sub> production by vascular smooth muscle cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 194, p. 420-424, 1993.

JAMES, S. L. Role of nitric oxide in parasitic infections. **Microbiol. Rev.**, v. 59(4), p. 533-47, 1995.

JASON, W.; STEIN, C. Peripheral opioid analgesia. **Curr. Pharm Biotechnol.**, v. 4, p. 270-274, 2003.

JOURDAN, D. et al. A new automated method of pain scoring in the formalin test in rats. **Pain**, v. 71, p.265–270, 1997.

JULIUS, D; BASBAUM, J. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, v. 413, p. 203-210, 2001.

KLOAREG, B.; QUATRANO, R. S. Structure of cell wall of marine algae and ecophysiological functions of matrix polysaccharides. **Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.**, v. 26, p. 259-315, 1998.

KNOWLES, R. G. et al. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 86, p. 5159-62, 1989.

KULINSKY, V. I. Biochemical aspects of inflammation. **Biochem.**, v. 72 (6), p. 733-746, 2007.

KUMMER, C. L.; COELHO T. C. R. B. Antiinflamatórios não esteróides inibidores da Ciclooxigenase-2 (COX-2): aspectos atuais. **Rev. Bras. Anesthesiol.**, v. 54(4), p. 498-512, 2002.

LANDUCCI, E.C.T. et al. Inhibition of carrageenan - induced rat paw oedema by crotapotin, a polypeptide complexed with phospholipase A<sub>2</sub>. **Br. J. Pharmacol.**, v.114 (3), p. 578-583, 1995.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal models of nociception. **Pharmacol. Rev.**, v. 53, p. 597-652, 2001.

LEHNINGER, A.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Savier, 2006. 1202 p.

LI, N.; ZHANG, Q.; SONG, J. Toxicological evaluation of fucoidan from *Laminaria japonica* in Wistar rats. **Food Chem. Toxicol.**, v. 43 , p. 421-426, 2005.

LILLIE, L.E. et al. Reference values for young normal Sprague-Dawley rats: weight gain, hematology and clinical chemistry. **Hum. Exp. Toxicol.**, v. 15, n. 8, p. 612-616, 1996.

LINHARDT, R. J.; TOIDA, T. Heparin oligosaccharides: new analogues development and applications. In.: WITEZAK, Z. J.; NIEFORTH, K. A. **Carbohydrate in drug design**. New York: Mareel Dekker, 1997. p. 277-341.

LINS, K. O. A. L. et al. Antitumor properties of a sulfated polysaccharide from the red seaweed *Champia feldmannii* (Diaz-Pifferer). **J. Appl. Toxicol.**, v. 29 (1), p. 20-26, 2009.

LO, T. N.; ALMEIDA, A. P.; BEAVEN, M. A. Dextran and carrageenan evoke different inflammatory response in rat with respect to composition of infiltrates in effect of indomethacin. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 221, p. 261-267, 1982.

MACPHERSON, R. D. New directions in pain management. **Drugs Today**, v. 38, p. 135-145, 2002.

MALING, H. M. et al. Inflammation induced by histamine, serotonin, bradykinin and compound 48/80 in the rat: antagonists and mechanisms of action. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 191(2), p. 300-310, 1974.

MALMBERG, A. B.; YAKSH T. L. Antinociceptive actions of spinal anti-inflammatory agents on the formalin test in the rat. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 263, p.136–146, 1992.

MARLETTA, M. A. Nitric oxide synthase structure and mechanism. **J.Biol.Chem.**, v. 268(17), p. 12231-1234, 1993.

MARQUES, A. H.; CIZZA, G.; STERNBERG, E. Interações imunocerebrais e implicações nos transtornos psiquiátricos. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, v. 29. p. 27-32, 2007.

MASFERRER, J. L. et al. Selective regulation of cellular cyclo-oxygenase by dexamethasone and endotoxin in mice. **J. Clin. Invest.**, v. 86, p. 1375-1379, 1990.

\_\_\_\_\_. Endogenous glucocorticoids regulate an inducible cyclooxygenase enzyme. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 89, p. 3917-3921, 1992.

\_\_\_\_\_. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, v. 91, p. 3228–3232, 1994.

MATHEWS, M. B. Polyanionic proteoglycans. In: KLEINZELLER, A.; SPRINGER, G. F.; WITMANN, H. G. (Eds.). **Connective Tissue: Macromolecular Structure and Evolution**. Berlin: Springer- Verlaq, p. 93-125, 1975.

MATSUI, M. S. et al. Sulfated polysaccharides from red microalgae have antiinflammatory properties in vitro and in vivo. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 104(1), p. 13-22, 2003.

MAYHAN, W. G. Role of nitric oxide in modulating permeability of hamster cheeks pouch in response to adenosine 5-diphosphate and bradykinin. **Inflamm.**, v. 16, p. 295-305, 1992.

McHUGH, D. J. Worldwide distribution of commercial resources of seaweeds including *Gelidium*. **Hydrob.**, v. 221, p. 19-29, 1991.

MEDEIROS, V. P. et al. Sulfated galactofucan from *Lobophora variegata*: anticoagulant and anti-inflammatory properties. **Biochem. (Mosc)**., v. 73 (9), p. 1018-1024, 2008.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Prog. Neurobiol.**, v. 57, p. 1-164, 1999.

MOODLEY, I.; MONGAN, J. L.; FOREMAN, J. C. Histamine release induced by dextran: the nature of the dextran receptor. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 83, p. 69-81, 1982.

MOLLACE, V. et al. Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors. **Pharmacol. Rev.**, v. 57, p. 217–252, 2005.

MONCADA, S. et al. Na enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. **Nature**, v. 263, p. 663-665, 1976.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, v. 43, 109- 141, 1991.

MOURÃO, P. A. Use of sulfated fucans as anticoagulant and antithrombotic agents: Future perspectives. **Curr. Pharm. Design.**, v. 10, p. 967–981, 2004.

\_\_\_\_\_. A carbohydrate-based mechanism of species recognition in sea urchin fertilization. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 40, p. 5–17, 2007.

MOURÃO, P. A.; ASSREUY, A. M. Trehalose as a possible precursor of the sulfated L-galactan in the ascidian tunic. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 3132–3140, 1995.

MOURÃO, P. A.; PEREIRA, M. S. Searching for alternatives to heparin: sulfated fucans from marine invertebrates. **Trends. Cardiovasc. Med.**, v. 9(8), p. 225-232, 2000.

MOURÃO, P. A.; PERLIN, A. S. Structural features of sulfated glycans from the tunic of *Styela plicata* Chordata-Tunicata: A unique occurrence of L-galactose in sulfated polysaccharides. **Eur. J. Biochem.**, v. 166, p. 431–436, 1987.

NAIR, R.; CHABHADIYA, R.; CHANDA, S. Marine algae: screening for a potent antibacterial agent. **J. Herb. Pharmacol.**, v. 7(1), p.73-86, 2007.

NAKAMURA, M.; FERREIRA, S. H. A peripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia. **Eur. J. Pharmacol.** , v. 135, p. 145–153, 1987.

NATHAN, C. Inducible nitric oxide synthase. **J. Physiol.**, v. 59, p. 783-787, 1997.

NAVA, E.; LÜSCHER, T. F. Endothelium-derived vasoactive factors in hypertension: nitric oxide and endothelin. **J. Hypert.**, v. 13, p. 39-48, 1995.

NISHIDA, S.; KAGAWA, K.; TOMIZAWA, S. Dextran-induced paw edema and 5-hydroxytryptamine release. **Biochem. Pharmacol.**, v. 28, p. 3149-3150, 1979.

OBARA, I.; PRZEWLOCKI, R.; PRZEWLOCKA, B. Local peripheral effects of mu-opioid receptor agonists in neuropathic pain in rats. **Neurosci. Lett.**, v. 360, p. 85-89, 2004.

OLOFSSON, A. M. et al. E-Selectin Mediates Leukocyte Rolling in Interleukin-I - Treated Rabbit Mesentery Venules. **Blood J.**, v. 84, p. 2749-2758, 1994.

PAINTER, T. J. Algal Polysaccharides. In: ASPINALL, G. O. **The Polysaccharides**. New York: Academic Press, 1983, p. 195-285.

PARRATT, J. R.; WEST, G. B.: Inhibition by various substances of oedema formation in the hindpaw of the rat induced by 5-hydroxytryptamine, histamine, dextran, egg white and compound 48/80. **Brit. J. Pharmacol.**, v. 13, p. 65-70, 1958.

PATANKAR, M. S. et al. A revised structure for fucoidan may explain some of its biological activities. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 21770-21770, 1993.

PATON, W. D. M. Compound 48/80, a potent histamine liberator. **Brit. J. Pharmacol.**, v. 6, p. 499-508, 1951.

PERCIVAL, E.; MCDOWELL, R. H. **Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides**. London: Academic Press, London, 1967.

PEREIRA, M. S.; MULLOY, B.; MOURÃO, P. A. Structure and anticoagulant activity of sulfated fucans: Comparison between the regular repetitive and linear fucans from echinoderms with the more heterogeneous and branched polymers from brown algae. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 7656-7667, 1999.

PEREIRA, M. G. et al. Structure and anticoagulant activity of a sulfated galactan from the red alga, *Gelidium crinale*. Is there a specific structural requirement for the anticoagulant action? **Carbohydr. Res.**, v. 340, p. 2015-2023, 2005.

PERFETO, P. N. M. et al. Efeitos da temperatura, intensidade luminosa e concentração de fósforo na composição química de *Gelidium crinale* (Turner) Lamouroux (Rhodophyta, Gelidiaceae). **Biosci.**, v. 12, n. 1, p. 3-10, 2004.

PIERETTI, S. et al. Local anti-inflammatory effect and behavioral studies on new PDE4 inhibitors. **Life Sciences**, v. 79, p.791-800, 2006.

PLANAS, M. E. et al. Pharmacological evidence for the involvement of the endogenous opioid system in the response to local inflammation in the rat paw. *Pain*, v. 60, p. 67-71, 1999.

POMIN, V. H.; MOURÃO, P. A. de S. Bioquímica dos carboidratos: de adoçantes a medicamentos. **Ciência hoje**, v. 39, n. 233, p. 24-31, 2006.

POOLE, S. et al. Bradykinin B1 and B2 receptors, tumor necrosis factor a and inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, v. 126, p. 649–656, 1999.

POMIN, V. H. Structural and functional insights into sulfated galactans: a systematic review. **Glycoconj. J.**, v. 27(1), p. 1-12, 2010.

PREOBRAZHENSKAYA, M. E. et al. Fucoidan inhibits leukocyte recruitment in a model peritoneal inflammation in rat and blocks interaction of P-selectin with its carbohydrate ligand. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, v. 43, p. 443-451, 1997.

RADOMSKI, M. W. et al. An L-arginine: nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 87, p. 5193-5197, 1990.

\_\_\_\_\_. Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. **Br. J. Pharmacol.**, v. 9, p.181-187, 1987.

RAMANA, K. S; RAO, E. V. Structural features of the sulphated polysaccharide from a green seaweed, *Cladophora socialis*. **Phytochem.**, v. 30, n. 1, p. 259-262, 1991.

RANG, H. P., et al. **Farmacologia**. 6ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. 920 p.



RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. Protista II: Heterocontas e algas verdes. In: **Biologia vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 356-383.

RILEY, J. F.; WEST, G. B. Skin histamine: Its location in the tissue mast cells. **Arch. Dermatol.**, v. 74, p. 471-478, 1956.

RITTNER, H. L.; STEIN, C. Involvement of cytokines, chemokines and adhesion molecules in opióide analgesia. **Eur. J. Pain**, v. 9, p. 109-112, 2005.

ROBBINS, S. S.; COTRAN, R. S. **Pathologic basis of diseases**. 7. ed. Philadelphia: Sauders, 2005. p. 1524.

ROCHA, H. A. O. et al. Polissacarídeos sulfatados de algas marinhas com atividade anticoagulante. **Infarma.**, v. 16, p. 1-2, 2004.

ROCHA e SILVA, M. A. A brief survey of history of inflammation. **Agents Actions**, v. 8, p. 45-49, 1979.

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

SALINAS, J. M. Spray system for re-attachment of *Gelidium sesquipedale* (Clem.) Born. et Thur. (Gelidiales- Rhodophyta). **Hydrob.**, v. 221, p. 107-117, 1991.

SALVEMINI, D. et al. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. **Brit. J. Pharmacol.**, v.118, n. 4, p. 829-838, 1996.

\_\_\_\_\_. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 90, p. 7240- 7244, 1993.

\_\_\_\_\_. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. **Cell**, v. 7, p. 927-30, 1994.

SANTELICES, B. Production ecology of *Gelidium*. **Hydrob.**, v. 221, p. 31-44, 1991.

SALVEMINI, D. et al. Regulation of prostaglandin production by nitric oxide; an *in vivo* analysis. **Br. J. Pharmacol.**, v. 114, p. 1171-1178, 1995.

SAUTEBIN, L. et al. Modulation by nitric oxide of prostaglandin biosynthesis in the rat. **Br. J. Pharmacol.**, v. 114, p. 323-328, 1995.

SEIBERT, K. et al. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, v. 91, p. 12013–12017, 1994.

SCOTT-BURDEN, T.; VANHOUTTE, P.M. The endothelium as a regulator of vascular smooth muscle proliferation. **Circulation**, v. 87, p. 51-55, 1993.

SHARMA, J. N.; BUCHANAN, W. W. Pathogenic responses of bradykinin system in chronic inflammatory rheumatoid disease. **Exp. Toxicol. Pathol.**, v. 46, p. 421- 433, 1994

SIQUEIRA JR., J. F; DANTAS, C. J. S. **Mecanismos celulares e moleculares da inflamação**. Rio de Janeiro: MEDSI, 2000. 238 p.

SINHA, S. et al. Polysaccharides from *Sargassum tenerrimum*: Structural features, chemical modification and anti-viral activity. **Phytochem.**, v. 71, p. 235–242, 2010.

STANLEY, D. W.; GOFF, H. D.; SMITH, A. K. Texture-structure relationships in foamed dairy emulsions. **Food Res. Int.**, v. 29(1), p. 1-33, 1996.

STEPHEN, A. M. **Food Polysaccharides and their applications**. New York: Marcel Dekke, p. 1-19, 1995.

TAYLOR B. K. et al. Opioid inhibition of formalin-induced changes in plasma extravasation and local blood flow in rats. **Pain**, v.84, p. 263-270, 2000.

TARAYRE, J. P. et al. Pharmacological studies on zimosan inflammation in rats and mice.1: Zymosan-induced paw oedema in rats and mice. **Pharmacol. Res.**, v. 21(4), p. 375-384, 1989.

TEDDER, T. F. et al. The selectins: vascular adhesion molecules. **FASEB J.**, v. 9, p.866-873, 1995.

THIEMERMANN, C. Nitric oxide and septic shock. **Gen. Pharmacol.**, v. 29(2), p. 159-166, 1997.

THOMAZZI, et al. Tumor necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-8 mediate the nociceptive activity of the supernatant LPS-stimulated macrophages. **Med. Inflamm.**, v. 6, p. 195-200, 1997.

TISSOT, B.; DANIEL, R. Biological properties of sulfated fucans: the potent inhibiting activity of algal fucoidan against the human compliment system. **Glycobiology**, v. 13(6), p. 29R-40R, 2003.

TJØLSEN A., et al. The formalin test: an evaluation of method. **Pain**, v.51, p. 5-17, 1992.

USOV, A. I. Structural analysis of red seaweed galactans of agar and carrageenan groups. **Food Hydrocol.**, v.12, p. 301–308, 1998.

VAN WAUVE, J. P.; GOOSENS, J. G. Arabinolactan and dextran induced ear inflammation in mice: differential inhibition by H1-antihistamines, 5-HT serotonin antagonists and lipoxygenase blockers. **Agents Actions**, v. 28, p. 78-82, 1989.

VENKATESWARLU, S. et al. Synthesis, structural revision, and biological activities of 4'-chloroaurone, a metabolite of marine brown alga *Spatoglossum variabile*. **Tetrahedron**, v.63 (29), p. 6909-6914, 2007.

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

VIANA , G.S.B. et al. Antinociceptive activite of sulfated carbohydrates from the red algae *Bryothamnion seaforthii* (Turner) Kutz and *B. triquetrum* (S. G. Gmel) M Howe. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 35, p. 713-722, 2002.

VIEIRA, L.A.P. et al. The alga *Bryothamnion seaforthii* contains carbohydrates with antinociceptive activity. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 37(7), p. 1071-1079, 2004.

VINEGAR, R.; SCHREIBER, W.; HUGO, R. Biphasic development of carrageenan edema in rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 166, p. 95-103, 1969.

VIVANCOS, G. G. et al. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. **Braz. J. Med. Biol. Res**, v. 37(3), p. 391-399, 2004

WEDMORE, C. V.; WILLIAMS, T. J. Control of vascular permeability by polymorphonuclear leukocytes in inflammation. **Nat.**, v. 289, p. 646-650, 1981.

WENNMALM, A. Endothelial nitric oxide and cardiovascular disease. **J. Int. Med.**, v. 235, p. 317-27, 1994.

WESTON, S. A.; PARISH, C. R. Modification of lymphocyte migration by mannans and phosphomannans: different carbohydrate structures control entry of lymphocytes into spleen and lymph nodes. **J. Immunol.**, v.146, n. 12, p. 4180-4186, 1991.

WILHELM, D. L. The mediation of increased vascular permeability in inflammation, **Pharmacol. Rev.**, v. 14, p. 251-280, 1962.

WOLFORD, S.T. et al. Reference range data base for serum chemistry and hematology values in laboratory animals. **J. Toxicol. Health**, v. 18, p. 161-188, 1986.

WOLIN, M. S. Interactions of oxidants with vascular signaling systems. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 20, p.1430-42, 2000.

WU, K. K. Inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase. **Adv. Pharmacol.**, v. 33, p. 179–207, 1995.

YAKSH, T. L. Substance P release from knee joint afferent terminals: modulations by opioids. **Brain Res.**, v. 458, p. 319-324, 1988.

YASHPAL, K.; CODERRE, T. J. Influence of formalin concentration on the antinociceptive effects of anti-inflammatory drugs in the formalin test in rats: separate mechanisms underlying the nociceptive effects of low- and high-concentration formalin. **Eur. J. Pain**, v. 2, p.63–68, 1998.

YU, P.Z. et al. Antihyperlipidemic effects of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa*. **Pharmacol. Res.**, v.48, n.6, p.543-549, 2003.

ZACHARSKI, L. R.; ORNSTEIN, D. L. Heparin and cancer. **Thrombosis and Haemost.**, v. 17, p. 289-297, 1998.

ZHOU, G. et al. In vivo antitumor and immunomodulation activities of different molecular weight lambdacarrageenans from *Chondrus ocellatus*. **Pharmacol. Res.**, v.50(1), p.47-53, 2004.