



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CULTURA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

GENILSON JOSÉ DIAS JÚNIOR

**POLISSACARÍDEO SULFATADO EXTRAÍDO DA ALGA MARINHA VERME-
LHA *Gracilaria caudata* DIMINUI DANOS INFLAMATÓRIOS E FUNCIONAIS
NA LESÃO HEPÁTICA INDUZIDA POR NIMESULIDA**

**PARNAÍBA-PI
2018**

GENILSON JOSÉ DIAS JÚNIOR

**POLISSACARÍDEO SULFATADO EXTRAÍDO DA ALGA MARINHA VERME-
LHA *Gracilaria caudata* DIMINUI DANOS INFLAMATÓRIOS E FUNCIONAIS
NA LESÃO HEPÁTICA INDUZIDA POR NIMESULIDA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Linha de pesquisa: Farmacologia Molecular

Orientador: Dr. André Luiz dos Reis Barbosa.

**PARNAÍBA-PI
2018**

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial Prof. Cândido Athayde – Campus Parnaíba
Serviço de Processamento Técnico

D541p Dias Júnior, Genilson José
 Polissacarídeo sulfatado extraído da alga marinha vermelha gracilaria caudata diminui danos inflamatórios e funcionais na lesão hepática induzida por nimesulida [manuscrito] / Genilson José Dias Júnior. – 2018.
 73 f. : il. color.

 Impresso por computador (printout).
 Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Piauí, 2018.
 Orientação: Prof. Dr. André Luiz dos Reis Barbosa.

 1. Migração de Neutrófilos. 2. Estresse Oxidativo. 4. Lesão Hepática. 5. Nimesulida. 6. Processo Inflamatório. I. Título.

CDD: 615.1

GENILSON JOSÉ DIAS JÚNIOR

**POLISSACARÍDEO SULFATADO EXTRAÍDO DA ALGA MARINHA VERME-
LHA *Gracilaria caudata* REVERTE DANOS INFLAMATÓRIOS E FUNCIO-
NAIS NA LESÃO HEPÁTICA INDUZIDA POR NIMESULIDA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Piauí, Campus Parnaíba, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, sob orientação do professor Dr. André Luiz dos Reis Barbosa.

Data da aprovação: 24/05/2018

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. André Luiz dos Reis Barbosa (orientador)
Universidade Federal do Piauí

Prof. Dr. Daniel Fernando Pereira Vasconcelos
(Examinador interno)
Universidade Federal do Piauí

Prof. Dr. Joilson Ramos de Jesus
(Examinador externo)
Universidade Federal do Piauí

**Parnaíba-PI
2018**

DEDICATÓRIA

**Dedico esse trabalho à Deus,
por ele, o nosso todo poderoso
e Emídio Galdino Dias (*in memoriam*)**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro ao meu maravilhoso DEUS, que em todos os momentos vividos estive ao meu lado, mantendo minha integridade, zelando pela minha saúde e abençoando aqueles que me cercam;

Aos meus pais Genilson Dias e Ana Lúcia, pelo amor e ensinamento durante minha criação e pelo apoio nas lutas em busca dos meus objetivos;

Aos meus irmãos Jordana, Samanta, Elisa, Gabriel, Isadora e Sandrelly, pelo incessante desejo de vitória em todas as jornadas enfrentadas;

À minha família (principalmente, Tiene, Neta e Tia Ida), pelos mais sinceros apoios, carinhos e conselhos dados, que ilumina e servem de muralhas firmes nas batalhas;

À todos os amigos que nas esperanças de dias melhores, me apoiaram e me sentiram presente em cada dia importante no qual não pude comparecer.

Aos alunos de iniciação científica do grupo LAFFEX, em especial: Cynthia e Victor e Simião, pela enorme força e parceria nas bancadas laboratoriais durante as pesquisas;

Aos alunos de doutorado Tércisio Veira Brito pelo apoio e dedicação desde do meu tempo de iniciação científica e Sarah Lemos, por ter me ajudado muito nessa nova área trabalhada durante essa pesquisa;

Ao meu orientador Prof. Dr. André Luiz, pela sapiência, ensinamentos e cautela nas tomadas de decisões, além de guiar de forma primorosa o andamento desta pesquisa;

Aos membros da banca Prof. Dr. Daniel Vasconcelos e Prof. Dr. Joilson Ramos, que aceitaram prontamente o convite dessa etapa tão importante;

A todo o grupo do Laboratório de Fisiofarmacologia Experimental (LAFFEX) e ao programa de pós-graduação em biotecnologia, pela contribuição na minha formação;

A todo o grupo do Laboratório de Fisiofarmacologia Gastrointestinal (LEFFAG), em especial ao pós-doc Renan e Carlos, além do aluno de mestrado Humberto, pela enorme atenção e ajuda durante a execução do projeto em Fortaleza;

À coordenadora do mestrado Dra. Durcilene e sua secretária Selmira, por toda atenção atribuída durante essa empreitada;

Ao CAPES/CNPq pelo apoio financeiro necessário na execução deste trabalho.

**“Você faz o melhor ou o possível?
Fazer o melhor, é o teu melhor na condição que você tem,
enquanto você não tem condições melhores para fazer melhor ainda.”**

Mário Sérgio Cortella

RESUMO

Introdução: Polissacarídeos sulfatados compreendem um grupo de biopolímeros, heterogêneos e complexos oriundos da matriz extracelular de algas marinhas. Os polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *G. caudata* tem sido bastante estudado devido às suas propriedades e características bioquímicas específicas, que prover alguns efeitos farmacológicos comprovados, dentre os quais se destaca sua ação anti-inflamatória. **Objetivo:** O presente trabalho teve como objetivo avaliar a ação anti-inflamatória e antioxidante do polissacarídeo sulfatado da *Gracilaria caudata* sobre os efeitos da lesão hepática induzida por nimesulida em camundongos. **Métodos:** O polissacarídeo foi submetido a testes farmacológicos, neste estudo foram utilizados camundongos *Swiss* machos pesando entre 25-30 g, sendo divididos em grupos de 8-10 animais. A lesão hepática foi induzida usando a nimesulida 200 mg/kg uma vez ao dia durante 5 dias consecutivos e após cada indução os animais foram tratados com o polissacarídeo sulfatado da *G. caudata* nas doses de 2,5, 5 ou 10 mg/kg. Após o último dia de indução da lesão hepática e tratamento com o polissacarídeo foram coletados os soros dos animais e depois eutanasiados e tiveram seus fígados retirado para avaliação dos escores histológicos, peso relativo e dosagens bioquímicas como: mieloperoxidase, interleucina 1 beta, fator de necrose tumoral alfa, glutathione, ácido malonildialdeído, nitrato/nitrito, além dos marcadores de função hepática como alanina amino transferase, aspartato amino transferase e gama glutamil transferase. **Resultados:** O tratamento dos animais com este polissacarídeo na dose de 10 mg/kg demonstrou um padrão de redução da lesão hepática através da visualização histológica, bem como uma diminuição do peso do fígado mesmo. Além disto, o polissacarídeo em questão, mostrou uma redução significativa de todos os testes bioquímicos avaliados, especialmente os marcadores de migração de leucócitos como mieloperoxidase, citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α), marcadores de estresse oxidativo *in vivo* (ácido malonildialdeído, glutathione e nitrato/nitrito) e os marcadores de função hepática (alanina amino transferase, aspartato amino transferase e gama glutamil transferase). **Conclusão:** Os resultados apresentados neste estudo permitem concluir que a ação anti-inflamatória do polissacarídeo sulfatado da *G. caudata* foi comprovada, revertendo os parâmetros histológicos no modelo de doença de lesão hepática induzida por nimesulida. Sugerindo, desta forma, uma relação deste polissacarídeo com a inibição do mecanismo de infiltração neutrofílica por mitigar o aporte de citocinas pró-inflamatórias e diminuir o estresse oxidativo nos locais da lesão, além de restabelecer a funcionalidade hepática ao restaurar os níveis dos marcadores presentes no fígado. Isto permite sugerir este polissacarídeo como um potente candidato ao tratamento de lesão proveniente ao uso exacerbado da nimesulida.

Palavras-chave: Migração de neutrófilos. estresse oxidativo. lesão hepática. nimesulida. processo inflamatório.

Abstract

Introduction: Sulphated polysaccharides comprise a group of heterogeneous and complex biopolymers from the extracellular matrix of marine algae. The sulfated polysaccharides of the red sea kelp *G. caudata* have been well studied due to their specific biochemical properties and characteristics, which provide some proven pharmacological effects, among which its anti-inflammatory action is highlighted. **Objective:** The objective of this study was to evaluate the anti-inflammatory and antioxidant action of *Gracilaria caudata* sulphated polysaccharide on the effects of nimesulide-induced hepatic injury in mice. **Methods:** The polysaccharide was subjected to pharmacological tests, in this study Swiss male mice weighing between 25-30g were used and divided into groups of 8-10 animals. Hepatic injury was induced using nimesulide 200mg/kg once daily for 5 consecutive days and after each induction the animals were treated with the sulfated polysaccharide of *G. caudata* at doses of 2.5, 5 or 10 mg / kg. After the last day of induction of hepatic lesion and treatment with the polysaccharide, sera were collected from animals and then euthanized and their livers removed for evaluation of histological scores, relative weight and biochemical dosages such as myeloperoxidase, interleukin 1 beta, necrosis factor tumoral alpha, glutathione, malonyldialdehyde acid, nitrate/nitrite, as well as liver function markers such as alanine amino transferase, aspartate amino transferase and gamma glutamyl transferase. **Results:** Treatment of the animals with this polysaccharide at a dose of 10mg/kg demonstrated a pattern of reduction of liver damage through histological visualization as well as a decrease in liver weight even. In addition, the polysaccharide in question showed a significant reduction of all the biochemical tests evaluated, especially leukocyte migration markers such as myeloperoxidase, proinflammatory cytokines (IL-1 β and TNF- α), markers of oxidative stress in vivo malonyldialdehyde, glutathione and nitrate/nitrite) and markers of hepatic function (alanine amino transferase, aspartate amino transferase and gamma glutamyl transferase). **Conclusion:** The results presented in this study allow us to conclude that the anti-inflammatory action of the sulfated polysaccharide of *G. caudata* has been proven, reverting the histological parameters in the hemodialysis disease model induced by nimesulide. Thus, it suggests a relation of this polysaccharide with the inhibition of the mechanism of neutrophil infiltration by mitigating the supply of pro-inflammatory cytokines and reducing oxidative stress at the sites of the lesion, in addition to restoring liver function by restoring the levels of the markers present in the liver. This allows to suggest this polysaccharide as a potent candidate for the treatment of injury resulting from the exacerbated use of nimesulide.

Keywords: Migration of neutrophils. oxidative stress. Liver injury. nimesulide. inflammatory process.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINEs – Anti-inflamatórios não esteroides;
ALT – alanina aminotransferase;
AST – aspartato aminotransferase;
COX-1 – cicloxigenase-1;
COX-2 – cicloxigenase-2;
DMSO – Dimetilsulfóxido;
DTNB – Ácido 5,5'-Ditiobis-(2-nitrobenzoíco);
EDTA – Ácido Etilenomino-tetracético;
ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática;
FDA – Food and Drug Administration;
GRed – Glutaciona redutase;
GSH – Glutaciona;
GST – Glutaciona S-transferase;
GPCRs – Receptores de membrana acoplados a proteína G
GPX – Glutaciona peroxidase
IFN- γ – Interferon gama;
IL-1 α – Interleucina-1 alfa;
MDA – ácido malonildialdeído;
MPO – mieloperoxidase;
NO – Óxido Nítrico;
OPD – O-fenilenodiamina dihidroclorato;
PBS – Tampão Fosfato de Sódio
PLS – Polissacarídeo
ROS – Espécies reativas de oxigênio;
TCA – Ácido Tricloroacético;
TNF- α – Fator de Necrose Tumoral alfa;

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fígado e sua divisão em dois grandes lobos (direito e esquerdo)....21
- Figura 2.** Protocolo da avaliação da possível proteção pelo polissacarídeo da *Gracilaria caudata* no curso da lesão hepática.....31
- Figura 3.** Microfotografia mostrando o efeito do polissacarídeo sulfatado (PLS) extraído da *Gracilaria caudata*, sobre a avaliação histológica na lesão hepática em camundongos induzida por nimesulida.....38
- Figura 4.** Efeito do polissacarídeo sulfatado (PLS) extraído da *Gracilaria caudata* sobre a relação peso do fígado/peso do animal na lesão hepática em camundongos induzida por nimesulida.....40
- Figura 5.** Efeito do polissacarídeo sulfatado (PLS) extraído da *Gracilaria caudata* sobre a atividade de mieloperoxidase (MPO) em tecido hepático de camundongos com lesão induzida por nimesulida.....41
- Figura 6.** Efeito do polissacarídeo sulfatado (PLS) extraído da *Gracilaria caudata* sobre concentração hepática de glutatona (GSH) em camundongos com lesão induzida por nimesulida.....42
- Figura 7.** Efeito do polissacarídeo sulfatado (PLS) extraído da *Gracilaria caudata* sobre a concentração do ácido malonildialdeído (MDA) em tecido hepático de camundongos no modelo de lesão induzida por nimesulida.....43
- Figura 8.** Efeito do polissacarídeo sulfatado (PLS) extraído da *Gracilaria caudata* sobre os níveis de produto de degradação do óxido nítrico (NO), nitrato e nitrito (NO₃/NO₂) em tecido hepático de camundongos com lesão hepática induzida por nimesulida.....44
- Figura 9.** Efeito do polissacarídeo sulfatado (PLS) extraído da *Gracilaria caudata* sobre os níveis hepáticos de interleucina 1 beta (IL-1β) de camundongos com lesão induzida por nimesulida.....45
- Figura 10.** Efeito do polissacarídeo sulfatado (PLS) extraído da *Gracilaria caudata* sobre os níveis hepáticos de fator de necrose tumoral alpha (TNF-α) de camundongos com lesão induzida por nimesulida.....46
- Figura 11.** Efeito do polissacarídeo sulfatado (PLS) extraído da *Gracilaria caudata* sobre os marcadores de funcionalidade hepática Alaninina aminotransfe-

rase e Aspartato aminotransferase em camundongos com lesão induzida por nimesulida.....47

Lista de tabela

Tabela 1. Avaliação dos parâmetros de lesão hepática.....	39
--	----

SUMÁRIO

1 Introdução	15
2 Revisão literária	17
2.1 Algas marinhas vermelhas como fontes de polissacarídeos sulfatados e seus efeitos.....	17
2.2 Fígado: Anatomia e função.....	19
2.3 Metabolismo hepático dos xenobióticos.....	21
2.4 Efeitos Colaterais provenientes do uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) - Mecanismos das Lesões Hepáticas induzida por drogas.....	23
2.5 Dano hepático por Nimesulida.....	24
3 Objetivos	28
3.1 Objetivo Geral.....	28
3.2 Objetivos específicos.....	28
4 Metodologia	29
4.1 EXTRAÇÃO DO POLISSACARÍDEO SULFATADO (PLS) DA <i>G. caudata</i> e sua caracterização.....	29
4.2 Animais utilizados para os protocolos experimentais sugeridos.....	29
4.3 Protocolo de indução da lesão hepática por nimesulida em camundongos.....	29
4.4 Avaliação da possível proteção pelo polissacarídeo da <i>Gracilaria caudata</i> no curso da lesão hepática.....	30
4.5 Avaliação da relação peso do fígado/peso do animal com ou sem lesão.....	31
4.6 Avaliação dos escores microscópicos de lesão.....	32
4.7 Ensaio bioquímicos.....	32
4.7.1 Ensaio de mieloperoxidase.....	32
4.7.2 Análise dos níveis de glutathione no tecido hepático.....	33
4.7.3 Determinação de malonilaldeído no tecido hepático.....	33
4.7.4 Dosagem de IL-1 β e TNF- α	34
4.7.5 Determinação de nitrato e nitrito no tecido hepático.....	35
4.7.6 Determinação de níveis de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e Gama-GT.....	35

4.8	Análise estatística.....	35
5	Resultados.....	37
5.1	Efeito do PLS da <i>G. caudata</i> sobre os critérios microscópicos de lesão hepática induzida por nimesulida	37
5.2	Efeito do PLS da <i>G. caudata</i> sobre a relação peso fígado/peso animal.....	40
5.3	Efeito do PLS da <i>G. caudata</i> sobre a infiltração de neutrófilos no fígado - mieloperoxidase (MPO).....	41
5.4	Efeito do PLS da <i>G. caudata</i> sobre os níveis hepáticos de glutathione (GSH).....	42
5.5	Efeito do PLS da <i>G. caudata</i> sobre a concentração hepática de ácido malonildialdeído (MDA).....	43
5.6	Efeito do PLS da <i>G. caudata</i> sobre os níveis hepáticos de nitrato e nitrito (no ₃ /no ₂).....	44
5.7	Efeito do PLS da <i>G. caudata</i> sobre os níveis hepáticos de IL-1 β e TNF- α	45
5.8	Efeito do PLS da <i>G. caudata</i> sobre os marcadores de funcionalidade hepática ALT, AST e gama-GT.....	46
6	Discussão.....	48
7	Conclusão.....	58
7	Referências.....	59
8	Anexos.....	73

INTRODUÇÃO

As algas marinhas possuem uma imensa diversidade biológica e habitam em inúmeros ambientes, a destacar os oceanos, além de apresentarem uma rica fonte de metabólitos secundários ainda desconhecidos, mas com um amplo espectro de utilização (RAVEN et al., 2001; ALMEIDA, 2011). Tem chamado a atenção dos pesquisadores devido a presença de compostos bioativos estruturalmente diversos com valiosos potenciais farmacêuticos e biomédicos. Dos inúmeros e diferentes compostos bioativos extraídos das algas, podemos destacar a classe dos polissacarídeos sulfatados.

Diversas atividades biológicas já foram descritas na literatura exercidas por polissacarídeos, que possuem estruturas químicas destes polímeros variados de acordo com as espécies de algas. De tais atividades, podemos destacar as de anticoagulantes e analgésicas (CAPEK et al. 2003; NERGARD et., 2005). Além de demonstrarem efeitos antioxidante e anti-inflamatórios (SILVA et al. 2012; BRITO et al. 2013) por diminuírem a produção e liberação de radicais livres e fornecer uma prevenção a danos oxidativos no organismo vivo. Nos últimos anos, os polissacarídeos sulfatados de algas marinhas vermelhas, são os que vem mais se destacando com seus potenciais efeitos terapêuticos, devido a vasta variedade dessas algas na costa brasileira, além de possuírem os efeitos anteriormente citados, apresentam propriedades antitrombóticas, antivirais, anti-tumorais e efeitos imunomoduladores (QUINDERÉ, 2013).

O PLS da *Gracilaria caudata* demonstrou atividades anti-inflamatórias, antinociceptivos, além de uma gastroproteção. Essas características são advindas, principalmente pela redução de citocinas pro-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α) envolvidas na regulação do processo de reparo tecidual, bem como recrutamento de polimorfos nucleares, que na tentativa de restaurar a homeostase, acabam gerando um estresse oxidativo. (BARROS et al. 2013; CHAVES et al. 2013).

A Lesão hepática induzida por drogas tem ganhado notoriedade como um grande problema que desafia os profissionais de saúde, bem como a indústria farmacêutica e agências reguladoras de medicamentos (HOLT & JU, 2006). De acordo com um estudo realizado nos Estados Unidos em 2002, essas le-

sões providas de utilização medicamentosa responde por mais de 50% de insuficiência hepática aguda. Por causa da morbidade e mortalidade significativa associadas à essas injúrias induzidas por drogas, A *Food and Drug Administration* (FDA) retirou vários medicamentos do mercado, incluindo bromofenac, ebrotidine e troglitazona. Outras drogas hepatotóxicas, como a risperidona, trovafloxacin, e nefazodona foram atribuídos classificadas em "tarja preta". (HUNTER et al. 1999; KOHLROSER et al. 2000; LASSER et al. 2002; THAMES, 2004).

Dentre dos medicamentos que podem levar a uma lesão, podemos destacar a nimesulida (4'-nitro-2'-fenoxi-fenilmetanosulfonamida), representante do grupo dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) – classe de medicamentos com uma relativa segurança à toxicidade no fígado – é praticamente metabolizada e depurado em sua totalidade pelo fígado, tem demonstrado um aumento de lesão hepática aguda (ROMERO-GOMEZETAL, 1999; ONG et al 2006; WANG et al, 2011). A mesma ainda pode causar um dano significativo, evidenciado por aumento nas aminotransferases por estudos de Wang e colaboradores (2011) e Leone e colaboradores (2014). Corroborando com tais dados, estudos histopatológicos confirmaram toxicidade elevada, além de colestase e necrose hepática (MERLANI et al, 2001; BOELSTERLI, 2002; BOELSTERLI et al, 2006). Estudos experimentais com animais desenvolvidos por ONG e colaboradores (2006), demonstrou hepatotoxicidade devido a administração de nimesulida.

Então sabendo das propriedades anti-inflamatorias, principalmente no que diz respeito a gastroproteção, proporcionada por PLS de algas, principalmente aquelas classificadas do tipo "vermelhas", torna-se viável a avaliação da atividade da a *Gracilaria caudata* em parâmetros lesivos do fígado, bem com verificar a participação da sua proteção no processo de injuria por nimesulida no tecido hepático.

2. Revisão de Literatura

2.1 Algas marinhas vermelhas como fontes de polissacarídeos sulfatados e seus efeitos.

O Brasil possui uma enorme biodiversidade aquática, as algas marinhas são os organismos que melhor representam essa diversidade. Do total de 32.000 espécies conhecidas, pelo menos 820 táxons foram identificados ao longo da costa brasileira. Para sobreviver no ambiente aquático altamente competitivo, as algas marinhas têm desenvolvido estratégias de defesa que resultam em uma enorme diversidade de compostos produzidos através de diferentes vias metabólicas. Isto faz das algas marinhas, organismos promissores como fonte de novos compostos bioquimicamente ativos, além de compostos essenciais para a nutrição humana (SORIANO et al., 2011).

As macroalgas ocorrem em todo o globo e sendo a base da cadeia alimentar, serve como fonte de nutrientes para uma grande variedade de organismos aquáticos. Elas são os principais consumidores de nitrato e CO₂ e liberam uma grande quantidade de oxigênio para a atmosfera via fotossíntese. Consequentemente as algas desempenham um papel vital na manutenção do equilíbrio marinho e preservação da biodiversidade. Algas e produtos de algas também têm um impacto econômico em vários setores, como na aquicultura, na indústria farmacêutica, biomedicina, medicina veterinária e indústria de cosméticos (SORIANO et al., 2011).

As rodófitas ou algas vermelhas constituem o grupo com o maior número de espécies na costa brasileira. As rodófitas são quase que exclusivamente macroscópicas, sendo organismos de portes médios ou grandes, possuem um conteúdo razoável de biomassa. Os produtos naturais de algas vermelhas caracterizam-se pela grande abundância de substâncias com atividade biológica (REPKA et al., 2004). Estes compostos estruturalmente bioativos são importantes fontes de novas substâncias de uso terapêutico e estético. E relatos de diversos pesquisadores afirmam que as algas marinhas são fontes de compostos que exibem várias atividades biológicas relevantes (WIJESEKARA & KIM, 2010; WIJESEKARA & YOON & KIM, 2010).

Algas marinhas vermelhas biossintetizam principalmente polissacarídeos sulfatados (PLS), polímeros de açúcares complexos e heterogêneos constituí-

dos de unidades repetitivas alternadas de β (1 \rightarrow 4) D-galactose e α (1 \rightarrow 3) D-galactose dotados de radicais sulfatos os quais são componentes da matriz extracelular e de grande aplicação em biotecnologia (ARAÚJO et al., 2008; FONSECA et al., 2008; CAMPO et al., 2009; RODRIGUES et al., 2009), sobretudo devido à sua biocompatibilidade e atoxicidade (FARIAS, 2014).

Polissacarídeos sulfatados compreendem um grupo de macromoléculas heterogêneas e complexas de origem não mamífera que são encontrados em concentrações elevadas na matriz extracelular e estão envolvidas em funções iônicas, mecânicas e osmóticas das algas marinhas (POMIN & MOURÃO, 2008). Recentemente, vários estudos têm-se centrado sobre estes polímeros que têm sido isolados a partir de diferentes espécies de algas, devido à sua grande aplicabilidade biomédica, farmacológica e toxicidade relativamente baixa (RODRIGUES et al., 2012).

São inúmeras a atividade biológicas descritas sobre polissacarídeos sulfatados extraídos de algas marinhas, a saber: ação antioxidante (SUDHARSA-NA et al., 2015); antinociceptiva (RODRIGUES et al., 2012; PEREIRA et al., 2014); prevenção de danos gastrintestinais (SILVA et al., 2012); antibacteriana (VIJAYABASKAR & VASEELA & THIRUMARAN, 2012); anticoagulante e anti-trombótico (DOREA et al., 2013); antitumoral (YE et al., 2008); antiangiogênica (CONG et al., 2016); antiviral (SYNYTSYA et al., 2014); imunomodulatória (KIM & JOO, 2008); anti-inflamatória (BATISTA et al., 2014); anticolite (BRITO et al., 2014) etc. Isto prova a vastidão de atividades biológicas das quais os polissacarídeos sulfatados de algas marinhas são capazes de realizar.

De acordo com o estudo de Silva et al. (2011), o PLS da *Gracilaria caudata* tem um efeito potencial na gastroproteção induzida por etanol. Seu mecanismo de proteção pode estar relacionada com a diminuição da produção de radicais livres e peroxidação lipídica. Outro estudo mostrou que o PLS da *Gracilaria caudata* reduziu a resposta inflamatória e hipernociceptiva por diminuir a migração de neutrófilos e concentrações de citocinas importantes no curso da inflamação. (CHAVES, et al. 2013).

2.2 – Fígado: Anatomia e função

O fígado encontra-se na cavidade abdominal na região do hipocôndrio direito, lateralmente ao estômago, logo abaixo do diafragma, superior ao pân-

creas e anterior à vesícula biliar, é considerado um grande órgão sólido do corpo humano, apresentando um peso aproximado de 1,5kg e de coloração marrom-avermelhada (COELHO, 2011). Segundo Ishibashi e colaboradores (2009), podemos dividir estruturalmente e histologicamente em cinco sistemas de tecidos: Sistema vascular, hepatócitos e lóbulo hepático, células sinusoidais hepáticas, sistema biliar e estroma. Seu volume, basicamente, corresponde a cerca de 80% de hepatócitos e o restante do órgão sendo basicamente constituído de células não parenquimais, incluindo células endoteliais que corresponde a 3%, células de Ito, células de Kupffer (macrófagos residentes) e linfócitos em proporções menores, ficando aproximadamente 13% do volume correspondente ao espaço extracelular (GAO et al., 2008). O fígado é responsável pela síntese de proteínas séricas, metabolismo de aminoácidos, lipídeos e carboidratos, secreção de bile e desintoxicação de compostos xenobióticos (DUNCAN et al., 2009). Estudos recentes consideram que o fígado também possui um papel importante no sistema imunológico (RACANELLI & REHERMANN, 2006; GAO et al., 2008) pois representa uma das principais fontes de muitos componentes da resposta imune inata, incluindo as proteínas do complemento e da fase aguda, a citar a proteína reativa-C, hepatoglobina, anti- α 1 antitripsina, assim como citocinas inflamatórias, como por exemplo a interleucina 6 e quimiocinas (ISHIBASHI et al. 2009)

O fígado é formado por quatro lóbulos pouco definidos (Fig. 1). Dois vasos são responsáveis pelo aporte sanguíneo no local, sendo eles: A veia porta, regendo 75-80% do volume sanguíneo aferente, rico em nutrientes absorvidos no trato digestório bem como, produtos secretados do baço e pâncreas; e a artéria hepática, fornecendo o restante do sangue, oxigenado, para o fígado através das artérias interlobar e interlobular. O sangue tanto das artérias hepáticas quanto a veia porta misturam-se nos sinusóides, convergindo para a veia central do lóbulo hepático. Por sua vez, as veias centrais convergem para formar as veias sublobulares e o sangue retorna ao coração através da veia cava inferior, seguindo veias coletoras e veias hepáticas (KIERSZENBAUM, 2004; EIPEL et al., 2010).

FIGURA 1 - SUPRIMIDA

O lóbulo hepático é a unidade funcional básica e estrutural do fígado, o qual é um compartimento ligeiramente hexagonal de tamanho variando entre 1 a 2 mm composto por hepatócitos. Ele encontra-se em torno de uma veia central com estruturas denominadas espaço porta em sua região periférica (COELHO, 2011). Os hepatócitos formam uma espécie de placas em torno da veia central, também conhecida como centrolobular, em uma ou duas camadas. No espaço-porta está contido três estruturas, um ramo da artéria hepática, um ramo da veia porta e o ducto biliar que drena a bile dos lóbulos. (GUZMAN, 2008; BARATTA et al., 2009).

Os hepatócitos desenvolvem atividades tanto como células funcionais exócrinas, como endócrinas do lóbulo hepático. São células epiteliais, tendendo a homogeneidade, com aproximadamente 30 μm de diâmetro (ALVES & MELLO, 2006). Juntos formam espécies de placas de células, de modo espesso, que se anastomosam delineando os capilares sinusóides e entre eles encontra-se o espaço chamado de Disse. O hepatócito apresenta dois lados: um

basolateral e um apical. O domínio basolateral está voltado para o espaço de Disse, auxiliando no processo de absorção de substâncias advindas do sangue e na secreção de proteínas plasmáticas. O lado apical contém microvilosidades e forma os canalículos biliares onde é secretado a bile (PESSOA, 2017).

Além do lóbulo hepático, as células sinusoidais tem o seu destaque, são compostas por células endoteliais e os macrófagos residentes, as de Kupffer. As endoteliais constituem a parede do sinusóide, cujo apresenta espaços interculares que culmina na troca de fluidos e partículas provenientes do sangue e o espaço de Disse (COELHO, 2011), já as células de Kupffer encontram-se localizadas no interior dos sinusóides. Diversos estímulos, como por exemplo, as inflamação ou até mesmo as infecções, levam à hipertrofia e hiperplasia dessas células, que passam a realizar endocitose e secretar várias substâncias, como citocinas e várias enzimas. Além delas, podemos destacar células estreladas ou conhecidas como células de Ito, no espaço de Disse, as quais estão intrinsicamente ligadas ao metabolismo e o acúmulo de vitamina A. Existindo situações que afetem a homeostasia hepática, as células de Ito podem se transformar em miofibroblastos, secretando vários tipos de colágeno e lamina, corroborando a um quadro de fibrose (KIERSZENBAUM, 2004; ALVES & MELLO, 2006; GUZMAN, 2008; MCCUSKEY, 2008; ISHIBASHI et al., 2009).

2.3 – Metabolismo hepático dos xenobióticos

O fígado é o principal órgão de metabolismo dos fármacos. Comumente, medicamentos administrados via oral (v.o.) são absorvidos em sua composição de droga base, não sofrendo alteração no trato gastrointestinal e são transportados até o tecido hepático através da circulação porta, evento esse chamado de efeito de primeira passagem (GOLAN et al., 2014). Assim, possibilitando ao fígado a oportunidade de metabolizar as drogas antes de alcançarem a circulação sistêmica e, conseqüentemente, seu tecidos-alvo.

Os fármacos sofrem um processo chamado de biotransformação nos hepatócitos antes de sua excreção pela urina ou outra via excretória. Muitas substâncias medicamentosas possuem características lipofílicas, o que permite uma maior facilidade do fármaco atravessar as membranas celulares. Contrapartida, essa mesma característica química também pode dificultar a sua excreção renal, visto que a depuração pelo rim exige que esses fármacos se tor-

nem mais hidrofílicos, de modo que possam ser dissolvidos na urina aquosa (SCHINONI, 2006). Por finalidade, o objetivo das reações de biotransformação é tornar os compostos mais hidrossolúveis para torná-los mais passíveis de excreção renal.

As reações envolvidas nesse processo são divididos em dois tipos: a primeira fase, ficando ao cargo de enzimas associadas a membranas, que são expressas no retículo endoplasmático dos hepatócitos, em sua maioria, hemoproteínas monooxigenases da classe do citocromo P450 e que compreende a processo de oxidação/redução e a segunda fase que está relacionado a conjugação/hidrólise (VAN BEZOOIJEN, 1984).

Geralmente, as reações de oxidação modifica o fármaco em metabólitos mais hidrofílicos pela adição direta de grupos funcionais polares ou exposição desses grupos, como grupos hidroxila (-OH), tiol (-SH) ou amina (-NH₂) (GOLAN et al., 2014). Culminando em metabólitos que são farmacologicamente inativos e podem ser secretados sem qualquer modificação adicional. Porém, alguns produtos de reações de oxidação/redução acabam precisando de mais modificações para que possam ser eliminados, ficando ao carga das reações de conjugação (fase II) modificarem os compostos através da ligação de grupos hidrofílicos, como o ácido glicurônico, formando conjugados mais polares (FURA, 2006). É importante frisar que tais reações de conjugação ocorrem independentemente das reações da primeira fase e que as enzimas envolvidas nas reações de fase I e de Fase II competem pelos substratos.

O conjunto de reações mediadas pelo P450 respondem por mais de 95% das biotransformações oxidativas. Porém, outras vias também podem oxidar moléculas lipofílicas. Um exemplo pertinente de uma via oxidativa não-P450 é a monoamina oxidase (MAO). Essa enzima é responsável pela oxidação de compostos endógenos que contêm amina, como as catecolaminas e a tiramina e de alguns xenobióticos, incluindo fármacos. (GUENGERICH, 2003).

2.4 – Efeitos Colaterais provenientes do uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) - Mecanismos das Lesões Hepáticas induzida por drogas

Os AINEs correspondem a uma classe de medicamentos mais comumente utilizada pela população mundial frente a processos inflamatórios agu-

dos e crônicos, apresentando uma boa eficácia terapêutica. Estima-se que no Brasil cerca de 80 milhões de pessoas fazem uso de automedicação, sendo os AINEs os mais utilizados pela população, já nos Estados Unidos, mais de 70 milhões de AINEs são prescritos, e cerca de 30 bilhões de comprimidos de venda livre são comercializados anualmente. (SAKATA & ISSY, 2008).

Esse grupo de fármacos apresenta uma boa ação anti-inflamatória, analgésica e antipirética, entretanto, apesar da maioria dos AINEs serem considerados seguros, podem apresentar efeitos adversos em uma fração significativa da população que faz uso por via oral (KONTORGIOGIS, 2002), atrelado à isso, o crescente número de agentes que foram introduzidos em uso clínico ao longo das últimas décadas, fazem com que doenças hepáticas induzidas por drogas venham cada vez sendo mais abordadas.

A lesão hepática é uma complicação produzida por muitas drogas, o uso indiscriminado ou de forma errônea dos AINEs pode mimetizar muitas formas de doenças hepáticas agudas ou crônicas, tais como a necrose, hepatite, colestase (redução ou paragem do fluxo biliar), fibrose (cicatrizes), ou uma mistura de diferentes tipos de lesões, além de serem responsáveis pela icterícia ou hepatite aguda em <5% dos pacientes. (LIN & KHETANI, 2016). Também podendo ocorrer acúmulo de gordura nos hepatócitos (esteatose), sabendo que ela está intrinsecamente ligada a síndrome metabólica que será afetada com uma inflamação no tecido, levando a uma superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS), produzidas pela peroxidação de lipídeos, tais como malondialdeído (MDA) e a redução de moléculas antioxidantes como a glutatona (GSH) (VASCONCELOS et al., 2016).

Dos mecanismos envolvidos nesse tipo de lesão, metabólitos mais tóxico do composto principal, ou droga base, podem causar fadiga direta da célula, afetando a função mitocondrial e, eventualmente, disparando uma cascata de respostas imunológicas. Esta fase habitualmente depende das isoenzimas citocromo P450. Desta forma, as isoenzimas P450 e outras são basicamente responsáveis pela oxidação e, portanto, geram metabólitos com potencial de toxicidade (PARANÁ, 2011). Ocorre basicamente o esgotamento da glutatona, exaustão de ATP, redução da relação fosforilação/oxidação mitocondrial e inibição da troca respiratória. Como consequência não há elétrons para prover oxigênio, portanto, são produzidos metabólitos de oxigênio. Estes, por sua

vez, disparam e alimentam a lesão hepatocelular. Em seguida, temos outro mecanismo que ocorre na mitocôndria, a inibição da oxidação β que está envolvida na oxidação dos ácidos graxos. Este é o mecanismo de toxicidade proposto para a amiodarona, por causa da esteatose, relacionada a este medicamento (LARSON et al, 2009).

Os metabólitos reativos também se ligam a proteínas. Assim, esses metabólitos tóxicos se transformam em haptenos, os quais são reconhecidos como um antígeno ou neoantígeno, gerando resposta imunológica. Assim, a cascata de respostas imunológicas é disparada com consequências inflamatórias e necróticas para o fígado. Os anticorpos contra os haptenos ativam as células T, e estas geram autoimunidades contra diferentes enzimas do CYP450 (PARANÁ, 2011). Esses metabólitos reativos podem também visar células do fígado não-parenquimatosas do tipo epiteliais biliar, como acontece nas quinolonas e na ativação direta de células estelares, como, por exemplo, o methotrexate, causando fibrose no fígado, ou ainda com ervas, gerando a clássica lesão colestática, associada ao pirrolizidina. Em resumo, na etapa I, começamos com um metabólito reativo que causa fadiga direta da célula, inibição mitocondrial direta e haptenação, criando haptenos neoantigenicos, que ativam resposta imunológica (OLIVEIRA et al., 2005).

Diversas estratégias têm sido adotadas para evitar os danos gástricos e principalmente hepáticos induzidos pelo uso de AINEs, como o desenvolvimento e uso de AINEs com baixo potencial tóxico, redução ou eliminação dos agentes que atuam causando injúrias e intensificação da defesa da mucosa. Porém, nem todas essas medidas têm demonstrado muito sucesso (PARANÁ, 2011).

2.5 – Dano hepático por Nimesulida

A nimesulida [N-(4-nitro-2-fenoxifenil) metanosulfonamida) é uma sulfonamida pertencente ao grupo dos AINEs, com ação preferencialmente sobre inibição seletiva da ciclooxigenase-2 (COX-2), assim possuindo uma propensão reduzida para causar efeitos adversos gastrointestinais relacionados a COX-1 (BENNET, 1999; GIULIANO et al. 2001). Também atua na neutralização da formação de radicais livres de oxigênio produzidos durante o processo inflamatório, sendo indicada no tratamento de estados febris, processos inflamatórios relacionados com a liberação de prostaglandinas e também como analgésico

para cefaléias, mialgias e dor pós-operatória. Alguns efeitos adicionais incluem a diminuição na produção de citocinas, a redução na produção de enzimas de degradação e, esporadicamente a ativação de receptores glicocorticóides (BRUNTON et al, 2008).

Nimesulida foi um medicamento amplamente utilizado no tratamento de uma variedade de condições inflamatórias - principalmente na áreas da odontologia e traumatologia ortopédica, pois tem um início de ação rápida aliviando a sintomatologia - nas últimas três décadas em muitos países do mundo (BHATTACHARYA et al, 2015), embora alguns estudos relatarem que é um dos AINES que tem menor incidência de efeitos adversos gastrointestinais, no entanto, nunca foi demonstrado claramente. Segundo relatórios da Organização Mundial de Saúde (OMS) sobre reações adversas a medicamentos, atribuiu a nimesulida alguns efeitos colaterais que incluem edema periférico, gastrite, estomatite, fasciíte necrozante, síndrome e coagulopatia de Reye com elevação de enzimas hepáticas e hepatite aguda.

Apesar da toxicidade hepática ser raramente relatada como efeito adverso aos AINEs, pode manifestar-se de forma severa, fato que levou alguns fármacos dessa classe serem retirados do mercado. No que tange a nimesulida, sua eliminação é quase exclusivamente por meio do metabolismo hepático, sendo metabolizada pelas enzimas do citocromo P450, assim, uma insuficiência hepática pode ocasionar uma modificação quase que completa no perfil farmacocinético da nimesulida, aumentando de forma significativa seu metabólito e sua meia-vida plasmática, reduzindo sua eliminação do organismo (BERNAREGGI & RAINSFORD, 2005).

A incidência de hepatotoxicidade induzida por nimesulida não é um dado homogêneo na literatura, tendo em vista que seu mecanismo de toxicidade ainda não está completamente definido, na maioria dos casos acredita-se ser uma reação idiossincrática. Devido a sua toxicidade não ser conhecida a fundo, muitos países desenvolvidos não têm permitido a fabricação e comercialização de nimesulida após relatos de casos graves de toxicidade hepática, sendo assim comercializada mais nos países em desenvolvimento (POLIMENI et al., 2006).

Diversos autores relataram casos clínicos de hepatotoxicidade associada ao uso de nimesulida em vários países (SBEIT et al., 2001; MERLANI et al.,

2001; RODRIGO et al., 2002; STADLMANN et al., 2002; CHOLONGITAS et al., 2003; ÖZGUR et al., 2003; PAPAIOANNIDES et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2005; TAN, 2007; CHATTERJEE et al., 2008; NOBRE et al., 2008) tornando discutível a segurança desse fármaco nesses aspectos (ARAÚJO, 2012). No Brasil, embora a nimesulida seja amplamente aceita e comercializada, não existem muitos relatos de toxicidade associada a ela.

A origem atribuída a lesão é idiossincrásica, isto é, mais metabólica do que imunoalérgica (VAN STEENBERG et al., 1998; BOELSTERLI, 2002), em que ao ser processada leva à produção de metabólitos reativos, tóxicos diretos ou que se ligam a macromoléculas, formando neoantígenos responsáveis pela resposta imunológica (OLIVEIRA et al., 2005). Estudos sugerem que os mecanismos de ação relacionados a hepatotoxicidade da nimesulida incluem a formação desses metabólitos que modificam de forma covalente as proteínas produzindo lesão mitocondrial e estresse oxidativo direto. (BOELSTERLI, 2002). Este efeito é decorrido da diminuição produtiva de ATP pela mitocôndria devido à dissociação. Além disso, a atividade de seu grupo nitro ($\text{NH}_2\text{SO}_2\text{CH}_3^-$), presente no fármaco, é o principal responsável pela sua toxicidade, através de sua capacidade em interferir na produção de energia e na homeostasia do cálcio celular (MINGATTO et al., 2000; MINGATTO et al., 2002).

Foi atribuído a nimesulida a habilidade de transferir prótons para a matriz mitocondrial, diminuir o potencial da membrana mitocondrial, e aumentar a respiração mitocondrial, por consequência, trazendo uma depleção progressiva da enzima nicotinamida adenina nucleotídeo fosfato (NADP), à oxidação e à depleção de glutatona, ao aumento intracelular das espécies reativas de oxigênio, ao início da mudança da permeabilidade mitocondrial, à depleção de ATP, ao aumento do cálcio celular e à necrose nas células de hepatoma humano incubadas sem albumina (BERSON et al., 2006).

Há relatos na literatura que mencionam a citotoxicidade hepática sendo mediada por um complexo de sinalização equilibrada onde estão envolvidas várias citocinas como o fator de necrose tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$), interferon gama ($\text{IFN-}\gamma$), interleucina-1 alfa ($\text{IL-1}\alpha$) e interleucina-6 (IL-6), estando também relacionadas ao estresse oxidativo e à apoptose, por sequência, ativação neutrofílica no local e que possivelmente a nimesulida pode ser um fator relacionado a

desregulação de todo esse processo. (COSGROVE et al., 2010; ARAÚJO, 2012).

Diante do exposto, levando em consideração os efeitos anti-inflamatórios já comprovados em modelos experimentais sistêmicos e modelo do trato digestivo, faz com que seja viável avaliar o potencial terapêutico do PLS da *G. caudata* em um modelo de lesão hepática ocasionado por nimesulida.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

- Estudar o efeito do Polissacarídeo da *Gracilaria caudata* (PLS) sobre os parâmetros inflamatórios, bem como os marcadores de função hepática durante a lesão induzida por Nimesulida em camundongos.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a atividade do PLS sobre a relação peso fígado/peso animal e critérios microscópicos do tecido hepático em lesão induzida por Nimesulida;
- Avaliar a ação do PLS sobre os níveis hepáticos de MDA, GSH e Nitrato e nitrito de camundongos com lesão induzida por Nimesulida;
- Avaliar o efeito do PLS sobre a concentração de MPO no fígado de camundongos com lesão induzida por Nimesulida;
- Verificar o papel do PLS sobre a produção e liberação de IL-1 β e TNF- α no tecido hepático de camundongos tratados com Nimesulida;
- Avaliar os marcadores de função hepática (alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, e gama glutamil transferase) nos animais com lesão induzida por Nimesulida e tratados com o PLS;

4. Metodologia

4.1. EXTRAÇÃO DO POLISSACARÍDEO SULFATADO (PLS) DA *G. caudata* e sua caracterização.

A extração do polissacarídeo sulfatado da *Gracilaria caudata* foi realizada no Laboratório de Bioquímica das Algas Marinhas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará. A alga marinha vermelha *Gracilaria caudata* foi coletada na praia de Flecheiras, Trairí, Ceará, Brasil. A amostra foi identificada com a ajuda de um professor do Instituto de Ciências Marinhas da Universidade Federal do Ceará e a espécie foi depositada no herbário do Instituto de Ficologia de Ciência do Mar na Universidade Federal do Ceará – Fortaleza - CE, Brasil. As amostras foram limpas de epífitas, lavadas com água destilada e armazenadas a -20 °C. Os polissacarídeos sulfatados foram extraídos tal como descrito por Farias e colaboradores (2000). As caracterizações pertinentes ao polissacarídeo foram feitas anteriormente e publicada por Barros e colaboradores (2013).

4.2. Animais utilizados para os protocolos experimentais.

Para este estudo foram utilizados camundongos *Swiss* machos (25–30g) provenientes da Universidade Federal do Piauí (UFPI). Protocolado no comitê de experimentação animal da própria UFPI, com o número de protocolo 277/16 (em anexo). Para cada experimento foi utilizado um número de 8-10 animais por grupo (n=8 ou n=10). Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura (22 ± 2°C) e ciclo claro/escuro (12/12h) controlados. Além disso, até o momento da realização dos experimentos os animais permanecerão com ração apropriada e água *ad libitum*. Todos os tratamentos e procedimentos realizados estiveram de acordo com o Guia de Cuidado em Uso de Animais do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

4.3. Protocolo de indução da lesão hepática por nimesulida em camundongos.

A lesão hepática foi induzida de acordo com método descrito por Singh (2012) com modificações. Os animais não sofreram restrição alimentícia e tiveram livre acesso a água. A lesão foi induzida pela administração de nimesulida 100 mg que foi diluída em Tween 80 a 1,5% e administrada via intragástrica por

um processo de gavagem através de uma cânula em uma concentração de 200 mg/kg um vez ao dia durante um período de cinco dias.

Os animais foram eutanasiados 2h após a última indução que ocorreu no quinto dia, com uma dose letal de Quetamina (30 mg/kg) e Xilazina (15 mg/kg). Análises dos parâmetros inflamatórios utilizando amostras do tecido do fígado para: avaliação histológica, relação peso/comprimento do fígado, MPO, GSH, MDA e amostras de soro para os parâmetros de função renal, tais como AST, ALT e gama-GT.

4.4. Avaliação da possível proteção pelo polissacarídeo da *Gracilaria caudata* no curso da lesão hepática

Para verificar a possível ação anti-inflamatória do polissacarídeo da *Gracilaria Caudata*, os animais foram divididos igualmente em 5 grupos, com 10 animais por grupos, descritos da seguinte forma: Grupo I (controle negativo) os animais receberam intragastricamente uma solução salina + Tween 80 a 1,5% (500 µL) até a última indução e foram eutanasiados, grupos II (controle positivo) onde recebeu unicamente nimesulida 200 mg/kg ao dia e sofreram processo de eutanásia 2h após a última indução. Já os grupos III, IV, V receberam além da nimesulida 200 mg/kg, três doses do PLS em concentrações distintas (2,5; 5, 10 mg/kg; i.p; solubilizado em salina) 30min depois de cada indução e sofreram eutanásia 2h após a última indução (Figura 2). Foram escolhidas essas doses para o PLS e o período de indução de acordo com os estudos de Chaves e colaboradores (2013) e de Nguyen e colaboradores (2015), respectivamente.

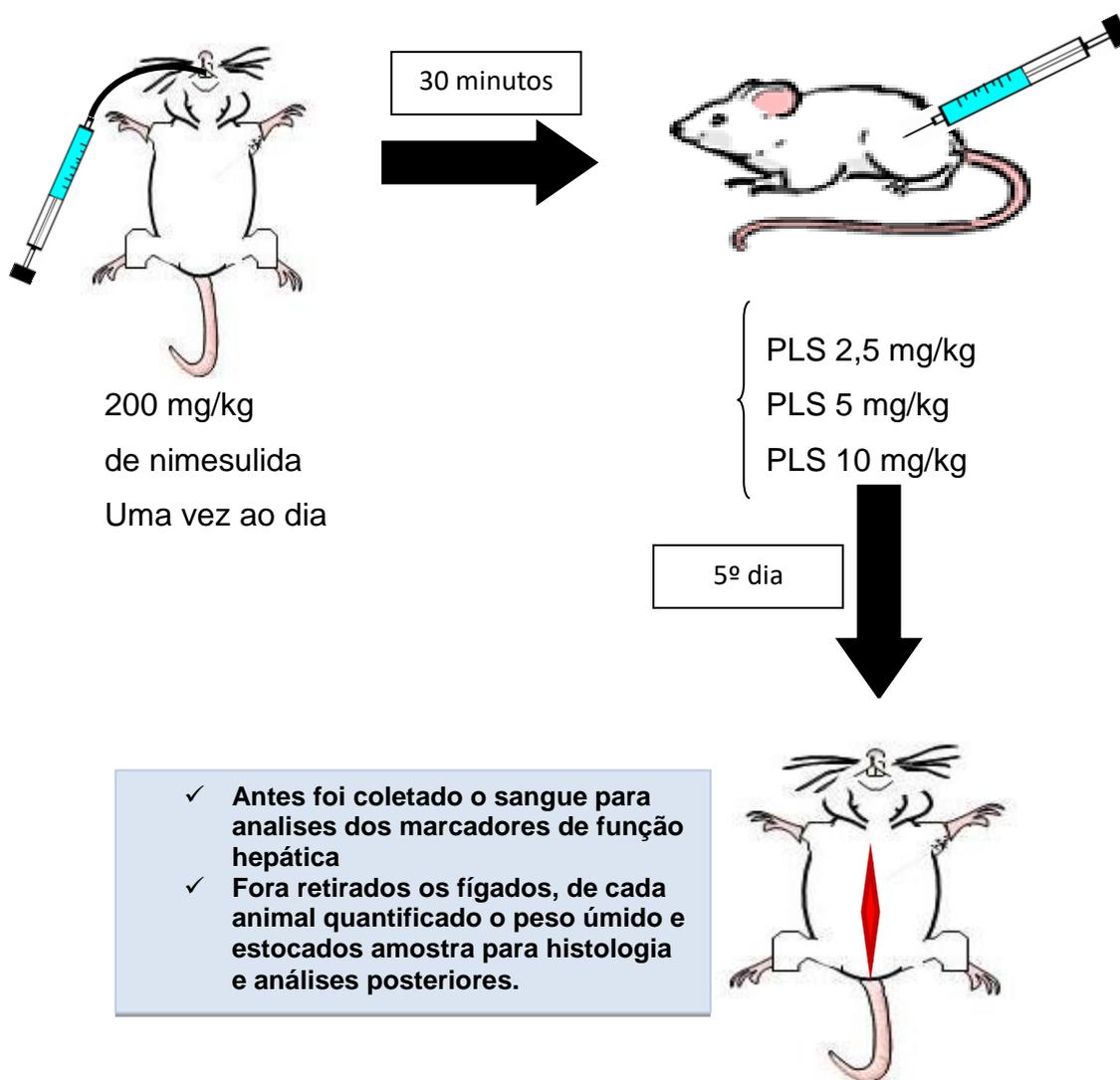


Figura 2. Protocolo da avaliação da possível proteção pelo polissacarídeo da *Gracilaria caudata* no curso da lesão hepática.

4.5. Avaliação da relação peso do fígado/peso do animal com ou sem lesão.

O primeiro passo foi pesar os animais antes da eutanásia e em seguida, os animais com ou sem lesão e tratados com PLS (2,5, 5, 10 mg/kg) tiveram seus fígados retirados. Posteriormente, foram pesados e resultados foram baseados na relação a seguir:

$$Peso = \frac{\text{Peso do fígado}}{\text{Peso do animal}}$$

4.6. Avaliação dos escores microscópicos de lesão.

Amostras do fígado foram imediatamente recolhidas e fixadas a solução tamponada a 10% de formaldeído por um período de pelo menos 24 horas antes do estudo histopatológico. O processamento histológico das amostras seguiu a metodologia descrita por Vasconcelos e colaboradores (2016), nos seguintes passos: desidratação, no aumento das soluções de álcool etílico; diafanização, soluções de xilol; inclusão, as amostras embebidas em parafina. A partir da microtomia onde foi obtido cortes de 6 μm que foram corados com hematoxilina A avaliação histológica do fígado foi classificada como descrito abaixo: a) esteatose (porcentagem de células hepáticas contendo gordura): <25% =1; <50% = 2; <75% = 3; >75%=4; b) Inflamação e necrose: um foco por campo = 1; E duas ou mais = 2. Além disso, também ocorreu verificação de fragmentação nuclear e vacuolização.

4.7. Ensaio bioquímicos

4.7.1. Ensaio de mieloperoxidase

Para a quantificação de MPO nos fígados de animais com ou sem lesão e tratados com PLS (2,5, 5, 10 mg/kg), frações do fígado foram retiradas e processadas para tal fim e a análise dessa enzima seguiu o protocolo estabelecido por Bradley e colaboradores (1982).

Mieloperoxidase (MPO) é uma enzima presente, nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e tem sido utilizada como um marcador quantitativo da infiltração de neutrófilos nos processos inflamatórios em vários tecidos. Para mensurar a concentração dessa enzima, 50 a 100 mg do fígado de animais com ou sem lesão e tratados com PLS (2,5, 5 e 10 mg/kg), foram colocados em um tampão (NaCl 0,1 M + EDTA 0,015 M/L de NaPO₄ 0,02 M em pH 4,7). Posteriormente, foram homogeneizados num Polytron (13000 rpm) e centrifugado a 15 minutos (3000 rpm) em uma centrifuga refrigerada (4°C). Logo em seguida, o sobrenadante foi retirado e o precipitado, novamente foi centrifugado nas mesmas condições e no mesmo tampão. O sobrenadante foi mais uma vez retirado, então, o precipitado foi homogeneizado novamente (Polytron - 13000 rpm) em um outro tampão (HTAB (0,05%)/200 ml de NaPO₄ 0,05M). A próxima

etapa consistia em colocar esse homogenato para congelar e descongelar em nitrogênio líquido (2X).

Posteriormente, o homogenato foi centrifugado a 10000-20000 rpm por 15 minutos. Finalmente, o sobrenadante foi pipetado numa placa (5-10 μ l) e acrescentou-se nessa placa 45 μ l de NaPO₄ 0,08M junto com a solução de leitura (TMB 25 μ + H₂O₂ 100 μ l). A reação foi terminada com o acréscimo de H₂SO₄ 50 μ l (4M) e lida em um leitor de placa a 450nm. O resultado foi expresso como sendo UMPO/mg de tecido.

4.7.2. Análise dos níveis de glutathiona no tecido hepático

Após o sacrifício dos animais no último dia de indução, fragmentos do fígado dos animais com ou sem dano hepático e tratados com PLS (2,5, 5 e 10 mg/kg) foram retirados para a análise dos níveis de glutathiona.

A glutathiona reduzida é um tripeptídeo composto de glutamato, glicina e cisteína, existente em praticamente todas as células de mamíferos. Ela exibe um grande número de funções essenciais para a célula, incluindo transporte de aminoácidos, catálise enzimática e proteção contra os efeitos deletérios de radicais livres endógenos e metabólitos tóxicos Meister (1991).

O método de Sedlak e Lindsay (1968) foi utilizado para análise de glutathiona nas amostras. Para determinação dos níveis de grupos sulfidrílicos não-protéicos, uma amostra de 50 a 100 mg de tecido hepático dos animais foi homogeneizada em 1 ml de EDTA 0.02 M para cada 100 mg de tecido. Alíquotas de 400 μ L do homogenato foram misturadas a 320 μ L de água destilada e a 80 μ L de ácido tricloroacético (TCA) a 50% para precipitação de proteínas. Os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 3.000 rpm a 4° C. A um total de 400 μ L do sobrenadante foi adicionado 800 μ L de tampão Tris 0,4 M (pH 8.9) e 20 μ L de DTNB (reagente de Ellman) 0,01 M. A mistura foi então agitada por 3 minutos e a absorbância foi lida a 412 nm em espectrofotômetro. As concentrações de grupos sulfidrílicos não-protéicos foram expressas em μ g de NP-SH/g de tecido.

4.7.3. Determinação de malonilaldeído (MDA) no tecido hepático

Após o sacrifício dos animais no último dia de indução, fragmentos do fígado dos animais com ou sem dano hepático e tratados com PLS (2,5, 5 e 10 mg/kg) foram retirados para a análise dos níveis de MDA no tecido hepático.

Os níveis de malondialdeído no fígado foram determinados pelo método de Mihara e Uchiyama (1978). Fragmentos do mesmo foram homogeneizados com KCl gelado 1.15% para o preparo de 10% de homogenato. Meio mililitro (0.25ml) desse homogenato foi pipetado dentro de um tubo de centrifuga de 10 ml. Foi acrescentado a esse homogenato 1,5 ml de H₃PO₄ (1%) e 0,5 ml de uma solução aquosa de ácido tiobarbitúrico aquoso (0.6%). Os tubos foram aquecidos por 45 minutos em um banho de água fervendo e a mistura reacional foi então resfriada em um banho de água gelada, seguida da adição de 2 ml de n-butanol. Os conteúdos foram misturados por 1 minuto com um misturador "vortex", centrifugados a 1200 x g por 10 minutos e a absorbância da camada orgânica mensurada em 520 e 535nm. Os resultados foram expressos em mmol de MDA/g de tecido.

4.7.4. Dosagem de IL-1 β e TNF- α .

Para a dosagem das citocinas foram retirados fragmentos do fígado de animais com ou sem lesão e tratados com PLS (2,5, 5, 10 mg/kg) para dosagem de IL-1 β e TNF- α . Os fragmentos foram adicionados em um tampão inibidor de protease (500 μ L de tampão para cada 100 mg de tecido) e depois processados em um homogenizador de tecido e centrifugado a 3000 rpm a 4 °C por 10 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi coletado e incubado com 2 μ g/ml de anticorpo (anticorpo de captura) diluído em tampão de bicarbonato (pH 8.2), 100 μ L por poço por 24 horas a 4 °C. A placa foi lavada com PBS - Tween20 a 0,1%. A reação foi bloqueada com albumina bovina 1% diluída em tampão de lavagem, 100 μ L por poço por 2 horas à temperatura ambiente. Depois a placa foi novamente lavada usando a mesma solução. A placa foi agora incubada com a curva padrão das citocinas (TNF- α e IL-1 β) diluídas em tampão de lavagem e com as amostras de tecido do fígado a serem dosados, 100 μ L por poço por 24 horas a 4 °C. A placa foi novamente lavada e depois incubada com o anticorpo biotilado (1:1000) diluído em tampão de lavagem contendo 1% de soro de carneiro por 1h à temperatura ambiente. Novamente a placa foi lavada e depois incubada com avidinaperoxidase (DAKO) diluída 1:5000 em tampão de lavagem, 100 μ L por poço por 15 minutos à temperatura ambiente. A placa foi lavada e incubada com o-fenilenediaminadiidrocloreto (OPD) em tampão substrato, 100 μ L por poço, no escuro à temperatura ambi-

ente por um período que varia de 5 a 20 minutos dependendo da citocina. A reação foi parada com 150 μ L por poço de H_2SO_4 1M. A intensidade da coloração foi medida em espectrofotômetro a 490 nm e os resultados foram expressos como média \pm EPM da quantidade de TNF - α , IL - 1 β em pg/ml (TAVARES-MURTA *et al.*, 2008).

4.7.5. Determinação de nitrato e nitrito no tecido hepático

Para a determinação das concentrações hepáticas de nitrato e nitrito foram retirados fragmentos do fígado de animais com ou sem lesão e tratados com PLS (2,5, 5, 10 mg/kg). Inicialmente, preparada uma solução para contendo 0,5 unidades por ml de nitrato redutase (Sigma) em um tampão KH_2PO_4 contendo NADPH. Para o preparo da reação de Griess foi armazenada separadamente a 4°C em frascos de vidro e protegidos da luz, uma solução contendo Sulfanilamida a 1% em H_3PO_4 a 2,5% e outra solução de NEED a 0,1% em H_3PO_4 a 2,5%. Depois de preparadas as soluções, todas as amostras processadas de tecido hepático foram incubadas numa microplaca com nitrato redutase (0,016 L por poço) durante 12h para a conversão de NO_3 (nitrato) em NO_2 (nitrito). A produção de óxido nítrico foi determinada medindo as concentrações de nitrito em um leitor de placas de ELISA a 540 nm, utilizando o método de Griess (GREEN *et al.*, 2010). Os resultados foram expressos como μ M de nitrito.

4.7.6. Determinação de níveis de alanina aminotransferase (ALT), aspartato amino transferase (AST) e Gama-GT

Para a determinação dos níveis de ALT, AST e Gama-GT no soro, antes do processo de eutanásia, os animais foram sedados com Quetamina e Xilazina e feito uma coleta de sangue pelo plexo retro orbital, após 30 minutos o sangue foi centrifugado a 1.500 rpm por 20 minutos, foi retirado o soro para as devidas análises. Os experimentos ocorreram de acordo com a utilização de kits comerciais da marca LABtest® - MG/Brasil para avaliação dos mesmos.

4.8 Análise estatística

De todos os experimentos foram calculados as médias \pm EPM de certo número de eventos (n) em cada grupo. A diferença estatística entre os grupos

foram determinadas através de análise de variância (ANOVA) e a comparação entre as médias foram feitas pelo teste de Newman-Keuls, já para os testes não paramétricos (escores histológicos) foi utilizado Kruskal Wallis seguido de Dunn. Uma diferença de $p < 0,05$ foi considerada estatisticamente significativa.

5. Resultados

5.1 EFEITO DO PLS DA *G. caudata* SOBRE OS CRITÉRIOS MICROSCÓPICOS DE LESÃO HEPÁTICA INDUZIDA POR NIMESULIDA

A análise histológica mostrou que os animais do grupo salina, conforme esperado, apresentaram as pontuações mínimas de escores microscópicos para todos os parâmetros avaliados conforme mostrado na Tabela 1 e representado na microfotografia pela Figura 3 A e B. Já os animais do grupo controle (nimesulida) apresentaram significativa inflamação 3 (2-3), necrose 3 (2-3), vacuolização 3 (2-3) e fragmentação nuclear 3 (2-3) sendo representado pela (Figura 3 C e D). No grupo tratado com o PLS (10 mg/kg, i.p) da *G. caudata* observou-se uma significativa ($p < 0,05$) diminuição de importantes parâmetros avaliados, tais como, inflamação 2 (1-2), necrose 2 (1-2), vacuolização 2 (1-2) e fragmentação nuclear 2 (1-2), como visto na Tabela 4 e representado pela microfotografia da Figura 3 I e J. Esta diminuição das pontuações analisadas equivale a uma redução significativa ($p < 0,05$) de danos no tecido do fígado.

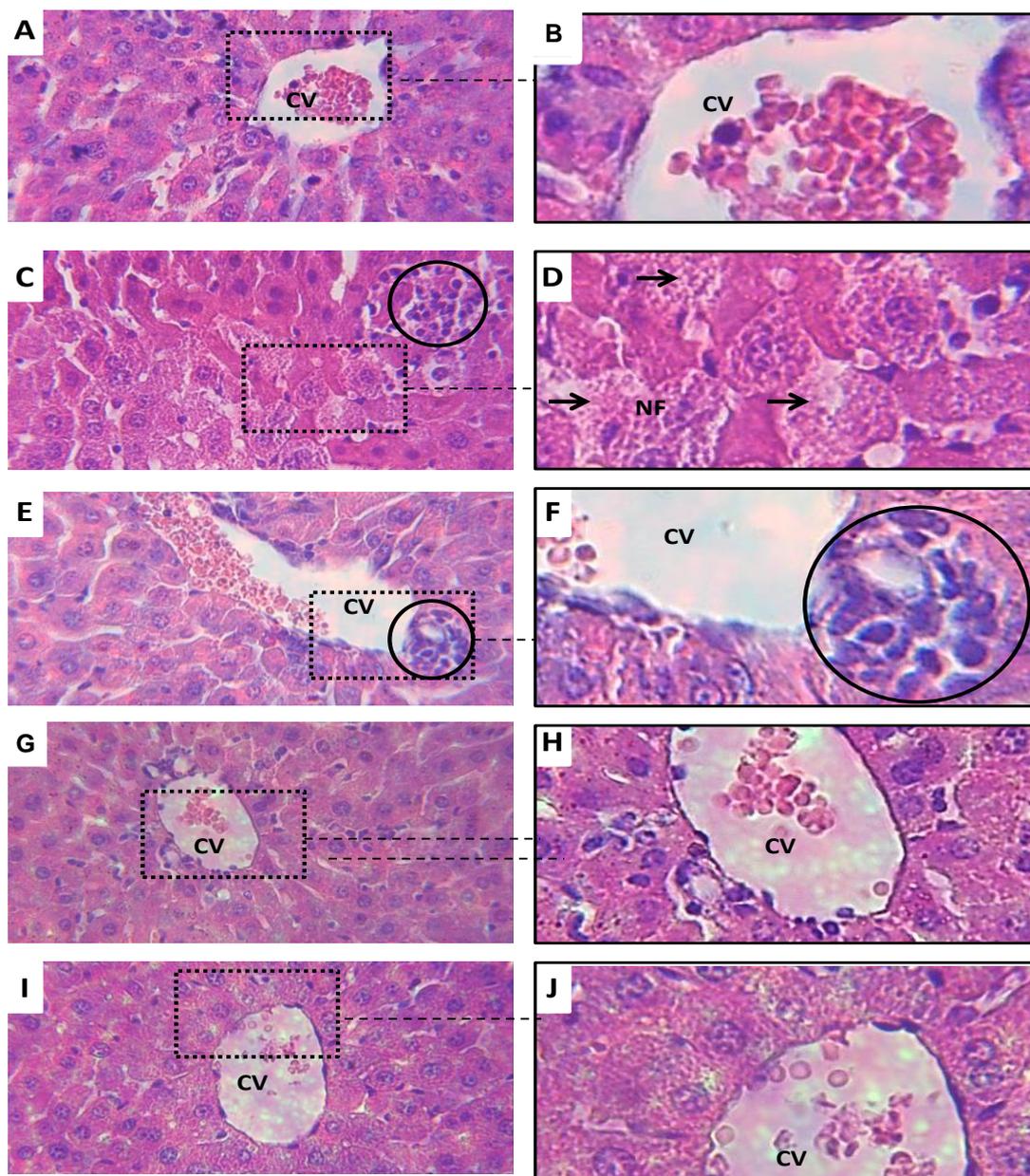


Figura 3. Microfotografia representando o efeitos do polissacarídeo sulfatado (PLS) extraído da *Gracilaria caudata*, na lesões hepática induzida por nimesulida. (A) e (B) Indica o fígado do grupo salina com arquitetura normal e veia central (VC) no centro, (C) e (D) grupo nimesulida demonstrando perda de arquitetura, infiltrado inflamatório (círculo), citoplasma espumoso vacuolado (setas), fragmentação nuclear (NF). (E) e (F) ilustram o fígado do grupo *Gracilaria caudata* (2,5) com infiltrado inflamatório (círculo). (G) e (H) Indica o fígado do grupo *Gracilaria caudata* (5,0) com redução do infiltrado inflamatório, citoplasma vacuolizado espumoso e fragmentação nuclear, melhora também observada em (I) e (J), grupo tratado com *Gracilaria caudata* (10,0). Coloração com hematoxilina e eosina em todas as imagens; ampliação original de 150 x para a coluna da esquerda e ampliação de 600 x para a coluna da direita.

Grupos	Salina	Nimesulida	<i>G. caudata</i> 2,5 mg/kg	<i>G. caudata</i> 5,0 mg/kg	<i>G. caudata</i> 10 mg/kg
Parâmetros					
Esteatose	1 (1-1)	1 (1-2)	1 (1-2)	1 (1-2)	1 (1-2)
Inflamação	1 (1-1)	3 (2-3)*	3 (2-3)	2 (2-3)#	2 (1-2)#
Necrose	1 (1-1)	3 (2-3)*	3 (2-3)	2 (2-3)#	2 (1-2)#
Vacuolização	1 (1-1)	3 (2-3)*	3 (2-3)	2 (1-2)#	2 (1-2)#
Fragmentação nuclear	1 (1-1)	3 (2-3)*	3 (2-3)	2 (1-2)#	2 (1-2)#

Tabela 1. Avaliação dos parâmetros de lesão hepática. Na tabela consta os parâmetros avaliados para identificar um quadro de lesão hepática. * $p < 0.05$ Comparado o grupo nimesulida versus grupo salina; # $p < 0.05$ Comparando grupo *Gracilaria caudata* versus grupo nimesulida (Kruskal-Wallis – seguido por teste de Dunn).

5.2 - EFEITO DO PLS DA *G. caudata* SOBRE A RELAÇÃO PESO FÍGADO/PESO ANIMAL.

Após a pesagem do fígado de cada animal, comparando ao seu crescimento, observou-se o aumento significativo da relação peso fígado/peso animal dos camundongos do grupo controle (nimesulida) ($0,05972 \pm 0,014$ g) em comparação ao grupo que recebeu apenas salina ($0,04558 \pm 0,012$ g). Os grupos tratados com o PLS da *G. caudata*, apresentaram os seguintes resultados em relação ao peso do fígado: dose de 2,5 mg/kg ($0,05615 \pm 0,014$ g); dose de 5 mg/kg ($0,05683 \pm 0,012$ g); dose de 10 mg/kg ($0,05294 \pm 0,009$ g), sendo esta última dose a que apresentou uma maior redução no que diz respeito a relação peso do fígado/peso do animal quando comparada ao grupo controle (nimesulida) conforme mostrado na (Figura 4) com ($p < 0,05$).

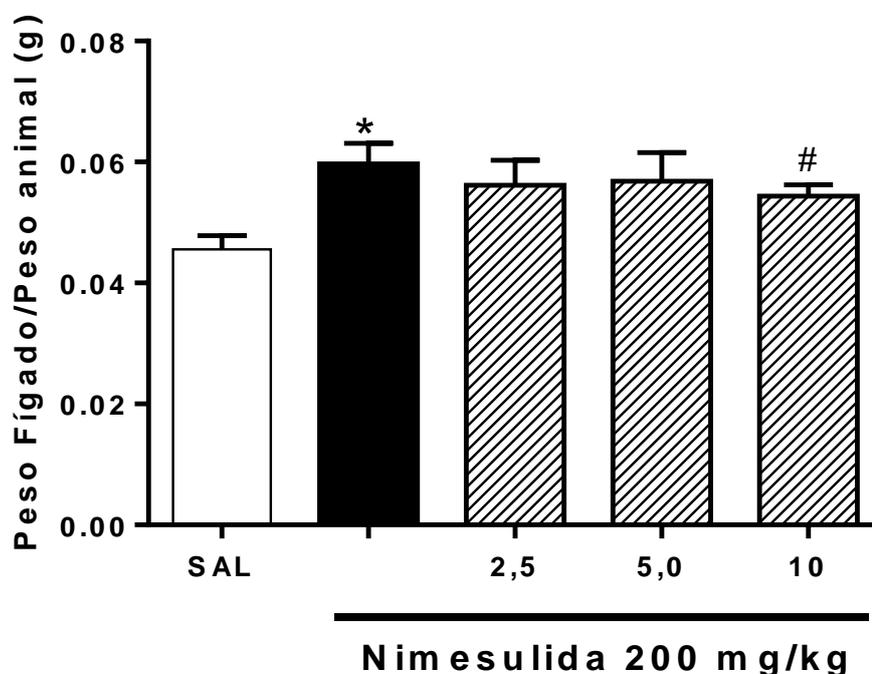


Figura 4. Efeito do polissacarídeo sulfatado (PLS) extraído da *Gracilaria caudata* sobre a relação do peso do fígado por camundongo com lesão hepática induzida por nimesulida. Os animais foram tratados com PLS (2,5, 5 e 10 mg/kg, i.p) uma vez por dia durante cinco dias. No quinto dia, os camundongos foram eutanasiados, os fígados foram recolhidos para avaliação da relação peso fígado/peso animal. Os resultados são expressos como média \pm erro de 8-10 animais por grupo. * $p < 0,05$ vs grupo salina; # $p < 0,05$ vs grupo nimesulida (ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls).

5.3 EFEITO DO PLS DA *G. caudata* SOBRE A INFILTRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS NO FÍGADO - MIELOPEROXIDASE (MPO)

Como visto na Figura 5, o grupo controle (nimesulida) demonstrou intensa infiltração de neutrófilos para o fígado ($13,70 \pm 0,550$ UMPO/mg de tecido) em relação ao grupo que recebeu apenas salina ($5,83 \pm 2,042$ UMPO/mg de tecido). O tratamento com o PLS da *G. caudata* (10 mg/kg, i.p) resultou em uma inibição significativa da infiltração de neutrófilos ($8,18 \pm 0,053$ UMPO/mg de tecido). Com $p < 0,05$.

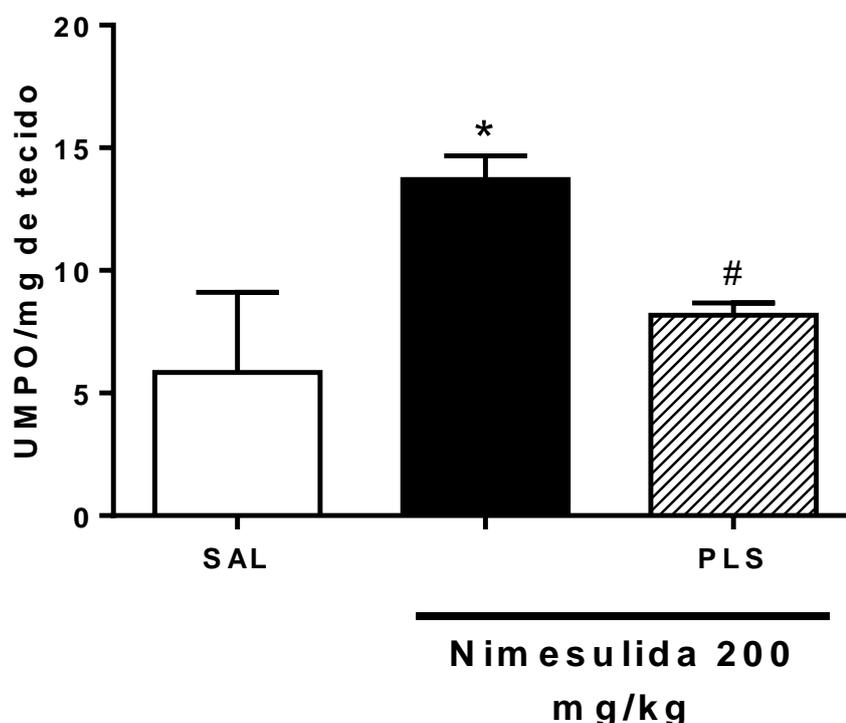


Figura 5. Efeito do polissacarídeo sulfatado (PLS) extraído da *Gracilaria caudata* sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO) em tecido hepático de camundongos com lesão hepática induzida por nimesulida. Os animais foram tratados com PLS (10 mg/kg, i.p) uma vez por dia durante cinco dias. No quinto dia, os camundongos foram eutanasiados, foram recolhidas as amostras do fígado de cada animal e a atividade de MPO foi avaliada. Os resultados são expressos como média \pm erro de 8-10 animais por grupo. * $p < 0,05$ vs grupo Salina; # $p < 0,05$ vs grupo nimesulida (ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls).

5.4 - EFEITO DO PLS DA *G. caudata* SOBRE OS NÍVEIS HEPÁTICOS DE GLUTATIONA (GSH)

De acordo com a Figura 6, o grupo controle (nimesulida) apresentou significativo consumo dos níveis de GSH ($13,56 \pm 2,96 \mu\text{g/g}$ de tecido) quando comparado ao grupo salina ($25,62 \pm 2,55 \mu\text{g/g}$ de tecido). Por outro lado o grupo tratado com o PLS da *G. caudata* (10 mg/kg , i.p) preveniu de forma significativa o consumo de GSH pelos radicais livres provenientes da lesão provocada pela nimesulida ($32,4 \pm 12,47 \mu\text{g/g}$ de tecido), demonstrando uma diferença estatística ($p < 0,05$).

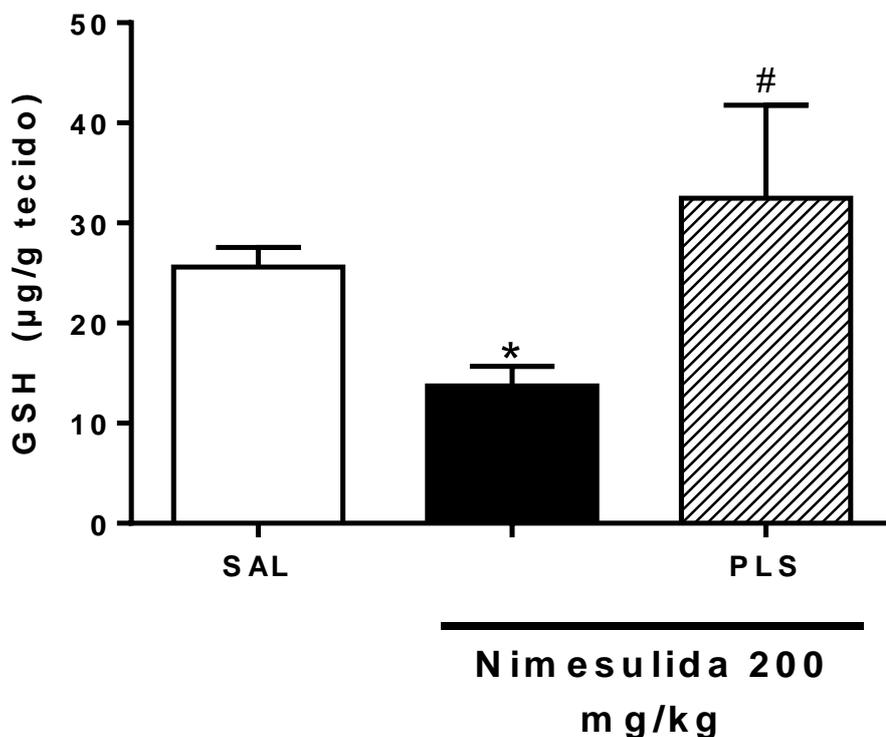


Figura 6. Efeito do polissacarídeo sulfatado (PLS) extraído da *Gracilaria caudata* sobre a concentração hepática de glutathione (GSH) em camundongos com lesão hepática induzida por nimesulida. Os animais foram tratados com PLS (10 mg/kg , v.o) uma vez por dia durante cinco dias. No quinto dia, os camundongos foram eutanasiados, as amostras de fígado foram recolhidas e os níveis GSH foram avaliados. Os resultados são expressos como média \pm erro de 8-10 animais por grupo. * $p < 0,05$ vs grupo Salina; # $p < 0,05$ vs grupo nimesulida (ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls).

5.5 - EFEITO DO PLS DA *G. caudata* SOBRE A CONCENTRAÇÃO HEPÁTICA DE ÁCIDO MALONILDIALDEÍDO (MDA)

Como mostrado na Figura 7, o grupo controle (nimesulida) expressou níveis altos de MDA ($65,7 \pm 18,6$ nmol/g de tecido) em relação ao grupo salina ($34,8 \pm 3,9$ nmol/g de tecido). O grupo tratado com o PLS da *G. caudata* (10 mg/kg, i.p) demonstrou uma significativa redução dos níveis de MDA ($29,27 \pm 3,2$ nmol/g de tecido). Com $p < 0,05$.

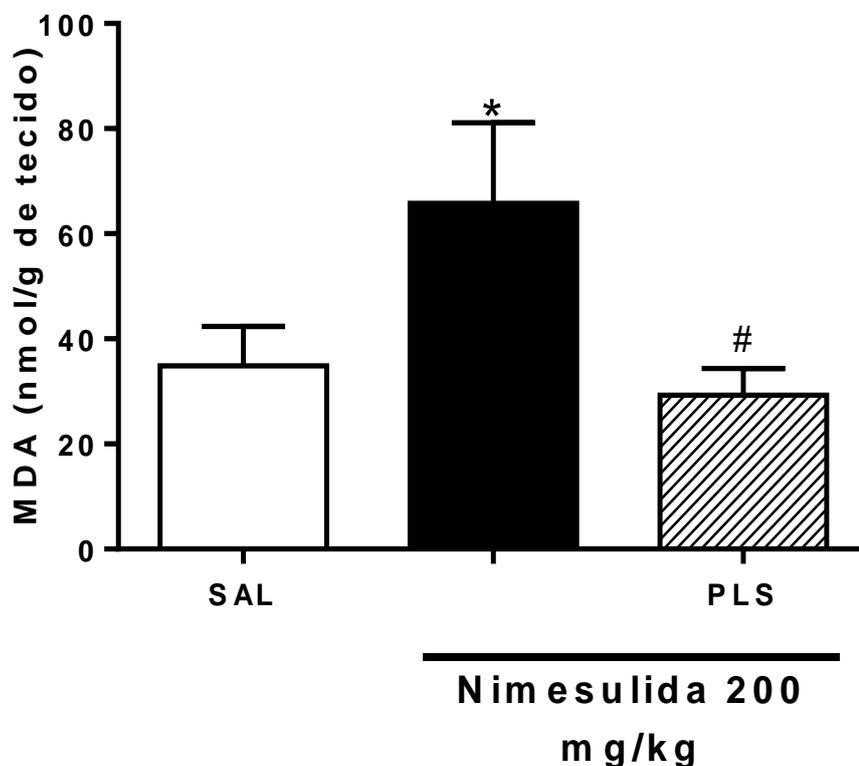


Figura 7. Efeito do polissacarídeo sulfatado (PLS) extraído da *Gracilaria caudata* sobre a concentração hepática do ácido malonildialdeído (MDA) em tecido do fígado de camundongos no modelo de lesão hepática induzida por nimesulida. Os animais foram tratados com PLS (10 mg/kg, i.p) uma vez por dia durante cinco dias. No quinto dia, os camundongos foram eutanasiados e recolhidas as amostras do fígado de cada animal para a dosagem de MDA. Os resultados são expressos como média \pm erro de 8-10 animais por grupo. * $p < 0,05$ vs grupo Salina; # $p < 0,05$ vs grupo de nimesulida (ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls).

5.6 - EFEITO DO PLS DA *G. caudata* SOBRE OS NÍVEIS HEPÁTICOS DE NITRATO E NITRITO (NO₃/NO₂)

O resultado encontrado no grupo controle (nimesulida), apresentaram elevadas concentrações de NO₃/NO₂ (0,1548 ± 0,011 μM) quando comparados aos animais que receberam apenas salina (0,1207 ± 0,034 μM) conforme mostrado na Figura 8. Por outro lado os animais tratados com o PLS da *G. caudata* (10 mg/kg, i.p) demonstraram significativa redução da concentração de NO₃/NO₂ (0,1098 ± 0,008 μM) com p<0,05, em consonância com a diminuição do dano hepático causado pela administração de nimesulida.

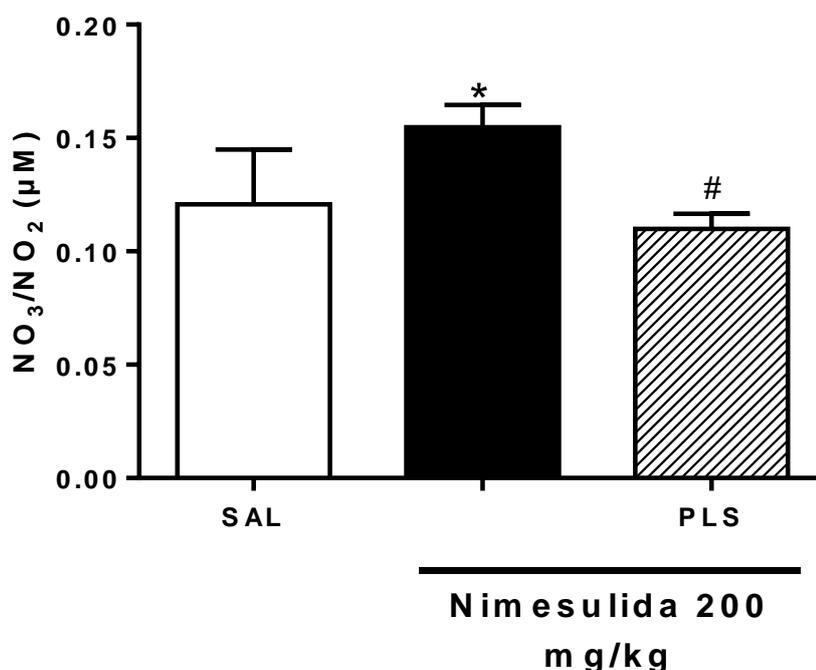


Figura 8. Efeito do polissacarídeosulfatado (PLS) extraído da *Gracilaria caudata* sobre os níveis hepáticos de produto de degradação do óxido nítrico (NO), nitrato e nitrito (NO₃/NO₂), em tecido do fígado de camundongos com lesão hepática induzida por nimesulida. Os animais foram tratados com PLS (10 mg/kg, i.p) uma vez por dia durante cinco dias. No quinto dia, os camundongos foram eutanasiados e recolhidas as amostras do fígado de cada animal para a dosagem de NO₃/NO₂. Os resultados são expressos como média ± erro de 8-10 animais por grupo. * p <0,05 vs grupo Salina; # P <0,05 vs grupo nimesulida (ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls).

5.7 – EFEITO DO PLS DA *G. caudata* SOBRE OS NÍVEIS HEPÁTICOS DE IL-1 β E TNF- α

Os animais submetidos à lesão por nimesulida, apresentaram um significativo aumento dos níveis das citocinas pró-inflamatórias dosadas, IL-1 β (536,7 \pm 16,81 pg/ml) (Figura 9); TNF- α (549,4 \pm 14,42 pg/ml) (Figura 10), comparado ao grupo salina, IL-1 β (133,8 \pm 12,44 pg/ml) (Figura 9) e TNF- α (264 \pm 18,42 pg/ml) (Figura 10). O grupo tratado com o PLS da *G. caudata* (10 mg/kg, i.p) apresentou uma redução significativa de ambas as citocinas dosadas: IL-1 β (336,8 \pm 94,03 pg/ml) (Figura 9); TNF- α (238,2 \pm 20,77 pg/ml) (Figura 10) com $p < 0,05$.

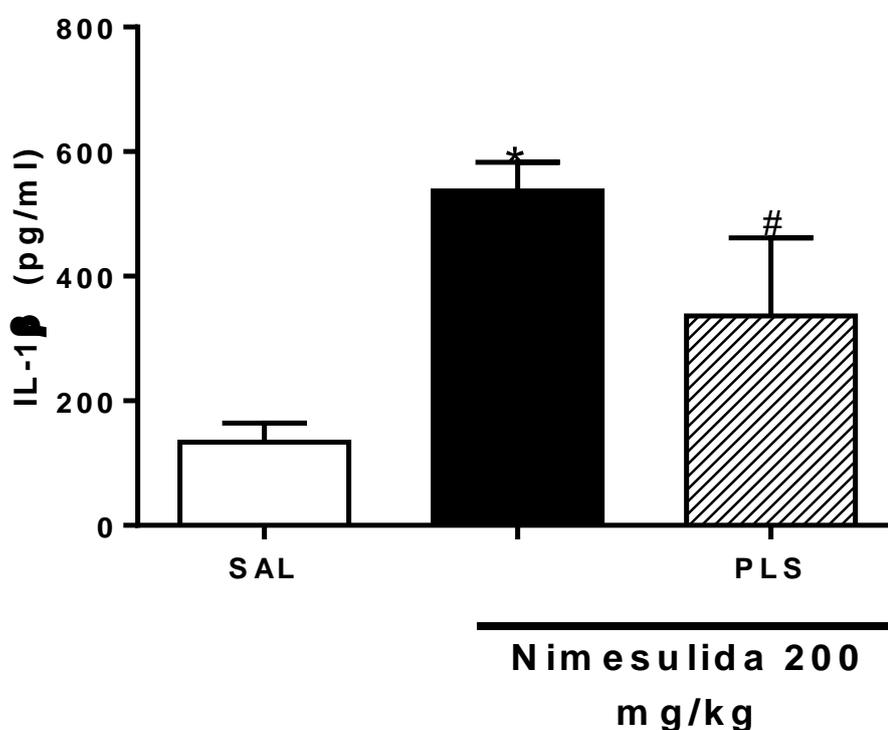


Figura 9. Efeito do polissacarídeo sulfatado (PLS) extraído da *Gracilaria caudata* sobre os níveis hepáticos de IL-1 β de camundongo com lesão hepática induzida por nimesulida. Os animais foram tratados com PLS (10 mg/kg, i.p) uma vez por dia durante cinco dias. No quinto dia, os camundongos foram eutanasiados, as amostras de fígado foram recolhidas e os níveis da citocina, IL-1 β , foram avaliados. Os resultados são expressos como a média \pm erro de 8-10 animais por grupo. * $p < 0,05$ vs grupo Salina; # $p < 0,05$ vs grupo nimesulida (ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls).

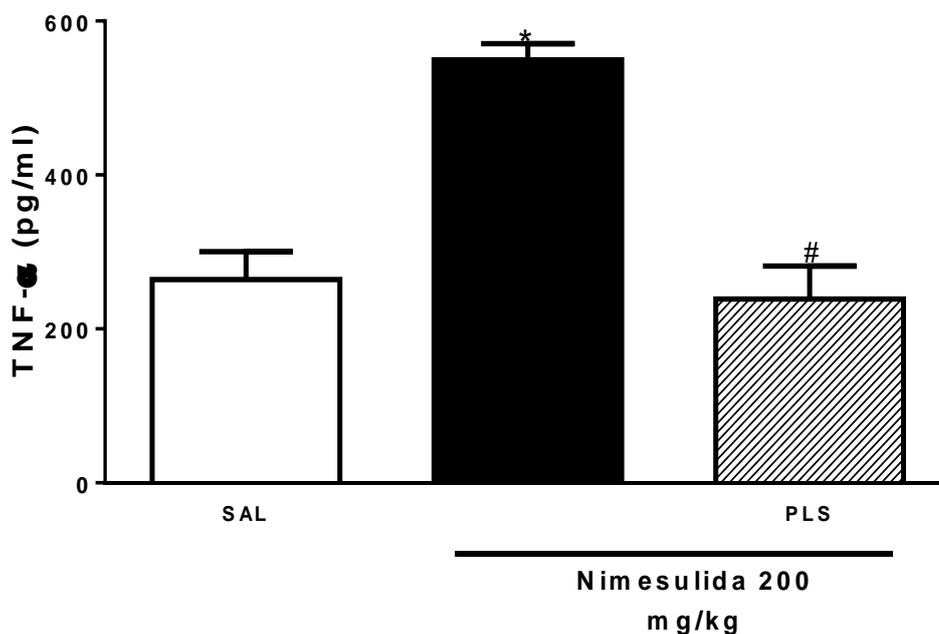
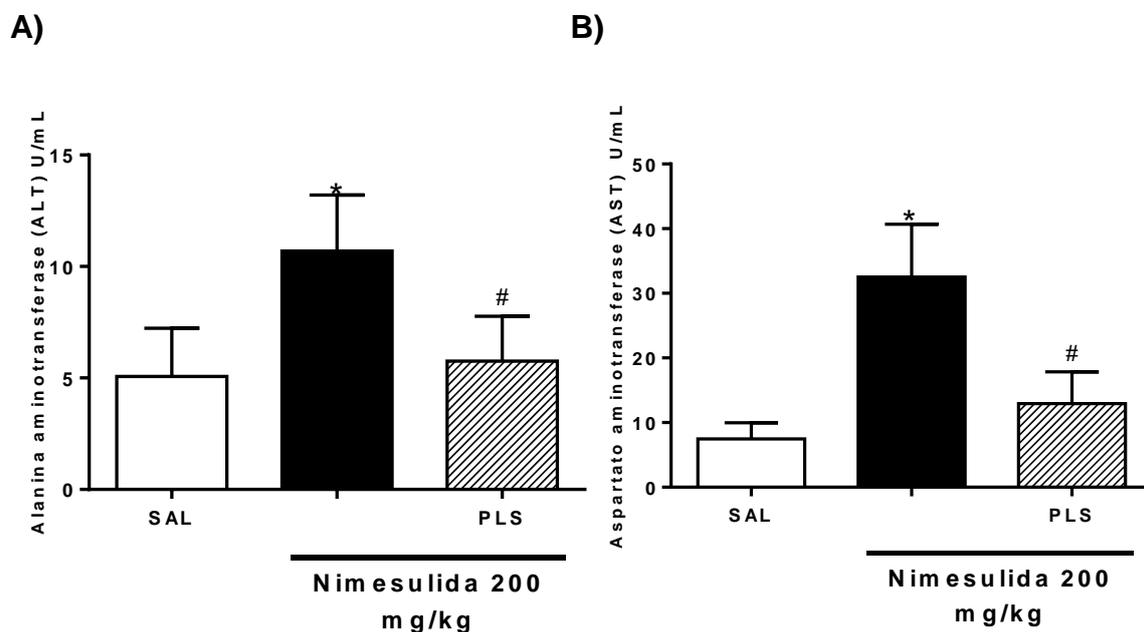


Figura 10. Efeito do polissacarídeo sulfatado (PLS) extraído da *Gracilaria caudata* sobre os níveis hepáticos de fator de necrose tumoral alpha (TNF- α) de camundongos com lesão hepática induzida por nimesulida. Os animais foram tratados com PLS (10 mg/kg, i.p) uma vez por dia durante cinco dias. No quinto dia, os camundongos foram eutanasiados, as amostras de fígado foram recolhidos e os níveis da citocina TNF- α foram avaliados. Os resultados são expressos como média \pm erro de 8-10 animais por grupo. * $p < 0,05$ vs grupo Salina; # $p < 0,05$ vs grupo nimesulida (ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls).

5.8 - EFEITO DO PLS DA *G. caudata* SOBRE OS MARCADORES DE FUNCIONALIDADE HEPÁTICA ALT, AST E Gama-GT.

Como mostrado na Figura 11 A, o grupo controle (nimesulida) apresentou um aumento significativo de ALT ($11,69 \pm 3,13$ U/mL sangue), já o grupo que recebeu apenas salina não expressou níveis de ALT significativamente elevado ($5,06 \pm 3,17$ U/mL sangue). O tratamento com o PLS da *G. caudata* (10 mg/kg, i.p) resultou em uma significativa redução dos níveis de ALT ($5,78 \pm 3,05$ U/mL sangue). Na figura 11 B, o grupo controle (nimesulida) apresentou um aumento significativo de AST ($32,51 \pm 8,78$ U/mL sangue), já o grupo que recebeu apenas salina não expressou níveis de AST significativamente elevado ($7,48 \pm 3,58$ U/mL sangue). O tratamento com o PLS da *G. caudata* (10 mg/kg, i.p) resultou em uma significativa redução dos níveis de AST ($12,92 \pm 5,05$ U/mL sangue). Como pode ser observado na Figura 11 C, o grupo controle (nimesulida) apresentou um aumento significativo de gama-GT ($6,01 \pm 3,13$ U/L sangue), já o grupo que recebeu apenas salina não expressou aumento em seus níveis de gama-GT ($3,4 \pm 2,97$ U/L sangue). O tratamento com o PLS da *G. caudata* (10 mg/kg, i.p) resultou em uma significativa redução dos níveis de gama-GT ($3,06 \pm 3,95$ U/L sangue).



C)

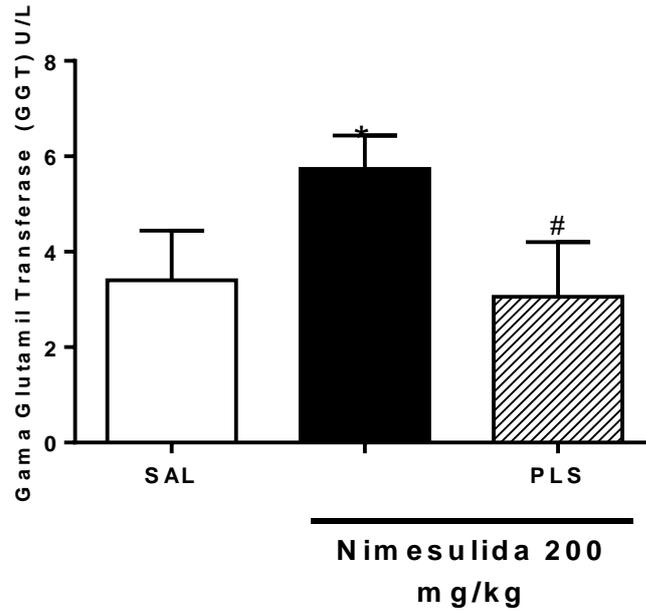


Figura 11. Efeito do polissacarídeo da *Gracilaria caudata* nos marcadores de função hepática em camundongos no modelo de lesão por nimesulida. (A) Níveis séricos de Alanina amino transferase (ALT), (B) níveis séricos de Aspartato amino transferase (AST) e (C) Níveis séricos de Gama Glutamyl Transferase (GGT). Os animais foram tratados com PLS (10 mg/kg, i.p) uma vez por dia durante cinco dias. No quinto dia, os camundongos foram anestesiados, as amostras de sangue foram recolhidas e depois processadas para obter o soro e os níveis dos marcadores de função hepática foram avaliados. Os resultados são expressos como média \pm erro de 8-10 animais por grupo. * $p < 0,05$ vs grupo Salina; # $p < 0,05$ vs grupo nimesulida (ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls).

6. Discussão

Os produtos naturais demonstram uma ampla gama de atividades farmacológicas e são utilizados há bastante tempo na medicina popular em todo o mundo, além das suas enormes contribuições para desenvolvimentos de importantes fármacos empregados na medicina moderna. (CRAGG et al., 1997 DE SMET et al.,1997). Com a busca incessante de novos recursos naturais como fonte de produtos terapêuticos, compostos derivados da *Gracilaria caudata* têm apresentado de formas satisfatórias sua empregabilidade em os mais diversos modelos experimentais. Desses compostos, podemos destacar o PLS, que foi isolado da *G. caudata* e foi caracterizado por ser um tipo de agar, estruturado principalmente por α -d-galactopiranosose e 3,6-anidro- α -L-galactose com grupos metila ou piruvato em C-6 de b-d-galactose e com um pico de massa molecular de $2,5 \times 10^5$ g mol⁻¹. O teor de sulfato é de 1%, o que corresponde a um grau de substituição por grupos sulfato (DS) de 0,13. A composição sugere uma estrutura muito próxima do que é considerado um agar ideal (BARROS et al. 2013).

Estudos desenvolvidos por diversos autores utilizando este PLS da *G. caudata* demonstraram o seu papel anti-inflamatório, antinociceptivo, antidiarreico e gastroprotetor (SILVA et al. 2011; CHAVES et al. 2013; COSTA et al. 2016). Devido tais efeitos, ainda mais no que diz respeito ao trato gastrointestinal, acaba chamando a atenção para a verificação da ação deste PLS em um órgão e glândula anexa de suma importância nesse sistema digestório que é o fígado. Levando isto em consideração, no presente estudo, refinou-se em buscar um efeito anti-inflamatório mais específico por parte do PLS, dessa vez, se tratando de uma lesão hepática, investigando por meio de ferramentas farmacológicas e procedimentos bioquímicos, tais efeitos. Os nossos resultados farmacológicos demonstram claramente um efeito anti-inflamatório do PLS da *G. caudata* reproduzido no modelo de lesão hepática induzida por nimesulida em camundongos.

O PLS da *G. caudata* na dose de 10 mg/kg administrado por via intraperitoneal (i.p) reduziu os parâmetros inflamatórios microscópicos importantes como os escores de dano, bem como a relação peso do fígado/animal, e além disto, este PLS demonstrou resultado satisfatório em todos os ensaios bioquímicos realizados: dosagem de MPO, citocinas (IL-1 β e TNF- α), MDA, GSH e NO₃/NO₂. Bem como, restaurou a funcionalidade hepática a partir das análises

de marcadores de função do fígado como ALT, AST e GAMA GT. Tais evidências destas ações promovidas pelo PLS da *G. caudata* são detalhadas minuciosamente no decorrer deste texto.

A análise histopatológica revelou que o grupo que recebeu indução de nimesulida na dose de 200 mg/kg apresentaram diferença significativa quando comparado ao grupo que recebeu somente salina, para os parâmetros como inflamação, necrose, vacuolização citoplasmática dos hepatócitos, e fragmentação nuclear, que são características fundamentais para a comprovação do dano no tecido (Figura 2). Esses fatores são desencadeados por distúrbios que afetam o fígado acarretando em degeneração e alteração na conformação dos hepatócitos (WILLEBRORDS et al. 2015), podendo, além disso, gerar um quadro de esteatose (acúmulo de lipídios nos hepatócitos) (HSU & KAO, 2017), embora em nossa análise não fossem observadas diferenças significativas para esteatose. O PLS na dose de 10 mg/kg apresentaram uma diminuição significativa dos escores das lesões dos fígados, quando comparado ao grupo nimesulida, demonstrando assim a redução de parâmetros inflamatórios importantes que lesam o tecido (TABELA 1).

O processo inflamatório envolve uma série de eventos celulares e moleculares que resultam no aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular. Esse fato promove o extravasamento de granulócitos, especialmente polimorfonucleares. A migração e ativação de mediadores químicos inflamatórios, como metabólitos do ácido araquidônico, bradicininas e citocinas presentes em macrófagos, linfócitos e outros tipos celulares servem para iniciar, coordenar e amplificar o processo inflamatório (BRITO, 2016). Isto promove um aumento do peso do tecido do fígado inflamado. Este, é considerado um indicador da gravidade e da extensão da resposta inflamatória. O peso reflete a magnitude do edema e do infiltrado celular no tecido estudado (BUSSEROLLES et al., 2005).

O tratamento com PLS da *G. caudata* promoveu a diminuição significativa do peso dos fígados avaliado, quando comparado ao grupo controle (nimesulida), sugerindo que este polissacarídeo possui uma importante ação antagonista durante o processo inflamatório hepático, onde pode-se observar seu efeito pela redução do peso e conseqüente diminuição do escores microscópicos avaliados, podendo estar relacionado a diminuição de mediadores inflamatórios específicos.

A infiltração de neutrófilos no tecido inflamada é uma das mais proeminentes características histológicas observadas (MARTIN et al., 2006; TALERO et al., 2008). Os neutrófilos são atribuídos como as células responsáveis por perturbar a integridade epitelial, causando lesões durante a hepatite (NO-SÁL'OVÁ et al., 2000). Estes danos ao tecido são causados principalmente pelo processo oxidativo oriundos da atividade da mieloperoxidase (MPO), enzima encontrada preferencialmente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos ativados e que mediante a reação da MPO com H_2O_2 e Cl^- produzem moléculas de hipoclorito (ClO^-), um potente oxidante e microbicida. Portanto a MPO é usada como um bom marcador de inflamação, lesão tecidual e infiltração de neutrófilos nos tecidos gastrointestinais lesados (MARTÍN et al., 2004; BAMIAS et al., 2011).

Confirmando os fatos, neste trabalho o grupo controle (nimesulida) apresentou uma intensa atividade da mieloperoxidase (MPO), corroborando diretamente com os danos teciduais histológicos já apresentados. Por outro lado o tratamento com o PLS da *G. caudata*, apresentou uma drástica redução da atividade desta enzima, sugerindo que o PLS possa agir diminuindo a migração de neutrófilos para o sítio da lesão, levando à proteção hepática frente aos danos causados pela administração de nimesulida. Chaves e colaboradores em 2013, demonstraram em ensaios de inflamação geral onde o PLS foi empregado como agente terapêutico, uma redução de atividade da mieloperoxidase, o que culminava também em uma diminuição do processo inflamatório, mostrando que o mesmo efeito obtido por ele foi reproduzido em nosso modelo.

Atualmente tem sido demonstrado que os principais agentes quimiotáticos para os neutrófilos são citocinas pró-inflamatórias, tais como, $IL-1\beta$ e $TNF-\alpha$, estas citocinas regulam a expressão de moléculas endoteliais vasculares que promovem a aderência de neutrófilos às células do endotélio (NEMETZ et al., 1999). Estas citocinas são moléculas de sinalização importantes do sistema imune, portanto desempenham um papel importante no curso da lesão hepática.

Estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem que os níveis de citocinas pró-inflamatórias, incluindo a $IL-1\beta$ e o $TNF-\alpha$ estão aumentados nas lesões hepáticas e correlacionam-se com a gravidade da inflamação (BOELSTERLI, 2002; GALATI et al., 2002), O $TNF-\alpha$ participa de vias intracelulares que regulam a

inflamação, morte celular e proliferação (NGUYEN, 2015). No fígado, o TNF- α não apenas medeia a hepatotoxicidade, mas também contribui para a restauração da massa funcional do fígado, promovendo a proliferação de hepatócitos e a regeneração hepática (O'CONNOR et al., 2003) o que confirma ainda mais o papel crítico destas citocinas pró-inflamatórias na patogênese da inflamação (YANG et al., 2014).

No modelo de lesão hepática induzida por nimesulida do presente estudo, a expressão de IL-1 β e TNF- α foi significativamente aumentada no grupo controle (Figuras 8 e 9 respectivamente), confirmando assim o papel crítico destas citocinas na patogênese da inflamação hepática. E por outro lado, após o tratamento dos animais com o PLS da *G. caudata*, houve uma acentuada diminuição de ambas as citocinas dosadas (IL-1 β e TNF- α), comprovando sugestivamente a hipótese de que o PLS em questão atua modulando a liberação e ativação destas duas citocinas pró-inflamatória durante o processo inflamatório, o que leva a uma diminuição da sinalização, da ativação e do recrutamento de neutrófilos para o sítio da lesão, reduzindo assim os danos teciduais e tendo como consequência a melhoria do quadro clínico e bioquímico dos animais. Os mesmos resultados foram achados em outros modelos experimentais, como o de peritonite por carragenina demonstrado por Chaves et al, 2013, que mostraram pela primeira vez a redução de tais citocinas pelo uso do PLS.

Os mecanismos moleculares atribuídos à toxicidade induzida por nimesulida ainda não foram completamente elucidados. No entanto, alguns estudos, sugerem que o mecanismo da nimesulida envolva a modificação da proteína por metabólitos reativos, produz estresse oxidativo e resulta na disfunção mitocondrial (BOELSTERLI, 2002, BOELSTERLI et al., 2006) afeta negativamente a função mitocondrial, pois causa desacoplamento e diminuição dos níveis de NAD(P)H e glutathiona nos hepatócitos (MINGATTO et al., 2002).

O estado redox do epitélio desempenha um papel de manutenção da integridade e função celular. Um potente sistema endógeno antioxidante não enzimático que atua na função redox, protegendo frente aos danos causados por espécies reativas de oxigênio (ROS) é o sistema da glutathiona (GSH) (BIA-SI et al., 2013).

A glutathiona (GSH) é um importante fator antioxidante não enzimático que está presente em todas as células. Este componente na sua forma reduzida (GSH) pode se ligar a compostos tóxicos, como os radicais livres, em reações dependentes ou não de enzimas (LI & LI & YE, 2010). A GSH é utilizada como substrato pelas enzimas das famílias da glutathiona S-transferase (GST) e da glutathiona peroxidase (GPx). Segundo Oakley em 2005, as enzimas da família GST possuem a capacidade de conjugar GSH às moléculas de drogas, peróxidos e outros produtos do processo oxidativo para detoxicação celular, enquanto as GPx pertence ao grupo de enzimas que tem por função reduzir uma variedade de hidroperóxidos orgânicos e inorgânicos utilizando GSH como molécula redutora. Após ser oxidada, a glutathiona pode sofrer um novo processo de redução por meio da enzima glutathiona redutase (GRed), retornando a seu estado de GSH. (KUSHIMA, 2010).

Verificou-se que ratos tratados com nimesulida apresentaram aumentos significativos em ROS (MADHULIKA et al., 2010). Os parâmetros de estresse oxidativo, como o níveis hepáticos de GSH, e MDA, foram examinados neste estudo. Os camundongos tratados com nimesulida tiveram uma depleção dos níveis de GSH no fígado devido a toxicidade induzida por nimesulida, assim como os estudos de Nguyen em 2015. Mas ao serem tratados com o PLS da *G. caudata* os níveis de Glutathiona foram restaurados, mostrando que nos animais que receberam tal tratamento, não possuíram suas enzimas tão consumidas, isso pode ser ligado ao fato que Devido à queda da infiltração de células inflamatórias, existe um decaimento na produção de citocinas pró-inflamatórias e uma diminuição da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), logo, exigindo menos do sistema endógeno antioxidante (PAIOTTI et al., 2009; KANDASAMY et al., 2010; PREMANATHAN et al., 2012).

A toxicidade induzida por nimesulida foi reforçada com um importante marcador de radicais livres durante o estresse oxidativo e lesão celular, o MDA (DENG et al., 2013). O MDA é um ácido carboxílico e o principal produto oriundo da oxidação de ácidos graxos poli-insaturados (WITAICENIS et al., 2012). O MDA é proveniente dos processos lipoperoxidativos, ocorre como uma consequência da lesão oxidativa (LOGUERCIO et al., 1996). O aumento dos níveis de MDA provoca ligação cruzada das proteínas plasmáticas à moléculas de ácido nucleico, sendo tóxico para a célula (LIU & WANG, 2011).

Alguns experimentos têm demonstrado que a lesão ocasionada por nimesulida promove estresse oxidativo com destruição de membrana celular e consequente aumento dos níveis de MDA (CHATTERJEE & SIL, 2007; DE OLIVEIRA et al., 2017). De acordo com os dados apresentados na Figura 5, a indução com a nimesulida durante cinco dias, resultou em um aumento dos níveis de MDA nos tecidos hepáticos de uma forma bastante notória, corroborando com os estudos anteriores citados. Isto reforça a credulidade no potencial oxidante in-vivo deste medicamento, que ao ser utilizado o PLS da *G. caudata* tais níveis foram restaurados, demonstrando assim um efeito antioxidante. Associando-se ao fato de que a geração de radicais livres contribui para o aumento do processo de infiltração de leucócitos para o tecido inflamado, ajudando assim a exacerbação do processo inflamatório no tecido. (CESTARI & BASTOS & DI STASI, 2011; SILVA, 2016).

Outro importante mediador pró-inflamatório e ativo prioritário na geração de espécies reativas de nitrogênio abordado neste estudo foi o óxido nítrico (NO). Alguns estudos indicam que o NO produzido de forma excessiva pode exacerbar as características de hepatotoxicidade por um mecanismo de lesão direto, tanto lesando os hepatócitos, como o NO pode interagir com o superóxido e formar o radical peroxinitrito (ONOO⁻), o peroxinitrito altamente tóxico, que aumenta reversivelmente a expressão de iNOS por ativação de NF-KB, o que leva a um ciclo vicioso (COOKE & DAVIDGE, 2002), também leva à nitração de proteínas mitocondriais, por exemplo, SOD2 (AGARWAL et al., 2011) e danos ao DNA mitocondrial (COVER et al., 2005b), além da ativação de neutrófilos, vasodilatação e assim por diante (JAESCHKE & MCGILL & RAMACHANDRAN, 2012).

No presente estudo o tratamento dos animais com o PLS da *G. caudata*, demonstrou uma significativa melhora da lesão do fígado induzida por nimesulida, e isso se deve sobremaneira pela inibição da geração de espécies reativas de nitrogênio ou até mesmo pela diminuição da ação do próprio NO no tecido. Isto é claramente demonstrado na Figura 11 a qual retrata a dosagem de produtos de degradação do NO (NO₃NO₂). Estes compostos expressam indiretamente o aporte de NO no tecido do fígado, portanto mostrando a contribuição do NO para a patogênese da lesão hepática na condição inflamatória induzida por nimesulida.

Assim, conforme visto em nossos resultados, os níveis de nitrato e nitrito estando de fato expressos em baixas concentrações após o tratamento dos animais com o PLS, permitem inferir que o polissacarídeo em questão também pode estar atuando de forma antagônica na produção, liberação ou diretamente no sítio de ação do óxido nítrico promovendo uma redução dos danos oriundos da ação deste gás no tecido em questão.

Além dos parâmetros inflamatórios avaliados, foi averiguado os marcadores de funcionalidade hepática AST e ALT. Ambos são enzimas citosólicas dos hepatócito, sendo a AST ainda marcadora de “dano profundo” na célula, por também encontrar-se presente na mitocôndria dos eritrócitos, embora não sejam exclusivas deste órgão, pois se encontram em muitos outros tecidos como no músculo cardíaco, no músculo esquelético, nos rins e no interior dos glóbulos vermelhos. Elas têm como função transferir o grupo amina de um aminoácido para um α -cetoácido. Quando possuem seus níveis aumentados na circulação refletem o dano celular hepático (NGUYEN et al. 2015).

A elevação pode ser proveniente de diversas fontes, incluindo hepatite viral, uso de álcool, uso de medicamentos, esteatose ou esteato-hepatite e cirrose. História de familiar e qualquer história de transfusões de sangue também tem que ser consideradas. Outras condições de saúde comuns, como diabetes, doenças cardíacas e tireoidianas, podem culminar em um aumento das transaminases hepáticas (GIBONEYGIBONEY, 2005).

O aumento nos níveis de AST indica dano hepático, como intoxicação por medicamentos, hepatites virais, podendo também ser um infarto agudo do miocárdio ou lesão musculares esqueléticas. Já quando em conjunto com o ALT, que essa por sua vez possui especificidade maior do fígado e é, portanto, considerado um melhor parâmetro para a detecção de funcionalidade hepática, acabam corroborando nos achados laboratoriais como marcadores de lesão hepática. Níveis elevados de enzimas séricas são indicativos de vazamento celular e perda da integridade funcional da membrana celular do hepatócito. (EESHA et al. 2011).

Neste estudo, camundongos tratados com nimesulida desenvolveram danos hepáticos significativos, como mostrado nos resultados de AST que servem como marcador sensível de lesão hepática, onde o grupo controle (nimesulida) apresentou níveis séricos elevados quando comparado ao grupo tratado

com PLS, mostrando que o mesmo reduziu de forma significativa tais valores, atrelado a isso, quando observamos os níveis séricos de ALT, que funciona como um marcador mais específico de lesão hepática, também por sua vez, o grupo tratado com PLS reduziu em torno de 50% a quantidade dessa enzima, quando comparamos ao grupo que recebeu somente nimesulida.

Outro marcador importante analisado foi o gama glutamil transferase (GGT), que é responsável por transferir o grupo gama-glutamil, de peptídeos ou de outros compostos que o contêm, para um receptor. Na literatura existe vários relatos que tem demonstrado que valores elevados de gama-GT estão associados a situações de patologias hepato-biliares, principalmente colestase (retardamento ou interrupção do fluxo nos canais biliares)(ANDRADE et al. 1992).

Em nosso estudo o grupo tratado com o PLS da *G. caudata*, obteve uma redução no seu valor de gama-GT, quando comparado ao grupo que recebeu somente nimesulida. Junto com o ALT e AST o gama-GT acaba corroborando dados que constam que o fígado perdeu um pouco da sua funcionalidade, visto que, houve um aumento nos níveis séricos de tais enzimas responsáveis por servirem de marcadores para lesão hepática.

Após o tratamento com o PLS 10 mg/kg, as atividades séricas de AST, ALT e gama-GT foram diminuídas de forma relativamente satisfatória, indicando a eficácia do PLS na regeneração hepática após dano, a mesma propriedade foi vista em um polissacarídeo da Yulangsan (NGUYEN et al. 2015), mostrando que os PLS possuem um efeito hepatoprotetor em lesão hepática ocasionada por nimesulida. Com isso, o PLS da *G. caudata*, demonstrou de forma satisfatória que além da diminuição do aspecto inflamatório da lesão, ainda consegue restabelecer a funcionalidade hepática por causa da sua atividade hepatoprotetora.

CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste estudo fornecem evidências claras do efeito anti-inflamatório e antioxidante do polissacarídeo sulfatado da *G. caudata*, além de restabelecer a funcionalidade do fígado durante a lesão hepática induzida por nimesulida em camundongos. Sugerindo-se que este efeito anti-inflamatório do PLS da *G. caudata* na lesão do fígado se deva através da atenuação do influxo de leucócitos para os tecidos hepáticos, pela supressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α) e diminuição do aporte de radicais livres no tecido, evitando o estresse oxidativo e danos lesivos ao mesmo. Assim diante dos resultados obtidos, podemos sugerir o polissacarídeo sulfatado extraído da *Gracilaria caudata* como um importante alvo de pesquisas para o desenvolvimento de uma alternativa terapêutica para pacientes acometidos por lesão hepática induzida por medicamentos, principalmente por aqueles que fazem uso da nimesulida.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, R. et al. **Acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice occurs with inhibition of activity and nitration of mitochondrial manganese superoxide dismutase.** J Pharmacol Exp Ther. 337:110–118, 2011.
- ALMEIDA, C.L.F., FALCÃO, H.S., LIMA, G.R., MONTENEGRO, C.A., LIRA, N.S., SOUZA, M.F.V. et al. **Bioactivities from marine algae of the genus *Gracilaria*.** Int J Mol Sci. v.12, p.4550–73, 2011.
- ALVES, VAF.; MELLO, ES. **Fígado e sais biliares** 731-791. In: Brasileiro Filho G., Bogliolo, Patologia Geral. 7ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2006.
- ANDRADE et al., **[Gamma-glutamyltransferase and alcoholic hepatic disease].** Acta Med Port. 1992 Mar;5(3):119-23.
- ARAÚJO, G. S. et al. **Administração oral dos polissacarídeos sulfatados da rodofícea *Gracilaria caudata* na sobrevivência de pós-larvas de tilápia.** Revista Ciência Agronômica, v. 39(4), p. 548-554, 2008.
- ARAUJO, MA. **Hepatotoxicidade associada à nimesulida: uma revisão de literature.** Rev. Bras. Farm. 93(3): 283 – 289, 2012.
- BARATTA, JL.; NGO, A.; LOPEZ, B.; KASABWALLA, A.; LONGMUIR, KJ.;ROBERTSON, RT. **Cellular organization of normal mouse liver: a histological, quantitative immunocytochemical, and fine structural analysis.** Histochem Cell Biol 131:713– 726, 2009.BARROS et al. 2013;
- BATISTA, J. A. et al. **Polysaccharide isolated from *Agardhiella ramosissima*: Chemical structure and anti-inflammation activity.** Carbohydrate Polymers. v. 99, p. 59– 67, 2014.
- BENNETT, A. **Overview of nimesulide.** Rheumatology (Oxford); (38 Suppl 1) : 1-3, 1999.
- BERNAREGGI, A.; RAINSFORD, KD. **Pharmacokinetics of Nimesulide.** In Nimesulide: actions and uses, Birkhauser, p. 107, 2005.
- BERSON, A.; CAZANAVE, S.; DESCATOIRE, V. et al. **The antiinflammatory drug, nimesulide (4-nitro-2- phenoxy methane-sulfoanilide), uncouples mi-**

tochondria and induces mitochondrial permeability transition in human hepatoma cells: protection by albumin. J pharmacol experiment therap. 318(1): 444-454, 2006.

BHATTACHARYA et al. **Nimesulide induced leukocytoclastic vasculitis and hepatitis: a case report.** SpringerPlus 4:302, 2015.

BIASI et al. **Inflammatory bowel disease: mechanisms, redox considerations, and therapeutic targets.** Antioxid. Redox Signal. V. 19(14), p. 1711–1747, 2013.

BOELSTERLI, UA. **Mechanisms of NSAID-induced hepatotoxicity.** Drug Saf. 25, 633–648, 2002.

BOELSTERLI, UA.; HO, HK.; ZHOU, S.; YEOWLEOW, K. **Bioactivation and hepato-toxicity of nitroaromatic drugs.** Curr . Drug Metab. 7, 715–727, 2006.

BRADLEY, PP.; CHRISTENSEN, RD.; ROTHSTEIN, G. **Cellular and extra-cellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation.** Blood. v. 60(3), p. 618-622, 1982.

BRITO, TV. **Efeito anti-inflamatório e antioxidante do polissacarídeo sulfatado extraído da alga marinha vermelha *hypnea musciformis* durante a colite induzida por tnbs em ratos.** 2016. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade federal do Piauí

BRITO, T. V. et al. **Anti-inflammatory effect of a sulphated polysaccharide fraction extracted from the red algae *Hypnea musciformis* via the suppression of neutrophil migration by the nitric oxide signalling pathway.** J. Pharm. Pharmacol. 65, 724–733, 2013.

BRITO, T. V. et al. **Sulfated-polysaccharide fraction extracted from red algae *Gracilaria birdiae* ameliorates trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis in rats.** J. Pharm. Pharmacol. v. 66(8), p. 1161-70, 2014.

BAMIAS, G. et al. **Cytokines in the pathogenesis of ulcerative colitis**. *Discov. Med.* v. 60, p. 459–467, 2011. COSTA et al. 2016.

BRUNTON, L.; PARKE, K.; BLUMENTHAL, D. et al. **Goodman & Gilman's manual of pharmacology and therapeutics**. McGraw Hill, p. 455, 2008.

BUSSEROLLES, J. et al. **Protection against 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid-induced colonic inflammation in mice by the marine products bolinaquinone and petrosaspongiolide M**. *Biochemical pharmacology.* v. 69(10), p. 1433–1440, 2005.

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

CAPEK P., HRIBALOVA V., SVANDOVA E., EBRINGEROVA A., SASINKOVA V. MASAROVA J. **Characterization of immunomodulatory polysaccharides from *Salvia officinalis* L.** *Int. J. Biol. Macromol.* 33, 113 – 119. 2003.

CESTARI, SH.; BASTOS, JK.; DI STASI, LC. **Intestinal anti-inflammatory activity of *Baccharis dracunculifolia* in the model of rat**. *Evid Based Complement Alternat Med.* v. 2011, p.1-9, 2011.

CHATTERJEE, M.; SIL, PC. **Protective role of *Phyllanthus niruri* against nimesulide induced hepatic damage**. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 22 (1) 109-116, 2007.

CHATTERJEE, S., PAL, J., BISWAS, N. **Nimesulide-induced hepatitis and toxic epidermal necrolysis**. *J Postgrad Med.* 54(2):150-151, 2008.

CHOLONGITAS, D.; KOULENTI, K.; PETRAKI2, GV. **Papatheodoridis. Nimesulide-induced acute hepatitis**. *Annals of gastroenterology* 16(4):359-362, 2003.

COELHO, L. F. **Análise morfológica do fígado e baço de camundongos Balb/c submetidos à desnutrição protéico-calórica e infectados com**

Leishmania infantum. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade federal de ouro preto.

COSGROVE, BD.; ALEXOPOULOS, LG.; HANG, T. et al. **Cytokine-associated drug toxicity in human hepatocytes is associated with signaling network dysregulation**. Mol Biosyst. 6(7): 1195–1206, 2010.

DA SILVA et al. **Relationship between-889 C/T polymorphism in interleukin-1 A gene and risk of chronic periodontitis: evidence from a meta-analysis with new published findings**. Medicina oral, patologia oral y cirurgia oral, p.0, 2016.

DENG et al. **The analgesic and anti-inflammatory bioactivities of eburicoic acid and dehydroeburicoic acid isolate from *Antrodia camphorata* on the inflammatory mediator expression in mice**. J. Agric. Food. Chem. v. 61 p. 5064–5071, 2013.

DUNCAN, AW.; DORRELL, C.; GROMPE, M. **Stem cells and liver regeneration**. Gastroenterology 137:466–481, 2009.

EIPEL, C.; ABSHAGEN, K.; VOLLMAR, B. **Regulation of hepatic blood flow: The hepatic arterial buffer response revisited**. World J Gastroenterol 16(48): 6046-6057, 2010.

GUENGERICH, FP. **Cytochrome P450s, drugs, and diseases**. Mol Interv; 3:194204, 2003.

GAO, B.; JEONG, W.; TIAN, Z. **Liver: an organ with predominant innate immunity**. Hepatology 47:729-736, 2008.

CHAVES et al. **Antiinflammatory and antinociceptive effects in mice of a sulfated polysaccharide fraction extracted from the marine red algae *Gracilaria caudata***. Immunopharmacol Immunotoxicol. 2013 Feb;35(1):93-100.

CONG, Q. et al. **Structural characterization and effect on anti-angiogenic activity of afucoidan from *Sargassum fusiforme***. Carbohydrate Polymers. v. 136, p. 899–907, 2016.

COOKE CL & DAVIDGE ST. **Peroxynitrite increases iNOS through NF-kappaB and decreases prostacyclin synthase in endothelial cells**. Am J Physiol Cell Physiol. 2002 Feb;282(2):C395-402.

COVER, C., MANSOURI, A., KNIGHT, T. R., BAJT, M. L., LEMASTERS, J. J., PESSAYRE, D., et al. **Peroxynitrite-induced mitochondrial and endonuclease-mediated nuclear DNA damage in acetaminophen hepatotoxicity**. J Pharmacol Exp Ther 315:879–887. 2005b

CRAGG, G.M., NEWMAN, D.J., SNADER, K.M. **Natural products in drug discovery and development**. J Nat Prod. 1997 Jan;60(1):52-60.

DE SMET, P.A. **The role of plant-derived drugs and herbal medicines discovery and development**. J Nat Prod 1997, 60, 52–60.

DOREA, C. M. P. G. et al. **A sulfated polysaccharide, fucans, isolated from brown algae *Sargassum vulgare* with anticoagulant, antithrombotic, antioxidant and anti-inflammatory effects**. Carbohydrate Polymers. v. 91, p. 467– 475, 2013.

EESHA et al. **Hepatoprotective activity of Terminalia paniculata against paracetamol induced hepatocellular damage in Wistar albino rats**. Asian Pac J Trop Med. 2011 Jun;4(6):466-9

FARIAS, E. A. O. **Prospecção do rendimento da carragenina extraída da alga *Hypnea musciformis* coletada na Praia do Coqueiro, estado do Piauí, submetida a quatro tratamentos prévios**. Demetra. v. 9(4), p. 1019-1025, 2014.

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.

FONSECA, R. J. C. **Slight differences in sulfatation of algal galactans account for differences in their anticoagulant and venous antithrombotic activities.** Thrombosis and Haemostasis, v. 99(3), p. 539-545, 2008.

FURA A. **Role of pharmacologically active metabolites in drug discovery and development.** Drug Discov Today 2006;11:133142.

GALATI, G. et al. **Idiosyncratic NSAID drug induced oxidative stress.** Chem Biol Interact. 2002 Nov 10;142(1-2):25-41.

GIBONEY, PT. **Mildly Elevated Liver Transaminase Levels in the Asymptomatic Patient.** American Family Physician. Volume 71, Number 6, March 15, 2005

GIULIANO, F.; FERRAZ, JG.; PEREIRA, R.; DE NUCCI, G.; WARNER, TD. **Cyclooxygenase selectivity of non-steroidal antiinflammatory drugs in humans: ex vivo evaluation.** Eur J Pharmacol; 426 : 95-103. 23, 2001.

GREEN, L.C. et al. **Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids.** Anal Biochem. v.126, p.131–138, 1982. 2010.

GUENGERICH, FP. **Cytochrome P450s, drugs, and diseases.** Mol Interv 2003;3:194204.

GUZMAN, G. **Overview of liver pathology.** Dis Mon 54:419-431, 2008.

HOLT, MP.; JU, C. **Mechanisms of drug-induced liver injury.** AAPS J. E48-54, 2006.

HSU CS, KAO JH. **An update on non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in Asia.** Expert Rev Gastroenterol Hepatol 2017.

HUNTER, EB; et al. **Bromfenac (Duract)-associated hepatic failure requiring liver transplantation.** Am J Gastroenterol. 94:2299–2301, 1999.

ISHIBASHI, H.; NAKAMURA, M.; KOMORI, A.; MIGITA, K.; SHIMODA, S. **Liver architecture, cell function, and disease**. *Semin Immunopathol* 31:399–409,a, 2009.

JAESCHKE, H., MCGILL, M., RAMACHANDRAN, A. **Oxidant stress, mitochondria, and cell death mechanisms in drug-induced liver injury: Lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity**. *Drug Metabolism Reviews*, 2012; 44(1): 88–106

KANDASAMY, R. et al. **Isatin down-regulates expression of atrial natriuretic peptide receptor A and inhibits airway inflammation in a mouse model of allergic asthma**. *Int. Immunopharmacol.* v. 10, p. 218–225, 2010.

KIERSZENBAUM, AL. **Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia**. Elsevier, Rio de Janeiro, 2004.

KIM, M. H.; JOO, H. G. **Immunostimulatory effects of fucoidan on bonemarrow-derived dendritic cells**. *Immunology Letters*. v. 115(2), p. 138–143, 2008.

KOHLROSER, J.; BANNER, BF.; BONKOVSKY, HL. **Hepatotoxicity due to troglitazone: report of two cases and review of adverse events reported to the United States Food and Drug Administration**. *Am J Gastroenterol*. 95:272–276, 2000.

KONTOGIORGIS, CA.; HADJJPAVLOU-LITINA, DJ. **Nou steroidal anti-inflammatory and anti-allergy agents**. *Current Medicinal Chemistry*. V.9, p. 89-98, 2002.

KUSHIMA, H. **Efeito dos extratos metanólicos das folhas de Davilla elliptica e Davilla nitida na vigência de colite experimental induzida por ácido trinitrobenzeno sulfônico em ratos**. Botucatu. f. 74, 2010. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) Instituto de Biociências de Botucatu da Universidade Estadual Paulista – UNESP.

LARSON, AM.; KAPLAN, MM.; BONIS, PAL. **Drugs and the liver: Metabolism and mechanisms of injury**. UpToDate, June 11, 2009.

LASSER et al. **Timing of new black box warnings and withdrawals for prescription medications.** JAMA. 2002;287:2215–2220.

LEONE, A.; NIE, A.; BRANDON, P.J.; SAWANT, S.; PIECHTA, LA.; KELLEY, MF.; MARK KL.; JIM, PS.; VERHEYEN, G.; JOHNSON, MD.; LORD, PG.; MCMILLIAN, MK. **Oxidative stress/reactive metabolite gene expression. Signature in rat liver de-tects idiosyncratic hepatotoxicants.** Toxicol. Appl. Pharmacol. 275,189–197, 2014.

LI, W.; LI, Z.; YE, Q. **Enzymatic synthesis of glutathione using yeast cells in two-stage reaction.** Bioprocess. Biosyst. Eng. v. 33(6), p. 675-682, 2010.

LIN, C.; KHETANI, SR. **Advances in Engineered Liver Models for Investigating Drug-Induced Liver Injury.** BioMed Research International, 2016.PARANÁ, 2011

LIU, X.; WANG, J. **Anti-inflammatory effects of iridoid glycosides fraction of *Folium syringae* leaves on liver injury.** Journal of Ethnopharmacology. v. 133, p. 780–787, 2011.

LOGUERCIO et al. **Direct evidence of oxidative damage in acute and chronic phases of experimental colitis in rats.** Digestive Diseases Sciences. v. 6, p. 1201–1211, 1996.

MARTÍN A. R. et al. **Resveratrol, a polyphenol found in grapes, suppresses oxidative damage and stimulates apoptosis during early colonic inflammation in rats.** Biochem. Pharmacol. v.67, p. 1399–1410, 2004.

MARTIN et al. **The effects of resveratrol, a phytoalexin derived from red wines, on chronic inflammation induced in an experimentally induced colitis model.** British Journal of Pharmacology. v. 147, p. 873–885, 2006.

MCCUSKEY, R. **The hepatic microvascular system in health and its response to toxicants.** The Anatomical Record 291:661–671, 2008.

MEISTER, A. **Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal; Applications in research and therapy.** Pharmacol. Ther. v. 51, p. 155, 1991.

MERLANI, G.; FOX, M.; OEHEN, HP.; CATHOMAS, G.; RENNER, EL.; FAT-
TINGER, K.; SCHNEE-MANN, M.; KULLAK-UBLICK, GA. **Fatal hepatotoxicity
secondary to nimesulide**. Eur. J. Clin. Pharmacol. 57,321–326, 2001.

MIHARA, M.; UCHIYAMA, M. **Determination of malonaldehyde precursor in
tissues by thiobarbituric acid test**. Anal. Biochem. v. 86(1), p. 271-278,1978.

MINGATTO, FE.; SANTOS, AC.; RODRIGUES, T.; et al. **Effects of nimesulid
and its reduced metabolite on mitochondria**. Br J Pharmacol. 131:1154-
1160, 2000.

MINGATTO, FE.; RODRIGUES, T.; PIGOSO, AA.; UYEMURA, AS.; CURTI, C.;
SANTOS, AC. **The critical role of mitochondrial energetic impairment in
the toxicity of nimesulide to hepatocytes**. J Pharmacol Exp Ther.
Nov;303(2):601-7, 2002.

NOBRE, SR.; ROMÃOZINHO, JM.; FERREIRA, M.; et al. **Hepatotoxicidade
por nimesulide: a propósito de um caso clínico**. GE J Port Gastreenterol.
15:168-172, 2008.

NGUYEN; VANPHUC; HUANG; JIANCHUN; VANMINH, D.; LIN, X.; NENG-
TANG, X.; HUANG, Y.; TANG, A.; YANG, X.; HUANG, R. **Hepatoprotective
effects of Yulangsan polysaccharide against nimesulide-induced liver in-
jury in mice**. Journal of Ethnopharmacology. 172; 273–280, 2015.

OAKLEY, AJ. **Glutathione transferases: new functions**. Curr. Opin. Struct.
Biol. v. 15, p. 716-723, 2005.

NEMETZ, A. et al. **IL1B gene polymorphisms influence the course and se-
verity of inflammatory bowel disease**. Immunogenetics. v. 49, p. 527–531,
1999.

NERGARD C. S., DIALLO D., INNGJERDINGEN K., MICHAELSEN T. E.,
MATSUMOTO T., KIYOHARA H., YAMADA H., AND PAULSEN B. S. **Medici-
nal use of Cochlosper-mum tinctorium in Mali anti-ulcer-, radical scaven-
ging and immunomodulating activities of polymers in the aqueous extract
of the roots**. J. Ethnopharmacol. 96, 255 – 269. 2005

NOSÁL'OVÁ et al. **Effect of Nacetylcysteine on colitis induced by acetic acid in rats.** Gen. Pharmacol. v.35, p. 77–81, 2000.

O'CONNOR N., DARGAN P. I., JONES A. L. **Hepatocellular damage from non-steroidal anti-inflammatory drugs.** QJM. 2003 Nov;96(11):787-91.

OLIVEIRA, A.; RODRIGUES, S.; JESUS, G.; JORGE, R. **Drug-induced hepatitis treated with corticosteroids – a clinical case report.** Rev. Soc. Portuguesa. Med Interna. V.12 . n ° 1. JAN/MAR, 2005.

OLIVEIRA et al. **Effects of dexamethasone and nimesulide on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: An experimental study.** Arch Oral Biol. Nov;83:317-326. 2017.

ONG, MM.; WANG, AS.; LEOW, KY.; KHOO, YM.; BOELSTERLI, UA. **Nimesulide-induced hepatic mitochondrial injury in heterozygous Sod2p/-mice.** Free Radic. Biol.Med.40,420–429. 2006.

ÖZGÜR, O.; HACIHASANOGLU, A.; KARTI, S. et al. **Nimesulide induced fulminant hepatitis.** Turk J Gastroenterol. 14(3):.208-210, 2003.

PAIOTTI, A. P. et al. **Effect of COX-2 inhibitor after TNBS-induced colitis in Wistar rats.** J. Mol. Histol. v. 40, p. 317–324, 2009.

PAPAIOANNIDES, D.; KORANTZOPOULOS, P.; ATHANASSIOU, E.; et al. **Nimesulide-induced acute hepatotoxicity.** Indian J Gastroenterol, 22: 239, 2003.

PARANÁ, R. **Mecanismos de hepatotoxicidade medicamentosa: o exemplo do acetaminofen/paracetamol.** GED gastroenterol. endosc.dig: 30(Supl.1):06-47, 2011.

PEREIRA, J.G. et al. **Polysaccharides isolated from *Digenea simplex* inhibit inflammatory and nociceptive responses.** Carbohydrate Polymers. v. 108, p. 17–25, 2014.

PESSOA, LS. **Avaliação da extensão e severidade dos danos hepáticos causados pela periodontite experimental.** 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) – Universidade federal do Piauí

POLIMENI, G.; SALVO, F.; CUTRONEO, P.; MORREALE, I.; CAPUTI AP. **Adverse reactions induced by NSAIDs and antibacterials analysis of spontaneous reports from the sicilian regional database.** Drug Saf 29:449–459, 2006.

PREMANATHAN, M. et al. **Antioxidant & anticancer activities of isatin (1H-indole-2,3-dione), isolated from the flowers of Couroupita guianensis Aubl.** Indian. J. Med. Res. v. 136, p. 822–826, 2012.

QUINDERÉ, A.L.G. et. al. Peripheral antinociception and anti-edematogenic effect of a sulfated polysaccharide from *Acanthophora muscoides*. **Pharmacological Reports.** v. 65, p. 600-613, 2013.

RACANELLI, V.; REHERMANN, B. **The liver as an immunological organ.** Hepatology 43(2):54-62. 2006.

RAVEN, P.H. et al. **Biologia vegetal.** 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 906p

REPKA, J. C. D. et al. **Proposta de um novo modelo experimental de indução de doença inflamatória intestinal.** Acta Cirúrgica Brasileira. v. 19(5), p. 548-554, 2004.

RODRIGO, L.; DE FRANCISCO, R.; PÉREZ-PARIENTE, JM.; et al. **Nimesulide-Induced Severe Hemolytic Anemia and Acute Liver Failure Leading to Liver Transplantation.** Scand J Gastroenterol. 37(11): 1341-1343, 2002.

ROMERO-GOMEZ, M.; SANTOS, MN.; FERNANDEZ, MAO.; FOVELO, MJ.; SUAREZ-GARCIA, E.; FERNANDEZ, MC. **Acute cholestatic hepatitis induced by nimesulide.** Liver 19,164–165. 1999.

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

RODRIGUES, J. A. G. et al. **Extração e atividade anticoagulante dos polisacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Halymenia pseudoflore-***

sia. Revista Ciência Agronômica. v. 40(2), p. 224-231, 2009. SUDHARSANA et al., 2015.

SAKATA, RK.; ISSY, AM. **Fármacos para tratamento da dor**. Ed. Manole. 1º Ed. São Paulo, 2008.

SBEIT, W.; KRIVOY, N.; SHILLER, M; et al. **Nimesulide induced acute hepatitis**. Ann Pharmacother, 35(9):1049- 1052, 2001.

SCHINONI, MI. **Fisiologia hepática**. Gaz. méd. Bahia; 76: Suplemento 1:S5-S9, 2006.

SEDLAK, J.; LINDSAY, RH. **Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent**. Anal Biochem; 24:192–205, 1968.

SILVA et al. Sulfated-polysaccharide fraction from red algae Gracilaria caudata protects mice gut against ethanol-induced damage. Mar Drugs. 2011;9(11):2188-200.

SILVA, R. O. et al. **A Sulfated-Polysaccharide Fraction from Seaweed Gracilaria birdiae Prevents Naproxen-Induced Gastrointestinal Damage in Rats**. Mar. Drugs. v. 10, p. 2618-2633, 2012.

SINGH et al. **Natural terpenes prevent mitochondrial dysfunction, oxidative stress and release of apoptotic proteins during nimesulide-hepatotoxicity in rats**. PLoS One. 2012;7(4):e34200

SORIANO, E. M. et al. **Frontiers on algae bioactive compounds**. Brazilian Journal of Pharmacognosy. v. 21(2), p. 2, 2011.

STADLMANN, S.; ZOLLER, H.; VOGEL, W. **Cox-2 inhibitor (nimesulide) induced acute liver failure**. Virchows Arch. 440(5):553-555, 2002.

SYNYTSYA, A. et al. **Mekabu fucoidan: Structural complexity and defensive effects against avian influenza A viruses**. Carbohydrate Polymers. v. 111, p. 633–644, 2014.

TALERO, E. et al. **Acute and chronic responses associated with adreno-medullin administration in experimental.** Peptides. v. 29, p. 2001–2012, 2008.

TAN, HH.; ONG, WMC.; LAI, SH.; et al. **Nimesulide induced hepatotoxicity and fatal hepatic failure.** Singapore Med J. 48(6):582-585, 2007.

TAVARES-MURTA et al. **Local profile of cytokines and nitric oxide in patients with bacterial vaginosis and cervical intraepithelial neoplasia.** Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. v.138, p.93–99, 2008.

THAMES, G. **Drug-induced liver injury: what you need to know.** Gastroenterol Nurs. 27:31–33, 2004.

VAN BEZOOIJEN CF. **Influence of age-related changes in rodent liver morphology and physiology on drug metabolism - a review.** Mech Ageing Dev 1984; 5:1-22.

VAN STEENBERGN, W.; PEETERS, P.; DE BONDT, J. **Nimesulide-induced acute hepatitis: evidence from six cases.** J Hepatol. 29:135-141,1998.

VASCONCELOS, DFP. **Decrease of Pericytes is Associated With Ligature-Induced Periodontitis Liver Disease in Rats.** Journal of Periodontol. 2017 Feb;88(2):e49-e57

VIJAYABASKAR, P.; VASEELA, N.; THIRUMARAN, G. **Potential antibacterial and antioxidant properties of a sulfated polysaccharide from the brown marine algae *Sargassum swartzii*.** Chinese Journal of Natural Medicines. v. 10(6), p. 0421–0428, 2012.

WANG, Y.; ZENG, Y.; XU, F. **Drug safety issues of nimesulide in China-nimesulide-induced liver injury.** Pharmacoepidemiol. Drug saf.20, 778-779, 2011.

WIJESEKARA, I.; KIM, S. K. **Angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitors from marine resources: Prospects in the pharmaceutical industry.** Marine Drugs. v. 8, p. 1080–1093, 2010.

WIJESEKARA, I.; YOON, N. Y.; KIM, S. K. **Phlorotannins from *Ecklonia cava* (Phaeophyceae): Biological activities and potential health benefits.** *Biofactors*. v. 36(6), p. 408-414, 2010.

WILLEBRORDS J, PEREIRA IV, MAES M, et al. **Strategies, models and biomarkers in experimental non-alcoholic fatty liver disease research.** *Prog Lipid Res* 2015; 59:106-25.

WITAICENIS, A. et al. **Suppression of TNBS-induced colitis in rats by 4-methylesculetin, a natural coumarin: Comparison with prednisolone and sulphasalazine.** *Chemico-Biological Interactions*. v. 195, p. 76–85, 2012.

YANG, M. et al. **Effect of *Astragalus* polysaccharides on expression of TNF- α , IL-1 β and NFATc4 in a rat model of experimental colitis.** *Cytokine*. v.70, p. 81–86, 2014.

YE, H. et al. **Purification, antitumor and antioxidant activities in vitro of polysaccharides from the brown seaweed *Sargassum pallidum*.** *Food Chemistry*. v. 111, p. 428–432, 2008.

ANEXOS



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**



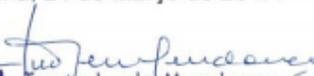
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Efeitos do polissacarídeo sulfatado da alga marinha *Gracilaria caudata* no modelo de lesão hepática induzida por nimesulida**", registrada nº **277/16**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. ANDRÉ LUIZ DOS REIS BARBOSA– Campus Ministro Reis Veloso/UFPI** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de Pesquisa Científica- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data **24/03/2017**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	Abril/ 2017 à Março/ 2018
Espécie/Linhagem/raça	Camundongo heterogênico/swiss
Nº de Animais	300
Peso/ Idade	25-30g
Sexo	Machos
Origem	Biotério do CCA/UFPI

Teresina, 24 de Março de 2017.


Prof. Ivete L. de Mendonça
 Comissão de Ética em Experimentação Animal-UFPI
 Coordenadora