



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

RAFAEL DA SILVA PRUDÊNCIO

**POLISSACARÍDEO SULFATADO EXTRAÍDO DA ALGA *Gracilaria domingensis*:
ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA**

**PARNAÍBA
2023**

RAFAEL DA SILVA PRUDÊNCIO

**POLISSACARÍDEO SULFATADO EXTRAÍDO DA ALGA *Gracilaria domingensis*:
ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA**

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

Linha de Pesquisa: Farmacologia Molecular Aplicada a Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. André Luiz dos Reis Barbosa

PARNAÍBA

2023

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Delta do
ParnaíbaBiblioteca Central Prof.
Cândido Athayde Serviço de
Processamento Técnico

P971p Prudêncio, Rafael da Silva.

Polissacarídeo sulfatado extraído da alga gracilaria domingensis: atividade anti-inflamatória e antinociceptiva [recurso eletrônico] Rafael da Silva Prudêncio. – 2023.

1 Arquivo em PDF.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal doDelta do Parnaíba, 2023.

Orientação: Prof. Dr. André Luiz dos Reis Barbosa

1. Algas. 2. Gracilaria domingensis. 3. Inflamação. 4. Nocicepção. 5.Biopolímeros. I. Título.

CDD: 589.3

RAFAEL DA SILVA PRUDÊNCIO

POLISSACARÍDEO SULFATADO EXTRAÍDO DA ALGA *Gracilaria domingensis*:
ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA

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

Aprovada em: 06/ 02/ 2023

BANCA EXAMINADORA

André Luiz dos Reis Barbosa

Prof. Dr. André Luiz dos Reis Barbosa
Universidade Federal do Delta do Parnaíba

Diva de Aguiar Magalhães

Profa. Dra. Diva de Aguiar Magalhães
Pesquisadora PDCTR – Universidade Federal do Delta do Parnaíba

Tarcísio Vieira de Brito

Prof. Dr. Tarcísio Vieira de Brito
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí – FAPEPI

“Diante da vastidão do tempo e da imensidão do universo, é um imenso prazer para mim dividir um planeta e uma época com você.”

(Carl Sagan)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por sua graça em me proporcionar força, saúde e motivação para seguir em frente e transpor os obstáculos impostos na jornada da vida e assim alcançar os meus objetivos de forma satisfatória.

Aos meus pais Francisco José e Evanilde, por nunca me negar educação, por me incentivar e pelos sábios conselhos, importantes em todas as etapas da minha vida.

Ao meu professor orientador Dr. André Luiz dos Reis Barbosa, pela oportunidade de realizar este trabalho. Sempre um incentivador, paciente e disponível em esclarecer todas as dúvidas.

Ao meu amigo Tarcísio Vieira de Brito, pelos incentivos para voltar à pesquisa.

A todo grupo do Laboratório de Fisiologia-Farmacologia Experimental (LAFEX): Ana Clara, André Carvalho, Antônio Kleiton, Danyela Maria, Denise Mayara, Diva, Fernando, Jayro, João Janilson, José Simião, Maria, Stefany, Viviane e Tino Marco pelas parcerias.

À Universidade Federal do Delta do Parnaíba (UFDP) e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, em especial aos professores do programa, impreterivelmente, que contribuíram na transmissão de conhecimentos e efetivos ensinamentos.

A instituição de fomento à pesquisa Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

A todos meus familiares e amigos que sempre torcem por mim. Em especial a tia Edinilda por ser uma segunda mãe, tia Maria, tia Navegantes, tia Maria dos Santos, minha prima Joelma por toda força na caminhada, minhas irmãs Michele, Jania e Maria pelo carinho e aos amigos Emerson Bruno Castro, Renata Reis, Cleiane Lima e Rodson Correia pelo apoio e motivação na caminhada.

A Dra Raíssa e ao técnico Jeferson, pelo auxílio no biotério da UFDP com os animais utilizados nas pesquisas.

A todos os técnicos da coordenação de laboratórios, pelas gentilezas e paciência, em especial Beatriz, César, Juelina, Gabriela, Cláudia e Paulinha.

A Prof. Dra. Leiz Veras, pelo suporte na utilização dos equipamentos da sala de multiusuários sempre que solicitado.

RESUMO

Algas marinhas são fontes naturais de polissacarídeos sulfatados (PLS), biopolímeros da matriz extracelular que possuem propriedades farmacológicas. Os PLSs de algas vermelhas do gênero *Gracilaria* possuem ações biológicas capazes de atenuar componentes do processo inflamatório incluindo edema, citocinas, migração celular e dor. Por esse motivo, estes bioprodutos encontrados na biodiversidade regional, constituem uma alternativa à abordagem terapêutica anti-inflamatória convencional. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial anti-inflamatório e antinociceptivo do PLS extraído da espécie *Gracilaria domingensis* em modelo animal. Inicialmente, foi feita a coleta da alga e extração do PLS com subsequente registro no patrimônio genético com o nº A00BA4D. O trabalho também obteve aprovação da Comissão de Ética em Uso Animal (CEUA) com o nº 480/018. Posteriormente, foram realizados os estudos farmacológicos em camundongos swiss fêmeas (25-30 g), sendo divididos em grupo de 6 animais. Os animais foram tratados com o PLS de *G. domingensis* nas doses de 2,5; 5 ou 10 mg/Kg por via intraperitoneal e submetidos ao edema de carragenina com a finalidade de se obter a melhor dose com efeito anti-inflamatório. Em seguida, foram induzidos os edemas de histamina, serotonina, bradicinina, prostaglandina E₂ (PGE₂) e composto 48/80, assim como foi induzida a peritonite nos camundongos e o líquido peritoneal foi avaliado quanto à migração de leucócitos, mensuração da atividade da mieloperoxidase (MPO) e dos níveis de glutatona (GSH) e malondialdeído (MDA). Os animais ainda foram submetidos a testes nociceptivos por agentes químicos (ácido acético 0,6% e formalina 2,5%). Como resultados obtidos, a dose de 10 mg/kg demonstrou uma redução significativa ($p < 0,05$) do edema de pata induzido por carragenina em relação às outras doses testadas, bem como também atenuou de modo significativo ($p < 0,05$) os edemas dos agentes inflamógenos histamina, serotonina, bradicinina, PGE₂, composto 48/80. Além disso, o PLS apresentou capacidade de diminuir de maneira significativa ($p < 0,05$) a migração de leucócitos, os níveis de MPO e MDA, e preservou os níveis de GSH no exudato peritoneal dos animais que sofreram peritonite. A melhor dose do PLS mostrou ação antinociceptiva no teste de contorção abdominal e no teste da formalina. Assim, os resultados obtidos permitem inferir que o PLS extraído da *G. domingensis* na dose de 10 mg/kg possui efeito anti-inflamatório e antinociceptivo.

Palavras-chave: Inflamação, Nocicepção, Biopolímeros, *Gracilaria domingensis*.

ABSTRACT

Marine algae are natural sources of sulfated polysaccharides (PLS), extracellular matrix biopolymers that have pharmacological properties. PLSs from red algae of the genus *Gracilaria* have biological actions capable of attenuating components of the inflammatory process including edema, cytokines, cell migration and pain. For this reason, these bioproducts found in regional biodiversity constitute an alternative to the conventional anti-inflammatory therapeutic approach. Thus, the present study aimed to evaluate the anti-inflammatory and antinociceptive potential of PLS extracted from the *Gracilaria domingensis* species in an animal model. Initially, the seaweed was collected and the PLS extracted with subsequent registration in the genetic heritage with the number A00BA4D. The work was also approved by the Committee on Ethics in Animal Use (CEUA) under number 480/018. Subsequently, pharmacological studies were carried out in female Swiss mice (25-30 g), divided into groups of 6 animals. The animals were treated with *G. domingensis* PLS at doses of 2.5; 5 or 10 mg/Kg intraperitoneally and subjected to carrageenan edema in order to obtain the best dose with an anti-inflammatory effect. Then, histamine, serotonin, bradykinin, prostaglandin E2 (PGE2) and compound 48/80 edemas were induced, as well as peritonitis in mice and the peritoneal fluid was evaluated for leukocyte migration, measurement of myeloperoxidase activity (MPO) and glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) levels. The animals were also submitted to nociceptive tests by chemical agents (0.6% acetic acid and 2.5% formalin). As results obtained, the dose of 10 mg/kg demonstrated a significant reduction ($p<0.05$) of the paw edema induced by carrageenan in relation to the other tested doses, as well as significantly attenuated ($p<0.05$) edema from the inflammatory agents histamine, serotonin, bradykinin, PGE2, compound 48/80. In addition, PLS showed the ability to significantly decrease ($p<0.05$) leukocyte migration, MPO and MDA levels, and preserved GSH levels in the peritoneal exudate of animals that suffered peritonitis. The best dose of PLS showed antinociceptive action in the abdominal writhing test and in the formalin test. Thus, the results obtained allow us to infer that PLS extracted from *G. domingensis* at a dose of 10 mg/kg has an anti-inflammatory and antinociceptive effect.

Keywords: Inflammation, Nociception, Biopolymers, *Gracilaria domingensis*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Processo inflamatório e os cinco sinais cardinais da inflamação.....	16
Figura 2 - Etapas da cascata de migração de neutrófilos.....	20
Figura 3 – Via da nocicepção	32
Figura 4 - Aspecto macroscópico da alga marinha vermelha <i>G. domingensis</i> e sua classificação taxonômica	38
Figura 5 - Alga do gênero <i>Gracilaria</i> e estruturas químicas de dissacarídeos sulfatados com fração estrutural responsáveis pelos possíveis efeitos biológicos	39
Figura 6 - Atividade antiedematogênica do PLS- <i>G. domingensis</i> sobre o edema de pata induzido por vários agentes inflamatórios	48
Figura 7 - Atividade antiedematogênica de PLS- <i>G. dominigensis</i> na contagem total de leucócitos e na contagem diferencial de neutrófilos	51
Figura 8 - Efeito de PLS- <i>G. domingensis</i> sobre a atividade da MPO no exsudato peritoneal.....	52
Figura 9 - Efeito de PLS- <i>G. domingensis</i> sobre a dosagem dos níveis de MDA no exsudato peritoneal	53
Figura 10 - Efeito de PLS- <i>G. domingensis</i> sobre a dosagem dos níveis de GSH no exsudato peritoneal	54
Figura 11 - Efeito de PLS- <i>G. domingensis</i> sobre as contorções abdominais induzidas por ácido acético	55
Figura 12 - Efeito de PLS- <i>G. domingensis</i> sobre o tempo de reatividade no teste de formalina.....	56
Figura 13 - Mecanismo de ação do PLS- <i>G. domingensis</i>	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atividade anti-inflamatória do polissacarídeo sulfatado de <i>G. domingensis</i> em edema de pata induzido por carragenina.....	47
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

β	- Beta
δ	- Delta
μg	- Micrograma
μm	- Micrometro
5-HT	- 5- hidroxitriptamina (Serotonina)
AA	- Ácido araquidônico
AAS	- Ácido acetilsalicílico
AINEs	- Anti-inflamatório não esteroidais
ANOVA	- Análise de Variância
CEUA	- Comissão de Ética no Uso
Cg	- Carragenina
CGRP	- Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CONCEA	- Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
COX	- Cicloxigenase
E.P.M.	- Erro Padrão da Médio
ECP	- Proteína catiônica eosinofílica
EDN	- Neurotoxina derivada de eosinófilos
EPO	- Peroxidase eosinofílica
GSH	- Glutathione
i.p.	- Intraperitoneal
IFN- γ	- Interferon gama
IgE	- Imunoglobulina E
IL	- Interleucina
LX	- Lipoxinas
MAPK	- Proteína quinase ativada por mitógenos
MBP	- Proteína básica principal
MDA	- Malondialdeído
MHC II	- Complexo de histocompatibilidade de classe II
MPO	- Mieloperoxidase
NF-κB	- Fator de transcrição nuclear Kappa B
p	- Nível de significância
PAF	- Fator de ativação de plaquetas
PGD₂	- Prostaglandina da série D ₂
PGE₂	- Prostaglandina da série E ₂
PGI₂	- Prostaglandina da série F do tipo 2
PG	- Prostaglandina
PLS	- Polissacarídeo sulfatado
PMN	- Polimorfonucleares
rpm	- Rotações por minuto
TNF-α	- Fator de necrose tumoral alfa
TX	- Tromboxano
UI	- Unidades Internacionais
v.o.	- Via oral
VCAM-1	- Molécula de adesão vascular
vs	- Versus

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
2.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1	Fisiopatologia da inflamação	16
2.1.1	Células envolvidas na inflamação	18
2.1.2	Mediadores da inflamação.....	24
2.1.3	Aminas e peptídeos vasoativos	25
2.1.4	Metabólitos do ácido araquidônico	26
2.1.5	Estresse oxidativo	28
2.1.6	Dor inflamatória	29
2.1.7	Terapia anti-inflamatória padrão.....	32
2.2	Algas marinhas e suas aplicações biológicas.....	34
2.3	Potencial farmacológico de algas da espécie <i>Gracilaria domingensis</i>	37
3.	OBJETIVOS	40
3.1	Objetivo geral.....	40
3.2	Objetivos específicos.....	40
4.	MÉTODOS	41
4.1	Coleta da alga vermelha <i>G. domingensis</i>	41
4.2	Animais e procedimentos éticos	41
4.3	Ensaio para avaliação do efeito anti-inflamatório	41
4.3.1	Edema de pata induzido por carragenina.....	42
4.3.2	Edema de pata induzido por diferentes agentes flogísticos: histamina, 5-HT, bradicinina, PGE ₂ e composto 48/80	42
4.3.3	Ensaio de peritonite	43
4.3.3.1	Análise da migração de leucócitos	43
4.3.3.2	Análise da atividade da enzima MPO	43
4.3.3.3	Análise dos níveis de GSH	44

4.3.3.4 Análise dos níveis de MDA	44
4.4 Ensaios para avaliar o potencial antinociceptivo	44
4.4.1 Teste de contorção abdominal induzida por ácido acético	44
4.4.2 Teste da formalina	45
4.5 Análise estatística	45
5. RESULTADOS	46
5.1 Atividade antiedematogênica do PLS- <i>G. domingensis</i> em edema de pata induzido por carragenina	46
5.2 Atividade antiedematogênica do PLS- <i>G. domingensis</i> sobre o edema de pata induzido por diferentes agentes flogísticos: histamina, 5-HT, bradicinina, PGE ₂ e composto 48/80	47
5.3 Atividade anti-inflamatória do PLS- <i>G. domingensis</i> sobre a contagem total de leucócitos e diferencial de neutrófilos na peritonite induzida por carragenina.....	50
5.4 Atividade antiedematogênica do PLS- <i>G. domingensis</i> sobre a atividade da MPO no fluido peritoneal.....	52
5.5 Atividade antioxidante do PLS- <i>G. domingensis</i> sobre a peroxidação lipídica por dosagem de MDA no exsudato peritoneal	52
5.6 Atividade antioxidante do PLS- <i>G. domingensis</i> sobre o estresse oxidativo por dosagem de GSH no exsudato peritoneal	53
5.7 Atividade antinociceptiva do PLS- <i>G. domingensis</i> na contorção abdominal induzida por ácido acético	54
5.8 Atividade antinociceptiva do PLS- <i>G. domingensis</i> no teste de formalina	55
6. DISCUSSÃO	57
7. CONCLUSÃO.....	66
8. REFERÊNCIAS	67
ANEXO 1	80

1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais e seus derivados são fontes expressivas para novas drogas, isso pode ser notado pelo fato que, nas últimas décadas as principais drogas que tem surgido, tem como origem as plantas, animais, microrganismos ou organismos marinhos (NEWMAN & CRAGG, 2020). Pesquisas concentradas no estudo de compostos de macroalgas e suas caracterizações já revelaram um grande número de propriedades biológicas significativas de seus metabólitos secundários. Esses biometabólitos possuem plasticidade que traz vantagens de defesa para as algas em ambientes com condições extremas, característica que faz dessas moléculas de defesa bioquimicamente ativas alvos de interesse para terapêutica de diversas patologias (ROCHA; SECA; PINTO, 2018; ROSA *et al.*, 2020; VERÍSSIMO *et al.*, 2021; NAGAMALLA, 2022).

Dentre os metabólitos bioativos sintetizados por algas marinhas, os polissacarídeos sulfatados vem chamando atenção por estarem envolvidos em diversos processos celulares e por apresentarem diversas ações farmacológicas eficientes, incluindo atividade antiviral (RAPOSO *et al.*, 2013; NAGLE *et al.*, 2020), antibacteriana (WASSIE *et al.*, 2021); antidiabético (YE *et al.*, 2019), antiaterosclerótica (HUWAIT; AL-SAEDI; MIRZA, 2022), anticâncer (PRADHAN *et al.*, 2020), antioxidante e anti-inflamatória (BRITO *et al.*, 2016; JÚNIOR *et al.*, 2020).

Os polissacarídeos de algas vermelhas estão entre os mais atraentes polímeros com atividades biológicas, estes componentes da matriz intercelular apresentam características valiosas (embora não exclusivas) que fazem deles candidatos favoritos a bioativos naturais, tais como propriedades físico-químicas (peso molecular e cadeia de conformação), compostos que apresentam baixo risco de contaminação por partículas virais por serem de origem não-animal e toxicidade relativamente mínima (TALARICO *et al.*, 2005; MUHAMAD *et al.*, 2019). Neste contexto, PLS de algas vermelhas do gênero *Gracilaria*, que são amplamente distribuídas ao longo da costa do litoral brasileiro, tem sido implicado em inúmeras ações farmacológicas, dentre as quais estão bem documentadas as atividades anti-inflamatórias e antinociceptivas (CHAVES *et al.*, 2013; JÚNIOR *et al.*, 2020).

Uma espécie deste gênero que é facilmente encontrada em nossa biodiversidade marinha, são as algas da espécie *Gracilaria domingensis*, no entanto, a respeito de atividades biológicas que podem ser utilizadas como potencial terapêutico, existe ainda até o momento, uma carência de estudos que demonstre o seu potencial farmacológico.

O ser humano em algum momento da vida passa pela experiência de episódios inflamatórios, que se trata de um mecanismo evolutivo para combater ameaças sempre presentes de infecções ou restaurar a função normal nos casos de eventos lesivos, promovendo a cura. Contudo, a inflamação está envolvida em um número significativo de doenças que requerem tratamento farmacológico. Nesse sentido, para inibir ou atenuar o processo inflamatório, são comumente utilizados medicamentos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e anti-inflamatórios esteroidais (AIEs), porém o uso prolongado e abusivo de AINEs, que recebem destaque por serem fármacos de venda livre e por isso são mundialmente os mais consumidos, podem desencadear sérios efeitos adversos, como osteoporose, complicações cardiovasculares, gastrointestinais, hepática e renal. Consequentemente, essas reações adversas associadas ao uso de AINEs provocam impactos na vida do usuário por prejudicar o seu bem estar físico e social, levando as pessoas a procurar com mais frequência a rede pública de saúde ou se isolarem de suas atividades sociais (OLIVEIRA *et al.*, 2019; ROMAINÉ; LOUREIRO; SILVA, 2021).

Alternativamente, tem sido utilizado produtos naturais como opção para o tratamento de distúrbios inflamatórios. Os compostos derivados de plantas tem mostrado serem capazes de ativar a resposta tanto celular quanto humoral do sistema imune através de vários efeitos imunomoduladores. A literatura científica tem publicizado que compostos vegetais são capazes de inibir a migração leucocitária, secreção de citocinas, liberação de histamina, proliferação e diferenciação de linfócitos (SOUSA *et al.*, 2018; VAN WEELDEN *et al.*, 2019; MESQUITA *et al.*, 2021).

Com base nas propriedades biológicas fortemente evidenciadas de algas do gênero *Gracilária* e na importância de organismos marinhos da biodiversidade regional como fonte para descoberta de novos medicamentos que sejam utilizados em distúrbios inflamatórios, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial anti-inflamatório e antinociceptivo do polissacarídeo extraído da espécie de alga vermelha *Gracilária domingensis*, até então inexplorado.

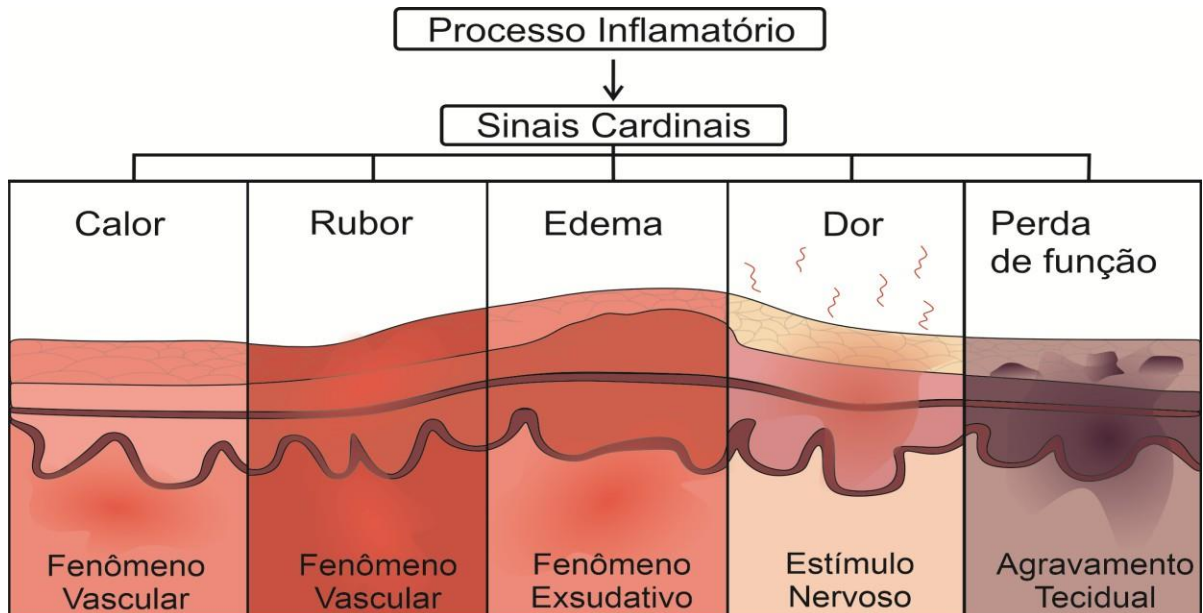
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Fisiopatologia da inflamação

A inflamação é um componente complexo e necessário da resposta de um organismo a estímulos biológicos, químicos e/ou físicos. Essa capacidade dos seres vivos em responder defensivamente a esses estímulos é essencial para a sobrevivência (GERMOLEC *et al.*, 2018). A resposta inflamatória caracteriza-se morfológicamente pela saída de líquidos e de células do sangue para o interstício, e representa um dos componentes mais importantes da execução da resposta imunitária. Porém, embora faça parte dos mecanismos defensivos, em muitos casos ela própria pode também causar danos ao organismo (OLIVEIRA *et al.*, 2019).

A descrição clássica da inflamação (Figura 1) surgiu por meio da observação visual. Partindo das alterações observadas, Celsius (30 a.C. – 38 d.C.) propôs quatro sinais que caracterizam a inflamação, isto é, vermelhidão (rubor), calor, inchaço (tumor) e dor. Muitos anos depois, Virchow (1821-1902), descreveu o quinto sinal clássico da inflamação, que é a perda de função do órgão ou tecido inflamado (TRACY, 2006).

Figura 1 - Processo inflamatório e os cinco sinais cardinais da inflamação



Fonte: Autoria própria, 2023.

No geral, a inflamação é descrita como constituindo-se em fases aguda e crônica, embora haja sobreposição entre esses processos. A resposta inflamatória aguda é a reação imediata do organismo frente a um estímulo, em que componentes moleculares e celulares são direcionados ao local da lesão em um processo dinâmico e vital ao organismo.

(PANIGRAHY, 2021). Arquitetada para proteger o hospedeiro contra a ameaça de infecção patogênica ou lesão, a inflamação aguda atua de forma localizada e limitada para iniciar a remoção de danos e restaurar a homeostase tecidual (AGHASAFARI *et al.*, 2019).

A fase aguda caracteriza-se por dilatação vascular e aumento da permeabilidade capilar, seguido por aumento do fluxo sanguíneo e o recrutamento de leucócitos, incluindo neutrófilos, monócitos, macrófagos e linfócitos. Estas células migram por meio de um gradiente quimiotático para o local da lesão de forma cuidadosamente orquestrada mediado por citocinas e proteínas de fase aguda. Dependendo do grau de lesão, esta fase pode ser suficiente para resolver qualquer dano (SERHAN, 2017; SERHAN; LEVY, 2018).

A inflamação persistente devido a uma exposição prolongada a estímulos inflamatórios ou uma reação inadequada a moléculas próprias, pode levar à fase crônica, na qual populações de células imunes mudam para um fenótipo mononuclear, resultando em dano tecidual e fibrose. Além disso, a inflamação crônica contribui para inúmeras doenças incluindo artrite, asma, aterosclerose, doenças autoimunes, diabetes, e câncer, e às condições de envelhecimento (CASTANHEIRA & KUBES, 2019).

O processo inflamatório envolve uma série de eventos que se iniciam com o reconhecimento da agressão, seguido da liberação de mediadores inflamatórios que induzem modificações na microcirculação para a saída de plasma e de leucócitos dos vasos, concomitantemente ocorrem estímulos para reparar os danos produzidos (SUN *et al.*, 2021).

As agressões são reconhecidas por meio de moléculas existentes no agente agressor ou geradas pela atividade deste em componentes do hospedeiro. As moléculas existentes em patógenos que podem ser reconhecidas pelo organismo recebem o nome de PAMP (padrão molecular associado patógeno), enquanto as resultantes de alterações em moléculas do organismo ou de estresse metabólico por agressões diversas são denominadas DAMP (padrão molecular associado ao dano). O conjunto formado pelos padrões PAMP e DAMP é denominado alarmina, moléculas de alarme ou moléculas sinalizadores de agressão. A combinação da molécula padrão com os receptores de reconhecimentos de padrões (PRRs) presentes nas superfícies de fagócitos ou solúveis no sangue e fluídos extracelulares, fornecem um sinal de perigo que alerta o sistema imunológico e estimula uma série de ações pró-inflamatórias e antimicrobianas contra invasores estranhos (ZINDEL & KUBES, 2020; SUN *et al.*, 2021).

2.1.1 Células envolvidas na inflamação

As células envolvidas na inflamação podem ser residentes no tecido no qual houve a injúria como os mastócitos e macrófagos, ser constituintes de tecido como as células endoteliais ou ser como as plaquetas e os leucócitos, que após serem ativados, tem acesso a área da inflamação a partir do sangue (ALESSANDRI *et al.*, 2013).

Quando ocorre um processo inflamatório, leucócitos podem migrar a partir da corrente sanguínea para o tecido lesado, esta passagem do sangue para o tecido é chamada de diapedese, processo essencial para a respostas inflamatória. Este grupo celular é diversificado e após ser recrutado para os locais de lesão tecidual, ali passam a agir na captura, na eliminação de patógenos invasores, na fagocitose de resto de tecidos e na produção de citocinas e anticorpos (ABDULKHALEQ *et al.*, 2018).

Os neutrófilos, também referidos comumente como polimorfonucleares (PMNs) por possuírem núcleos com natureza lobulada, são a população leucocitária predominante no sangue humano. Estas células são os principais atores do sistema imunológico inato, atuam como mediadores celulares primários coordenando o início, a propagação e a resolução da inflamação. Em seus núcleos são encontrados grânulos que podem conter uma variedade de enzimas, peptídeos, e proteínas, além de espécies reativas de oxigênio que podem ser liberadas rapidamente deste compartimento celular. Algumas moléculas que se encontram nesse compartimento servem para digerir e destruir microrganismos ou materiais estranhos após a fagocitose, porém estas moléculas podem ser liberadas dos grânulos, danificam o tecido do hospedeiro, intensificando assim o processo inflamatório e a produção de radicais livres (MARGRAF; LOWELL; ZARBOCK, 2022).

Os neutrófilos ativam-se rapidamente em resposta a estímulos inflamatórios e migram da circulação para os locais de inflamação atravessando o endotélio dos vasos sanguíneos. O processo de migração de neutrófilos ocorre por quimiotaxia, no qual eles são atraídos até o sítio inflamatório seguindo um gradiente químico, fenômeno específico e altamente regulado que envolve quatro etapas fundamentais: captura, rolamento, adesão e a transmigração da célula (MICHAEL & VERMEREN, 2019). Para que estas etapas ocorram são necessários a ação de moléculas de adesão presentes nas membranas dos neutrófilos e nas células endoteliais que se encaixam de maneira complementar, bem como, a ação de fatores quimiotáticos, como por exemplo as quimiocinas, que contribuem para o direcionamento do processo de recrutamento (PETRI & SANZ, 2018).

A cascata inicial de recrutamento de neutrófilos é desencadeada por alterações na superfície das células endoteliais como resultado da ação de mediadores inflamatórios, a exemplo de citocinas inflamatórias (TNF- α , interleucina IL-1 β), histamina e dos leucotrienos, que são liberados por leucócitos residentes nos tecidos que se encontram lesionados ou infectados. Além disso, as células endoteliais também podem ser ativadas diretamente por patógeno, através do reconhecimento por receptores do tipo PRR, ou ainda por produtos intracelulares resultantes do dano tecidual. Após ativação do endotélio ocorre a expressão de selectinas nas células endoteliais onde são expressados dois tipos, a P-selectinas, que é previamente produzida e armazenada nos corpos de Weibel-Palade, e as E-selectinas. Um terceiro tipo de selectina, as L-selectinas, são expressas pelos leucócitos (KOLACZKOWSKA & KUBES, 2013; CHU *et al.*, 2018).

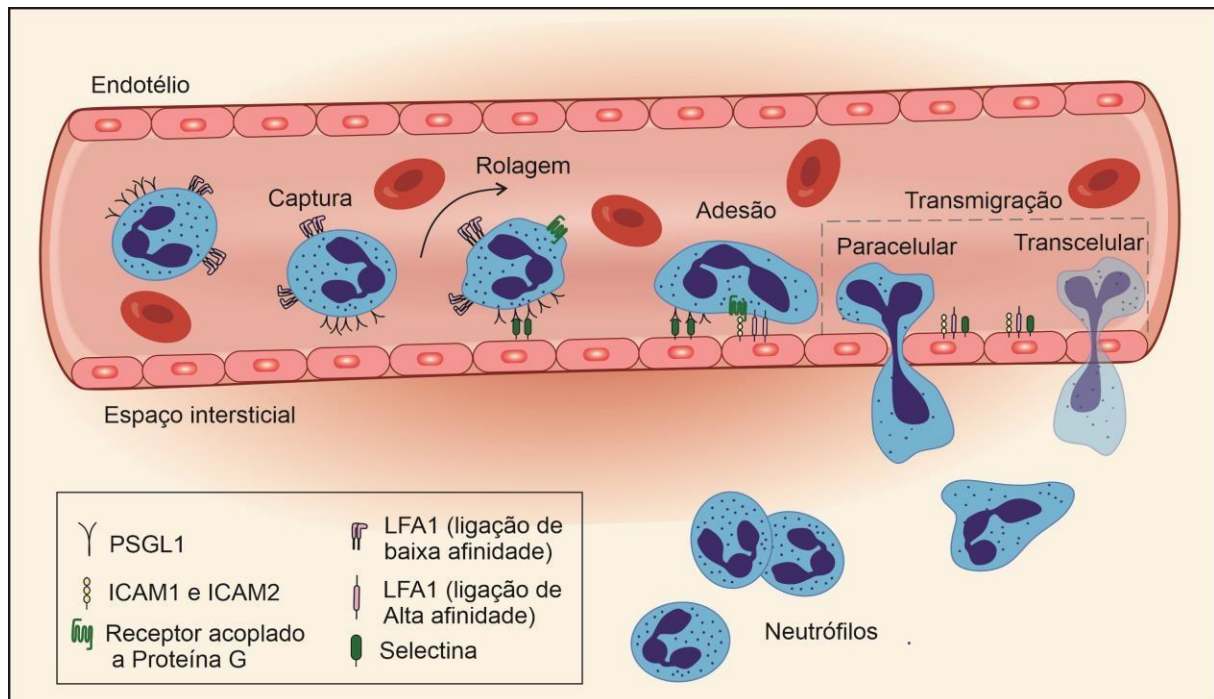
Essas moléculas de adesão maximizam o recrutamento por meio da interação com ligantes glicosilados expressos tanto nos neutrófilos quanto no endotélio, a exemplo da glicoproteína P-selectina-1 (PSGL1), molécula de adesão intercelulares-1 (ICAM-1), molécula de adesão da célula vascular-1 (VCAM-1), molécula de adesão celular endotélio-plaqueta-1 (PECAM-1). As selectinas estão localizadas nas extremidades das vilosidades da membrana das células, após a captura, a força que o fluxo sanguíneo exerce sobre a parede do endotélio faz com que a ligação selectina-ligante, que é uma ligação de baixa afinidade, seja constantemente desfeita e refeita. Esse processo permite que as células deslizem ao longo do endotélio vascular, reduzindo a velocidade com que elas percorrem o vaso, completando a etapa de rolamento (CHU *et al.*, 2018; LEW & KUBES, 2019).

O processo de rolagem de neutrófilos desencadeia uma ativação adicional em razão da interação de neutrófilos com quimiocinas presentes na superfície do endotélio. À medida que as células rolam e se aproximam do foco inflamatório, o padrão de expressão de moléculas de adesão muda e as integrinas passam a assumir esse processo. Quando os leucócitos entram em contato com as quimiocinas depositadas na superfície do endotélio, as L-selectinas são clivadas através da ação de enzimas e a célula passa a expressar moléculas de alta afinidade conhecidas como integrinas, notoriamente o antígeno associado à função linfocitária-1 (LFA-1) e antígeno de macrófago (MAC-1) (PULIKKOT *et al.*, 2022).

Na etapa final ocorre a transmigração, que pode acontecer por duas vias, normalmente as células rastejam sob o endotélio vascular à procura de um local adequado para transmigração por entre as células epiteliais, essa rota é conhecida como paracelular. No entanto, a transmigração pode ocorrer através da via transcelular, neste processo a célula epitelial envolve o neutrófilo através de projeções semelhantes a microvilosidades, formando

uma espécie de cúpula. Por essa segunda rota os neutrófilos necessitam da ajuda das integrinas PECAM-1, ICAM-1, LFA-1 e MAC-1 para atravessar a barreira de células endoteliais (Figura 2) (FILIPPI, 2016; FILIPPI, 2019).

Figura 2 - Etapas da cascata de migração de neutrófilos



Fonte: Hordijk, 2022.

Ao chegar no local da inflamação, os neutrófilos são eficientes em conter e erradicar os patógenos invasores. Para isso, os neutrófilos ativados utilizam diferentes mecanismos de defesa para conter e eliminar o agente agressor com a finalidade de manter a integridade do organismo. Dentre os mecanismos que estas células utilizam estão a fagocitose, a degranulação e a liberação de armadilhas extracelulares de neutrófilos denominadas de NETs (NAUSEEF & BORREGAARD, 2014). Os NETs são filamentos de cromatina e DNA nuclear liberados no meio extracelular agregadas a proteases de neutrófilos como a elastase e moléculas antimicrobianas como histonas, bem como outras moléculas tóxicas que matam patógenos. Essas armadilhas foram desenvolvidas pelos neutrófilos a fim de aumentar a eficácia de capturar patógenos circulantes no sangue e são ativadas sob condições de cisalhamento (PAPAYANNOPOULOS, 2018).

Outros mecanismos de defesa importantes culminam com a liberação de enzimas e agentes microbicidas como a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a enzima mieloperoxidase (MPO). Os neutrófilos produzem EROs pela ativação da enzima NADPH

oxidase, também chamada de oxidase de fagócitos, que ao oxidar a NADPH reduz o oxigênio em ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$). Dentro do lisossomo e fagolisossomo o $O_2^{\bullet -}$ é convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) devido a dismutação espontânea. O H_2O_2 isolado não tem uma ação bactericida eficiente, mas ao formar um sistema de haletos com a MPO forma um poderoso microbicida. A mieloperoxidase na presença de haletos como o cloreto (Cl^-), converte o H_2O_2 em ácido hipocloroso ($HClO$), que tem ação semelhante aos alvejantes domésticos. O hipoclorito é um potente agente antimicrobiano, destrói os microrganismos por halogenação ou oxidação de proteínas e lipídeos. A MPO como produto de neutrófilos pode ser usada para avaliar a gravidade da inflamação. (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2018; GERMOLÉC *et al.*, 2018).

A composição do infiltrado de leucócitos varia de acordo com o tempo da resposta inflamatória e com o tipo de estímulo. Na inflamação aguda, as células predominantes no infiltrado inflamatório, na maioria dos estímulos, são os neutrófilos que podem ser encontrados durante as 6 primeiras horas podendo migrar até as 24 horas após o início do estímulo, após esse tempo são substituídos por monócitos (KRATOFIL *et al.*, 2022).

Os monócitos são leucócitos circulantes no sangue que não proliferam em estado normal. No entanto, estas células demonstram importância na imunidade inata e adaptativa, atuando principalmente na defesa imunológica, inflamação e remodelação tecidual. Durante a inflamação extravasam da circulação sanguínea para os tecidos inflamados seguindo o paradigma geral da cascata do recrutamento de leucócitos. Nos tecidos, são as células precursoras das células apresentadoras de antígenos profissionais, macrófagos e células dendríticas, que ao se diferenciar nestas, são capazes então, de resolver a inflamação e facilitar reparação de feridas (YÁÑEZ *et al.*, 2017).

Os monócitos expressam diferentes perfis de citocinas ao longo do curso inflamatório, no início os níveis mais elevados são de $IL-\beta$ e $TNF-\alpha$, enquanto ao longo do curso de cicatrização de feridas expressam $TGF-\beta$ (transformando o fator de crescimento beta) e VEGF (vascular fator de crescimento endotelial), congruente com um efeito mais reparador (KRATOFIL; KUBES JUSTIN, 2016). Esses leucócitos também tem a capacidade de limpar os detritos celulares e contribuir para a deposição de colágeno na área lesada, além de ser um efector microbicida exterminando agentes patogênicos através da fagocitose, produção de EROs, óxido nítrico, MPO e citocinas inflamatórias (SAMPATH *et al.*, 2018; KRATOFIL *et al.*, 2022).

Macrófagos são células residentes de tecidos e são derivados de monócitos circulantes. Representam uma população de células imunes dedicadas à fagocitose, processo pelo qual as

células ingerem e destroem partículas estranhas, seja uma célula danificada ou morta, uma bactéria ou qualquer outro corpo estranho (GINHOUX & GUILLIAMS, 2016; GUILLIAMS *et al.*, 2020). Os macrófagos são amplamente presentes no corpo, equipados com capacidade de sentir e responder a alterações nos locais onde se encontram, desempenham importantes funções homeostáticas e de resistência à invasão de patógenos (OKABE & MEDZHITOV, 2016).

Presentes em diferentes tecidos, estas células polarizam-se de acordo com a mudança no seu ambiente, formando diferentes subtipos de macrófagos, os classicamente ativados M1 e os alternativamente ativados M2 (MARTINEZ & GORDON, 2014; TSAI *et al.*, 2022). Os macrófagos M1 são capazes de respostas pró-inflamatórias devido a estímulos de produtos microbianos como LPSs ou TNF- α e IFN- γ e produzem fatores pró-inflamatórios como IL-1, IL-6, IL-12. Em contraste, os macrófagos M2 são capazes de respostas anti-inflamatórias e reparo de tecidos danificados devido a estímulo de citocinas IL-4 e IL-13. Em tecidos infectados, os macrófagos são primeiro polarizados para o fenótipo pró-inflamatório M1 para auxiliar o hospedeiro contra patógenos. Posteriormente, os macrófagos são polarizados para formar uma resposta anti-inflamatória ao fenótipo M2 e reparar o tecido danificado. A regulação da polarização de macrófagos desponta como um aspecto chave para o sucesso da função imunológica. Além disso, produzem níveis elevados de arginase, fibronectina e proteínas associadas a matriz, mostrando assim que os macrófagos são essenciais para início, propagação e resolução do processo inflamatório (WANG *et al.*, 2019; YUNNA *et al.*, 2022).

Dentre os componentes celulares da resposta inflamatória detentores de grânulos citoplasmáticos tem-se ainda os basófilos e mastócitos, seus grânulos servem como reservatórios para mediadores solúveis que atuam em muitos aspectos no curso da inflamação. Reagentes na fase inicial, os mastócitos, são ativados por meios de processos mediados por IgE e por meio de outros processos que não requer participação de IgE, como via de receptores toll-like, citocinas, substância P, composto 48/80 (C48/80), dentre outros estímulos, que levam a ativação de mastócitos iniciando uma cascata de vias de sinalização que eventualmente levam à degranulação e liberação rápida de grânulos pré-formados, contendo histamina e β -hexosaminidase, B-glucuronidase, amiloidase, e quimase. Eles também secretam e liberam produtos do metabolismo do ácido araquidônico (prostaglandinas e leucotrienos) que mediam a vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular característicos da resposta vascular aguda (GERMOLEC *et al.*, 2018).

A secreção do fator ativador de plaquetas (PAF) pelos mastócitos também pode levar ao aumento da permeabilidade e, ao mesmo tempo, estimula a ativação e agregação

plaquetária, resultando na ativação de neutrófilos, cumprindo o seu principal papel na imunidade inata que é recrutar neutrófilos, que podem aumentar a defesa do hospedeiro ou pode levar a imunopatologia (HUANJIN *et al.*, 2020). Assim como nos monócitos, basófilos também possuem receptor Fc3RI de alta afinidade para IgE, portanto, são células importantes na alergia. Uma vez que ocorra a ligação de IgE com esses receptores há a liberação de histamina, mediadores lipídicos e uma variedade de moléculas biologicamente ativas (HAMEY *et al.*, 2020).

Os eosinófilos são granulócitos diferenciados que circulam no sangue periférico e se alojam em vários tecidos do corpo. Possuem relevância na imunidade não só pelo seu tradicional envolvimento em processos alérgicos e em infecções helmínticas, mas também por estarem envolvidos em diversos processos patológicos inflamatórios como nos distúrbios autoimunes (esofagite eosinofílica, gastroenterite eosinofílica, pneumonia eosinofílica aguda), cânceres sólidos e hematológicos. Em seus grânulos são encontradas proteínas catiônicas que são capazes de induzir lesão tecidual como a proteína básica principal (MBP), proteína catiônica eosinofílica (ECP), peroxidase eosinofílica (EPO) e neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN). Suas características biológicas e comportamento fisiológico incluem síntese e expressão de quimiocinas, citocinas, conteúdo granular e armadilhas extracelulares, que por intermédio destas podem modular as funções de outros leucócitos, por exemplo, podem expressar o complexo de histocompatibilidade de classe II (MHC II) e moléculas co-estimuladoras, processando antígenos e estimulando células T a proliferar e produzir citocinas de forma antígeno-específica (BOZZA *et al.*, 2020; WECHSLER *et al.*, 2021; FOLCI *et al.*, 2021).

Embora a inflamação seja geralmente analisada sob a perspectiva da infiltração tecidual, as células endoteliais vasculares têm um papel importante nesses processos, alterando seus fenótipos para apoiar as várias fases do processo inflamatório. As propriedades das células do endotélio mudam durante a transição da inflamação aguda para crônica e durante a transição da imunidade inata para a adaptativa. Mediadores que atuam nas células endoteliais também agem sobre os leucócitos e vice-versa. As células endoteliais tem função ativa na inflamação, por secretarem óxido nítrico, que promove vasodilatação, aumento da liberação de plasma e de células sanguíneas para a área da inflamação (STURTZEL, 2017; DALAL; MULLER; SULLIVAN, 2020).

2.1.2 Mediadores da inflamação

A resposta inflamatória é mediada por componentes químicos, rigidamente controlados, que possuem funções específicas na coordenação de início e evolução das reações inflamatórias (PANIGRAHY *et al.*, 2021). Os componentes químicos são substâncias biológicas que derivam de proteínas do plasma, células residentes no tecido agredido ou secretados por outras células. Os mediadores inflamatórios que derivam do plasma tem como principal fonte o fígado e estão presentes em formas precursoras, como o sistema complemento e o sistema cinina, que para adquirir suas propriedades biológicas precisam ser ativadas através de uma série de clivagens proteolíticas. Os macrófagos locais liberam NO e citocinas no local inflamado. Mediadores de origem celular estão contidos em grânulos intracelulares, os quais precisam ser secretados, como a histamina, serotonina e enzimas lisossomais, estas moléculas são as primeiras a atuar na resposta inflamatória, pois se encontram pré-formados em grânulos secretórios. A histamina é produzida por mastócitos, basófilos e plaquetas; a serotonina encontrasse pré-formada nas plaquetas e as enzimas lisossomais são produzidas pelas células fagocitárias como neutrófilo e macrófago. Depois de instaurada a inflamação, os leucócitos e células endoteliais produzem e secretam os subprodutos do ácido aracdônico, as prostaglandinas e leucotrienos (SERHAN; LEVY, 2018; POLUHA; GROSSMANN, 2018; FEEHAN; GILROY, 2019; MEIZLISH *et al.*, 2021).

A maioria dos mediadores agem por meio de ligação com receptores específicos, outros por meio de ação enzimática direta ou por meio de danos devido à geração de radicais livres. Juntos, os mediadores da inflamação orquestram todos os eventos inflamatórios, como dilatação dos vasos sanguíneos, permeabilidade vascular, migração de leucócitos para o tecido afetado e dor. Além disso, podem desencadear uma cascata capaz de gerar ampliação, com formação de mais mediadores. No entanto, a maioria dos mediadores tem meia-vida curta, deteriorando-se rapidamente, sendo inativados por enzimas ou inibidos por inibidores (ABDULKHALEQ *et al.*, 2018; BESEDOVSKY; LANGE; HAACK, 2019).

Os mediadores inflamatórios podem ser classificados de acordo com às suas propriedades bioquímicas. Dentre os principais grupos de mediadores, incluem-se: aminas vasoativas (histamina e serotonina); proteases plasmáticas (sistema de cinina-bradicinina, sistema complemento, sistema coagulação-fibrinolítico); metabólitos do ácido araquidônico (via ciclo-oxigenase e lipo-oxigenase); proteases lisossômicas; radicais livres derivados do oxigênio; fatores ativadores de plaquetas (PAF); quimiocinas e citocinas (ABDULKHALEQ *et al.*, 2018; SUGIMOTO *et al.*, 2019).

2.1.3 Aminas e peptídeos vasoativos

As aminas vasoativas são as primeiras substâncias a serem liberadas durante a ativação da cascata da inflamação. Elas têm papel importante no processo inflamatório, uma vez que tem a capacidade de causar contração do músculo liso, vasodilatação e permeabilidade vascular. As principais aminas vasoativas com esta capacidade são histamina e serotonina (GALVÃO et al., 2018).

Aminas vasoativas podem atuar sinergicamente com peptídeos, como a bradicinina, induzindo a elevação do extravasamento de líquidos para o espaço intercelular, gerando edema (tumor), hiperemia (rubor) e elevação da temperatura (calor) e ainda participam de processos de nocicepção no local da inflamação. Estes eventos, associados com a liberação de quimiocinas, estimulam a migração de leucócitos para o sítio da inflamação (RANKIN, 2004; MEDZHITOV, 2008).

A histamina apresenta uma natureza dicotômica, sendo capaz de promover respostas inflamatórias e regulatórias que contribuem para processos patológicos, e igualmente, pode atuar em funções homeostáticas. Na inflamação desempenha papel importante, causando vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. Essa molécula vasoativa é liberada principalmente por mastócitos, onde se encontra pré-formada nos grânulos mastocitários, mas também pode ser encontrada em outras células em menor percentual como basófilos, plaquetas e neurônios. A liberação desse mediador ocorre pela degranulação dos mastócitos em resposta a vários estímulos, por exemplo, lesão física, frio, calor, anticorpos ligados aos mastócitos, fragmentos do complemento (anafilatoxinas C3a e C5a), proteínas de liberação da histamina derivadas dos leucócitos, neuropeptídeos (substância P), citocinas (IL-1, IL-8) e compostos 48/80 (CASTELO BRANCO *et al.*, 2018).

Os efeitos pleiotrópicos da histamina ocorrem por meio de sua ligação com quatro subtipos de receptores histamínicos específicos (H1, H2, H3 e H4) associados à proteína G. A ativação e inativação desses receptores coexistem em equilíbrio. O receptor H1 é expresso em vários tipos de células, tais como neurônios, células endoteliais, medula adrenal, células musculares, hepatócitos, condrócitos, monócitos, neutrófilos, eosinófilos, células dendríticas, células T e células B. A sinalização por meio de H1 resulta na síntese de prostaciclina, ativação do fator plaquetário, síntese de óxido nítrico, ácido araquidônico e seus metabólitos, tromboxano e contração das células musculares lisas. Além disso, a ativação de H1 leva ao aumento da quimiotaxia de eosinófilos e neutrófilos no local da inflamação, maior capacidade funcional das células apresentadoras de antígenos (APCs) e ativação de linfócitos Th1

(JUTEL; BLASER; AKDIS, 2006; O'MAHONY; AKDIS; AKDIS, 2011; SARASOLA *et al.*, 2021). O receptor H2 estimula a secreção gástrica, enquanto que o receptor H3 está localizado no SNC e periférico e inibe a liberação e síntese de histamina, e o receptor H4 estimula a quimiotaxia de eosinófilos e mastócitos (BEERMANN *et al.*, 2015; SCHIRMER & NEUMANN, 2021).

A serotonina, conhecida também como 5-hidroxitriptamina (5-HT), é um metabólito do triptofano, que além de ser um importante neurotransmissor, desempenha papel na modulação do processo inflamatório com ações semelhantes às da histamina (LIU *et al.*, 2021). Este mediador vasoativo está presente nos mastócitos de algumas espécies como rato e camundongo, porém nos seres humanos, encontra-se pré-formada nas plaquetas e células da mucosa gastrointestinal (BANSKOTA; GHIA; KHAN, 2019). A serotonina tem uma importante atribuição na alteração do tônus e permeabilidade vascular, o que contribui para o extravasamento de fluídos. A 5-HT age como um poderoso agente estimulante das terminações nervosas sensitivas para dor e prurido, além disso, produz rubor, um dos sinais cardinais da inflamação, tendo como possível explicação para esse fato, a constrição venosa com consequente aumento no enchimento capilar (SEPIASHVILI; BALMASOVA; STAURINA, 2013; SHAJIB & KHAN, 2015; WU *et al.*, 2019).

A bradicinina é um peptídeo vasoativo clivado do cininogênio por uma enzima proteolítica, a calicreína. Na inflamação, a bradicinina, juntamente com as prostaglandinas e a histamina, são mediadores da vasodilatação, na qual relaxa o músculo liso arteriolar e, por sua vez, aumenta o fluxo sanguíneo. Esse aumento do fluxo sanguíneo causa rubor e calor características do processo inflamatório. A bradicinina, juntamente com a prostaglandina E₂ (PGE₂), também desempenha um papel na sensibilização das terminações nervosas sensoriais, que causa a dor, outro componente do processo inflamatório. Assim, no processo de inflamação, a bradicinina causa aumento da vasodilatação, aumento da permeabilidade e aumento da dor (HOFMAN *et al.*, 2016; QADRI & BADER, 2018; CHOI & HWANG, 2018; PIRAHANCHI & SHARMA, 2022).

2.1.4 Metabólitos do ácido araquidônico

Os mediadores lipídicos são moléculas orgânicas liberadas no processo inflamatório por meio da ação de enzimas, que quando ativadas, clivam fosfolipídeos constituintes da membrana celular para formar esses mediadores lipídicos (CALDER, 2020). As fosfolipases (A, C, D) hidrolisam tais fosfolipídeos da membrana e liberam ácido araquidônico (AA), após

estímulos mecânicos, químicos e físicos ou outros mediadores. Uma vez na forma livre, o AA pode ser rapidamente metabolizado por vários complexos multienzimáticos, formando produtos intermediários oxigenados. Através da atividade das enzimas ciclo-oxigenases (COXs) dá origem a formação de prostaglandinas (PGs), prostaciclina (PIs) e tromboxanos (TXs), enquanto que por meio das lipo-oxigenases (LOXs) levam à síntese dos leucotrienos e lipoxinas e outros compostos. Os produtos derivados do metabolismo do AA são conhecidos coletivamente como eicosanóides e geralmente não tem atuação a distância do local de sua produção (ação endócrina) pois são rapidamente metabolizados no próprio local da síntese ou no pulmão e fígado (ROGÉRIO; SORGI; SADIKOT, 2015; NORE *et al.*, 2020; YAMAGUCHI; BOTTA; HOLINSTAT, 2022).

As prostaglandinas mais importantes são as que apresentam duas duplas ligações (PG₂), dentre as quais PGD₂, PGI₂ (prostaciclina), PGE₂ e TXA₂ (tromboxano) tem papel de destaque. São geradas pelas ações de duas ciclo-oxigenases chamadas COX-1 e COX-2. A COX-1 é expressa constitutivamente na maioria dos tecidos desempenhando funções homeostática (principalmente no trato gastrointestinal), não apresenta o protagonismo na resposta a estímulos inflamatórios mesmo quando expressa. Em contraste, a COX-2 é induzida por estímulos inflamatórios e, portanto, gera as PGs que estão envolvidas nas reações inflamatórias, por isso, na maioria dos tecidos normais a COX-2 está ausente ou apresenta baixa concentração (MITCHELL & KIRKBY, 2019).

As prostaglandinas atuam em várias células e produzem uma vasta gama de efeitos, assim, PGD₂ é o maior produto da via COX em vários tipos de células, incluindo macrófagos, células dendríticas e mastócitos ativados, PGI₂ é sintetizada principalmente em células endoteliais onde produz efeitos antiagregadora plaquetária e vasodilatadora, PGE₂ é sintetizado em muitos tipos diferentes de células, principalmente em macrófagos com atividades vasodilatadora, controla a atividade de linfócitos, citoprotetora e algigênica e TXA₂ é o principal produto da via da COX em plaquetas com ação de agregante plaquetário e potente vasoconstritor (RICCIOTTI & FITZGERALD, 2011; YAO & NARUMIYA, 2019; CHENG *et al.*, 2021).

De modo geral, os eicosanóides produzidos a partir do AA participam de vários processos fisiológicos e fisiopatológicos, nas respostas inflamatórias age modulando por meio da quimiotaxia de leucócitos, sobre a produção e liberação de outros mediadores lipídicos e peptídicos. Sendo potentes mediadores pró-inflamatórios, os eicosanóides e a sua supressão tem sido um importante alvo terapêutico (CUI & JIA, 2021; JAGUSCH; BAUMEISTER; POHNERT, 2020; JAGUSCH ET *et al.*, 2021; ROBB *et al.*, 2020).

2.1.5 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo refere-se à produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas células e tecidos, manifestando-se quando o sistema antioxidante do organismo não é capaz de neutralizá-los. Normalmente o corpo produz espécies reativas de oxigênio, porém em quantidades limitadas, sendo compostos importantes envolvidos na regulação de processos que envolvem a manutenção da homeostase celular e funções como transdução de sinal, expressão e ativação de receptores. No entanto, o desequilíbrio nos mecanismos de proteção pode ocasionar lesão nas estruturas celulares ao causar danos de moléculas como DNA, proteínas e lipídios (RAMOS-GONZÁLEZ *et al.*, 2021; MORRIS *et al.*, 2022).

No processo de respiração celular durante o metabolismo oxidativo são produzidos EROs e peróxidos orgânicos. Em condições hipóxicas, é produzido o óxido nítrico (NO) durante a reação em cadeia respiratória. O NO é uma espécie reativa de nitrogênio (ERNs) que pode levar a mais produção de espécies reativas, como aldeídos reativos, malondialdeído (MDA) e 4-hidroxinonenal. A superprodução de EROs e ERNs notadamente em um período prolongado de tempo pode causar danos a estrutura e funções celular, uma vez que, os principais alvos do estresse oxidativo são proteínas, lipídios e moléculas de DNA/RNA, e modificações nessas moléculas podem aumentar as chances de mutagênese. Assim, a produção excessiva de EROs nas células e tecidos pode ser deletério se não for removido rapidamente, podendo causar danos irreversíveis resultando em morte celular por processos necróticos e apoptóticos (HUSSAIN *et al.*, 2016; KARKUCINSKA-WIECKOWSKA *et al.*, 2022).

As espécies reativas produzidas durante o processo oxidativo no metabolismo ou por alguns produtos químicos naturais ou artificiais e agentes microbianos podem iniciar o processo inflamatório resultando em síntese e secreção de citocinas pró-inflamatórias. Essas espécies reativas induzem a ativação do fator nuclear kappa β , o que leva a síntese de fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e outros mediadores químicos. Além disso, oxidação de proteínas induz a liberação de moléculas sinalizadoras inflamatórias como peroxirredoxina 2 (PRDX2), esta proteína ubíqua dependente de estado redox, atua ativando macrófagos para produzir e liberar mediadores químicos (BLASER *et al.*, 2016).

A relação entre estresse oxidativo e inflamação tem sido exaustivamente evidenciadas, mostrando que o estresse oxidativo desempenha um papel patogênico nas doenças inflamatórias (KASSIANIDES; WHITE; BHANDARI, 2022). Em contrapartida, os sistemas biológicos contêm algumas defesas antioxidantes robustas que incluem um sistema

enzimático, como as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CAT), e outros sistemas não enzimáticos, como a glutathione (GSH). Estes sistemas fisiológicos atuam na eliminação de radicais livres, levando o organismo ao estado redox, protegendo a integridade das células e tecidos, evitando possíveis danos (CHATTERJEE, 2016; MARTINS; FONSECA; REBELO, 2021).

A enzima SOD é a primeira a combater os radicais livres, ela age dismutando o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2). As enzimas CAT e GPx se integram para impedir o acúmulo de H_2O_2 , que possibilita a geração do radical hidroxila ($OH^{\bullet}$), contra o qual não existe defesa enzimática. A GPx reduz o H_2O_2 à água por meio da conversão da glutathione reduzida (GSH) em oxidada (GSSG). Assim, é fundamental a ação da glutathione redutase, responsável pela recuperação da GSH, o que possibilita a manutenção da integralidade do ciclo redox da glutathione e, conseqüentemente, a eficácia do sistema de defesa enzimático (GUEDES *et al.*, 2022; SWITZER & FUKUTO, 2022).

2.1.6 Dor inflamatória

Uma das características fundamentais do estado inflamatório é que estímulos normalmente inócuos produzem dor. Essa sensação desagradável tem como função primária a proteção do organismo, sendo uma característica cardinal dos mecanismos protetores fisiológicos normais; inversamente, na cronicidade a dor não auxilia a sobrevivência. Apesar de ser uma reação complexa e de difícil definição, a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, 2017), criou o seguinte conceito para dor: uma experiência sensitiva e emocional desagradável associada, ou semelhante àquela associada, a uma lesão tecidual real ou potencial (AYDEDE, 2017; RAJA, *et al.*, 2020; DESANTANA *et al.*, 2020; LEE & NEUMEISTER, 2020). A experiência de dor apresenta uma conotação individual e sofre influências de experiências anteriores. Já o termo nocicepção refere-se somente a percepção de estímulos nocivos com a subsequente transmissão de informações codificadas para o sistema nervoso central, evocado pela ativação de receptores sensoriais especializados (os nociceptores) existentes no local da lesão, que fornecem informações sobre a lesão tecidual ocasionada por estímulos nocivos (ALCOCK, 2017).

Geralmente a dor é descrita em termos de gravidade (leve, moderada, grave), duração (aguda, crônica), e tipo (nociceptiva, inflamatória, neuropática). A percepção da dor ocorre através dos mecanismos de transdução, em que a transformação de um estímulo nódico mecânico, térmico ou químico ativa nociceptores; pela transmissão, por meio de um conjunto

de vias que permitem a propagação do impulso nervoso gerado ao nível de nociceptor chegar até o sistema nervoso central (SNC); e modulação de supressão da dor ativadas pelas próprias vias nociceptivas (BUENO JR & NEUMEISTER, 2020; FINNERUP; KUNER; JENSEN, 2021).

A transmissão da dor está associada à atividade elétrica nas fibras nervosas aferentes primárias que possuem terminações livres, estas estruturas livres são os nociceptores, encontrados no tecido periférico (pele, músculos, articulações, vísceras, conjuntivo dentre outros). Nos nociceptores existem sensores moleculares especializados variados expressos, como receptores acoplados à proteína G (GPCRs), canais potenciais de receptores transitórios (TRPA1, TRPV1), canais de sódio (Nav1.7 e Nav1.8), e mecanorreceptores (canais Piezo). Esses sensores não apenas detectam estímulos físicos, como lesões mecânicas e temperaturas nocivas (calor e frio), mas também pode detectar uma variedade de mediadores inflamatórios, incluindo bradicinina, prostaglandinas, citocinas. Além disso, os microRNAs também podem servir como mediadores da dor, bem como da coceira, uma sensação distinta que desencadeia o ato de coçar (MOORE *et al.*, 2018; HAN *et al.*, 2018; CHEN; DONNELLY; JI, 2020).

As fibras nervosas aferentes primárias podem ser amielinizadas ou mielinizadas. Tomando como características a estrutura, diâmetro e velocidade de condução estas fibras de primeira ordem são classificadas em três tipos: fibras C (ou tipo IV), fibras A- β , fibras A- δ (ou tipo III) (DAS, 2015; CHEN *et al.*, 2022).

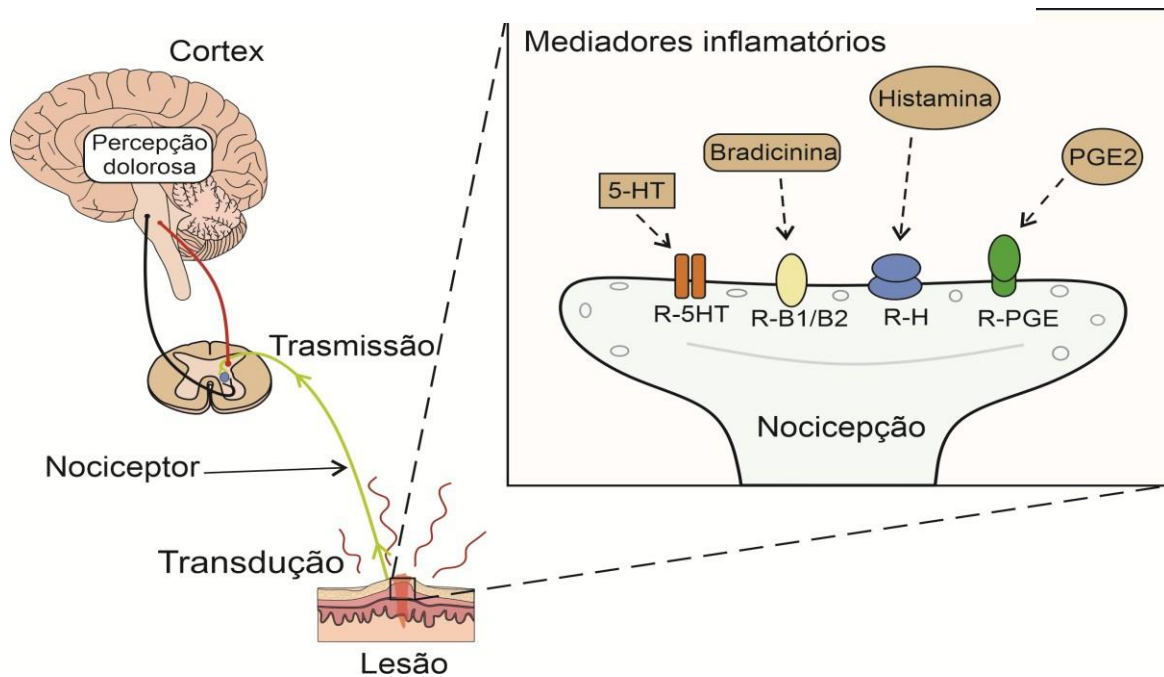
As fibras nervosas não mielinizadas são fibras C que possuem pequeno diâmetro (0,4–1,2 μm) e velocidade de condução que varia de 0,5 a 2,0 m/s. Estas fibras apresentam receptores termosensíveis (que respondem ao frio e ao calor), mecanonociceptores de baixo limiar e respondem a uma ampla variedade de estímulos (mecânicos, químicos, térmicos e isquêmicos), sendo, portanto, também denominados de nociceptores polimodais (HOEGH, 2022).

As fibras nervosas aferentes primárias mielinizadas são as fibras A- δ (2–6 μm), apresentam velocidade de 12 a 30 m/s. As fibras deste tipo transmitem informações de alta intensidade e baixa latência, promovendo a sensação dolorosa rápida da primeira fase da dor aguda, desencadeando o reflexo de retirada. As fibras A- δ dividem-se em dois grupos. O primeiro (tipo I), corresponde às fibras com receptores de limiar alto, que respondem a estímulos mecânicos de alta intensidade e a estímulos térmicos ou químicos de baixa intensidade. O segundo grupo (tipo II) apresenta receptores que são estimulados por altas temperaturas (45-53°C) e alguns receptores para frio intenso (- 15°C). Já as fibras nervosas A- β são finamente mielinizadas e possuem grande diâmetro (>10 μm), tem velocidade de

condução que varia entre 30 e 100 m/s e não propagam estímulos potencialmente nódicos em situações normais, além de estarem relacionadas à alodinia (PINTO *et al.*, 2019; SOPACUA *et al.*, 2019; TINNIRELLO; MAZZOLENI; SANTI, 2021).

Os componentes do sistema nervoso central da via de propagação de estímulos constituem conexões anatômicas particulares na medula espinhal, tronco encefálico, tálamo e córtex, conhecida como a “via da dor”, ligando o influxo sensorial gerado em fibras aferentes primárias com as partes do SNC responsável pela percepção consciente das sensações dolorosas. Neste sentido, os nociceptores coletam informações de estímulos nocivos que são transmitidos pelas fibras C e fibras A- δ através dos gânglios da raiz dorsal para as lâminas superficiais I/II do corno dorsal da medula espinhal. As fibras A- δ transmitem impulsos do corno dorsal para as lâminas mais profundas (III-IV) da medula espinhal e para centros superiores no cérebro através dos tratos espinotalâmicos (RINGKAMP; DOUGHERTY; RAJA, 2018; MCCARTNEY, 2018; BRUMMETT, 2018).

Após a lesão tecidual, os nociceptores no tecido afetado tornam-se sensibilizados devido à liberação de mediadores inflamatórios de células não neurais e neurais. A sensibilidade é causada por substâncias algogênicas produzidos por mastócitos, neutrófilos, plaquetas e fibroblastos presentes na área lesada. Substâncias algogênicas produzidas por estas células incluem bradicinina, histamina, serotonina, leucotrienos, prostaglandinas e tromboxana-A, citocinas, interleucinas dentre outras. Já os mediadores neuronais incluem principalmente a substância P (SP) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGPR), sendo estes mediadores neuronais liberados do pericário (corpo celular) para a periferia. Dependendo da natureza e concentração do mediador ele pode ativar diretamente o nociceptor ou reduzir seu limiar de ativação. Estas substâncias algogênicas sensibilizam os nociceptores e causam hiperalgesia e alodinia termomecânica primária e vasodilatação após lesões traumáticas, inflamatórias ou isquêmicas (Figura 3) (RAFFAELI & ARNAUDO, 2017; DI CARLO & SALAFFI, 2021).

Figura 3 – Via da nocicepção

Fonte: Adaptado de VASKAR, 2015; LEE & NEUMEISTER, 2020.

2.1.7 Terapia anti-inflamatória padrão

Hipócrates, considerado por muitos como sendo o pai da medicina, há aproximadamente 500 anos a.C. já escrevia relatos sobre o potencial da casca e das folhas de salgueiro na cura da dor e da febre (BINDU; MAZUMDER; BANDYOPADHYAY, 2020). Desde então, entusiastas da ciência trabalharam extensivamente e conduziram o desenvolvimento de drogas com a finalidade de impedir ou diminuir os efeitos indesejados da resposta inflamatória. Contudo, somente no século XIX, foi que a salicina e o ácido salicílico foram sintetizados a partir do salgueiro, culminando na prática clínica do ácido salicílico (AAS), o primeiro medicamento anti-inflamatório cientificamente divulgado na história da humanidade (MONTINARI; MINELLI; DE CATERINA, 2019).

As terapias anti-inflamatórias atualmente em uso incluem principalmente drogas esteroides e não esteroides. Ao contrário de seus efeitos colaterais, os hormônios esteroides glicocorticoides, que são versões sintéticas do cortisol natural, são frequentemente empregados para tratar uma variedade de distúrbios inflamatórios. Outra classe de drogas de escolha são as drogas não esteroides que visam principalmente a COX-2 e, portanto, a síntese de prostaglandinas, particularmente a PGE₂ (MANJU *et al.*, 2023).

Os efeitos terapêuticos e adversos dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) são devidos à inibição da enzima ciclo-oxigenase (COX). Os AINEs são classificados como inibidores não seletivos e seletivos de COX-2 (COXIBS), com base em sua extensão de seletividade para inibição da enzima COX. No entanto, independentemente de sua seletividade e extensa utilidade terapêutica, os AINEs são famosos por múltiplos efeitos colaterais graves, incluindo toxicidades gastrointestinais, riscos cardiovasculares, lesões renais e hepatotoxicidade, bem como hipertensão e outros distúrbios, muitas vezes provocados até mesmo por doses terapêuticas (FERRER *et al.*, 2019).

Em razão disso, nas últimas décadas a segurança dos AINEs comumente usados (celecoxibe, diclofenaco, ibuprofeno, nimesulida e naproxeno) tem atraído considerável atenção. Autoridades reguladoras de medicamentos, incluindo o FDA americana e a Agência de Medicamento Europeia tem alertado sobre efeitos graves provocados por AINEs em pessoas com doenças preexistentes como pacientes cardiovasculares, no entanto, estes fármacos ainda são os mais frequentemente usados (SCHJERNING; MCGETTIGAN; GISLASON, 2020).

Existe uma grande preocupação para a saúde pública, no que tange os efeitos graves provocados por AINEs na população mais velha, pois ao passo que uma pessoa vai envelhecendo, é maior a probabilidade de apresentarem um conjunto de condições clínicas, tais como doenças cardíacas e condições dolorosas crônicas, sendo necessário o uso concomitantemente de fármacos assim como o seu uso prolongado. Além disso, em muitos países, alguns AINEs estão disponíveis ao longo do balcão em farmácias e podem ser vendidos sem receita, bem como podem ser encontrados em pontos de venda online, sem restrições nas quantidades que podem ser compradas e muitas vezes com nenhuma exigência para o varejista fornecer informações profissionais de aconselhamento aos consumidores (SCHMIDT *et al.*, 2016)

Embora as terapias anti-inflamatórias existentes possam ser eficazes, elas geralmente apresentam efeitos colaterais significativos, especialmente quando usadas por um longo período. Os produtos naturais têm sido usados há séculos na medicina tradicional e popular e podem ser mais seguros, com menos ou nenhum efeito colateral (DENG *et al.*, 2022; TASNEEM *et al.*, 2029; GANDHI *et al.*, 2021).

2.2 Algas marinhas e suas aplicações biológicas

As algas marinhas correspondem a um grupo com vários organismos fotossintetizantes, que se constituem como significativos recursos de origem natural, provendo alimento e abrigo para muitas espécies marinhas (MARINHO-SORIANO & CARNEIRO, 2021; TORRES *et al.*, 2019). Dependendo da pigmentação que apresentam, essas macroalgas podem ser classificadas em três grupos: algas verdes (Chlorophyceae), algas marrons (Phaeophyceae) e algas vermelhas (Rhodophyceae) (MARINHO-SORIANO & CARNEIRO, 2021). Segundo Belghit *et al.* (2017), essa classificação não ocorre somente pelo aspecto da coloração das algas, mas também por diferenças entre elas no que diz respeito aos metabólitos peptídicos gerados, composição de aminoácidos e de seus derivados.

Esse grupo de diversos organismos comumente estão inseridos em habitats com circunstâncias extremas e ainda assim não apresentam danos aparentes, fazendo com que uma grande diversidade de metabólitos secundários seja produzida, funcionando como um mecanismo de defesa. Deste modo, as algas marinhas apresentam plasticidade metabólica, que é tida como uma vantagem para o desenvolvimento de diversos metabólitos, como os polissacarídeos, as xantofilas, os compostos fenólicos, os tocoferóis, dentre outros (COTAS *et al.*, 2020; REN *et al.*, 2021).

Os polissacarídeos provenientes das algas marinhas correspondem a uma combinação de diversos constituintes formada por monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas do tipo 1,3 e 1,4, que se organizam dentro das células desses organismos ou entre elas. No que diz respeito às suas características, alguns possuem grupos sulfato que conferem grande viscosidade ou capacidade de se solidificarem, além de normalmente apresentam solubilidade em água (ZHONG *et al.*, 2020).

Deste modo, considerando sua composição rica em polissacarídeos e a intensa produção desses e outros metabólitos, atualmente as algas marinhas são utilizadas com várias finalidades. Por exemplo, são empregadas na indústria como fonte de matérias-primas na produção de diversos produtos como ágar, carragena e algina (VIEIRA *et al.*, 2018). Além de serem bastante utilizadas como fonte de alimento por populações de países de cultura oriental, como Japão, Coreia e China (TORRES *et al.*, 2019; MARINHO-SORIANO & CARNEIRO 2021), devido ao fato de algumas espécies de macroalgas apresentarem alto teor de proteínas e outros nutrientes essenciais em sua composição (VIEIRA *et al.*, 2018; MENAA *et al.*, 2020; BLEAKLEY; HAYES, 2017).

As algas vermelhas, pertencentes ao filo *Rhodophyta*, por exemplo apresentam um grande potencial econômico e industrial (GOUVEA, 2022), pois possuem em sua parede celular o ágar, um importante heteropolissacarídeo composto por pelo açúcar 3,6-anidro-1-galactose. Esse ágar apresenta características estabilizantes e de geleificação, sendo um potencial alvo para o desenvolvimento de produtos pela indústria e para o uso em experimentos (HYOUNG; LEE; HONG, 2020).

A maioria das espécies de algas desse filo são multicelulares, possuem vida marinha livre (GOUVEA, 2021; TRIGUEIRO *et al.*, 2017) e produzem vários outros metabólitos que possuem diversas aplicações no ramo de alimentos, fertilizantes, cosméticos, ração animal e de biotecnologia. Ademais, as substâncias biologicamente ativas encontradas nessas algas podem ser utilizadas no desenvolvimento de compostos medicinais, sendo empregadas na produção de fitoterápicos, antifúngicos, suplementos, dentre outros (GOUVEA, 2022; TORRES *et al.*, 2019; MARINHO-SORIANO & CARNEIRO 2021).

Desse modo, ao observar as propriedades biológicas e as vantagens das algas marinhas para a saúde humana, a comunidade científica passou a se empenhar em estudar e explorar componentes presentes em sua composição (SANTOS *et al.*, 2019). Além disso, considerando que o atual tratamento de diversas doenças é pautado no uso de medicamentos que causam significativos efeitos colaterais, percebeu-se a necessidade de buscar terapias farmacológicas eficazes e com menos efeitos secundários (MOTA; VIGO; KUCHENBECKER, 2019; GOES *et al.*, 2020).

Neste cenário, as algas marinhas constituem-se como uma alternativa viável e inovadora para a extração de substâncias, com vistas ao desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento de várias doenças (SHIKOV *et al.*, 2020). Entre essas substâncias está a variedade de polissacarídeos presentes em sua composição, em especial os polissadcarídeos sulfatados, que são os responsáveis pela maioria das atividades biológicas dessas algas. Pois, devido a sua composição, são capazes de comunicar-se com várias proteínas de células e outros componentes do organismo (TANNA E MISHRA, 2019).

No que diz respeito às atividades biológicas atribuídas às algas marinhas, Jesus e colaboradores (2019) relataram as ações antimicrobianas e antifúngicas de compostos proveniente de algas vermelhas, principalmente o éter bis-bromofenol (BDDE), isolado de *Polyopes lancifolius*, e de compostos Bromo-1H-indole, isolado de *Laurencia* sp. Cicinskas *et al.* (2020), por sua vez, estudaram o efeito antitumoral e imunotrópico in vitro de carrageninas extraídas de *Chondrus armatus* (alga vermelha) e de seus produtos de degradação de baixo

peso molecular, demonstrando possuírem, respetivamente, efeito antimetabólico e citostático sobre células cancerosas (tipos KYSE30 e FLO1) de esôfago humano.

Adicionalmente, o estudo de Machado (2019) com a carragena extraída de algas vermelhas demonstrou que elas também possuem atividade anti-inflamatória, por meio de mecanismos regulatórios nos macrófagos e da estimulação do sistema imune humano. Além disso, Sami, Ahmad e Fatma (2021) também estudaram as propriedades da carragena de algas vermelhas das espécies *Chondrus*, *Gigartina*, *Hypnea* e *Eucheuma*, e constatarem que ela possui importante ação antiviral, interferindo na ligação ou incorporação de alguns tipos de vírus nas células. Esses autores demonstraram ainda a ação antiviral dos galactanos, polissacarídeos extracelulares compostos por cadeias lineares de galactoses, extraídos das espécies *Agardhiella tenera*, *Callophyllis variegata* e *Schizymenia binderiformis*.

Costa (2014), estudou o potencial anti-inflamatório e antinociceptivo de uma fração de polissacarídeo sulfatado extraído *Gracilaria intermedia*, por meio de modelos experimentais de inflamação e nocicepção. Como resultado o PLS demonstrou possuir alta ação anti-inflamatória, conseguindo atuar de forma inibitória em mediadores inflamatórios, e apresentou atividade analgésica em dois dos três testes realizados. Adicionalmente, Santos (2015) também fez testes com espécies do gênero *Gracilaria* e, como resultados, a espécie *G. smithsoniensis* destaou-se pela sua promissora atividade antioxidante e ausência de toxicidade.

Ainda se tratando de atividades biológicas das algas vermelhas, a pesquisa de Aziz *et al.* (2020), aborda sobre os efeitos antiviral, antitumorais, pró-cicatrizantes, anti-ulcerigênicos, anti-diabêtes, anti-obesidade, anti-hiperlipêmico, anti-inflamatórios, antioxidantes, laxativos e purgativos apresentados por polissacarídeos (principalmente as agarans, alginato, carragena, laminaran, naviculan e fucan) extraídos de algas vermelhas. Além disso, a pesquisa de Tsolaki (2020) sobre Alzheimer, relatou o efeito neuroprotetor *in vitro* e *in vivo* da homotaurina, uma substância aminossulfonato proveniente de algumas espécies de algas vermelhas.

Santos *et al.* (2019) relataram as atividades biológicas dos compostos fenólicos, especialmente os florotaninos presentes principalmente nas macroalgas marrons. Entre esses florotaninos o dieckol, eckol, fucodiphlorethol G e o floroglucinol extraídos da *Ecklonia cava* apresentaram atividade antioxidante. Já o dieckol extraído de *Ecklonia kurome* apresentou importante atividade bactericida. O florofurofuroeckol-A, por sua vez, apresentou atividade anti-inflamatória. Além disso, esses autores destacaram ainda as atividades antialérgicas, anti-alzheimer, anti-proliferativa e anti-obesidade dos florotaninos extraídos dessas algas.

Bensednova e colaboradores (2020) demonstraram o efeito gastroprotetor dos fucoidanos (polissacarídeos complexos extremamente sulfatados) e dos ácidos alginínicos (polissacarídeos aniônicos) extraídos de algas marrons. Eles constataram que esses PLSs possuem características extruturais que causam um efeito pleiotrópico, agindo na modulação da expressão de genes que codificam citocinas anti e pró-inflamatórias, atuando também sobre as moléculas de adesão, NF-kB e em espécies reativas de nitrogênio e oxigênio. Estabelesendo-se como candidatos promissores no desenvolvimento de medicamentos para o tratamento de indivíduos acometidos com doenças inflamatórias intestinais.

Ademais, Yuan *et al.* (2020) por meio do seu estudo sobre polissacarídeos extraídos de espécies de microalgas verde do gênero *Chlorella*, destacaram suas ações antioxidante, antitumoral, anti-hiperlipêmica, neuroprotetora, imunomoduladora e antiasmática. Em paralelo, Suzuki e Terasawa (2020) relataram sobre os efeitos antitubercóticos e antivirais *in vitro* e *in vivo* do extrato do PLS sulfato de *Rhamnus* proveniente da alga verde *Monostroma nitidum*.

2.3 Potencial farmacológico de algas da espécie *Gracilaria domingensis*

A espécie *Gracilaria domingensis* é uma macroalga vermelha, agarófita, pertencente ao gênero *Gracilaria* e a ordem *Gracilariales* (Figura 5), sendo amplamente distribuída nas zonas entremarés do Atlântico Ocidental tropical e subtropical. Seu talo achatado pode crescer em torno de 30 centímetros e, embora seja classificada como alga vermelha, pode apresentar diferentes pigmentações (TRIGUEIRO *et al.*, 2017; GOUVEA, 2021). Estes organismos marinhos possuem uma diversidade química ímpar, são constituídos de esqueletos de carbono bem distintos daqueles encontrados em plantas terrestres, constituídos com compostos como bromofenóis e aminoácidos tipo micosporina (MAAs, do inglês *Mycosporine-like Amino Acids*) (GUIMARÃES; PLASTINO; OLIVEIRA, 1999; NAKAMURA-GOUVEA *et al.*, 2022).

Figura 4 - Aspecto macroscópico da alga marinha vermelha *G. domingensis* e sua classificação taxonômica



Filo: Rhodophyta
 Subfilo: Eurhodophytina
 Classe: Florideophyceae
 Subclasse: Rhodymeniophycidae
 Ordem: Gracilariales
 Família: Gracilariaceae
 Gênero: *Gracilaria*
 Nome Botânico: *Gracilaria domingensis*

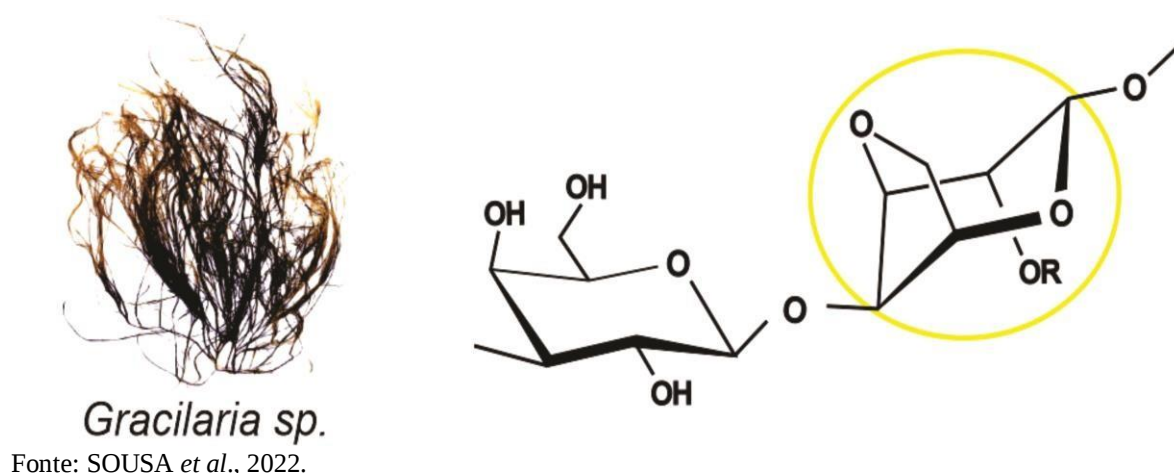
Fonte: Soares, 2015/AlgaeBase, 2023.

Essa macroalga possui grande importância econômica devido à presença de ágar (ficocolóide) em sua composição e também ao fato de ser bastante utilizada como fonte alimentar humana, sendo geralmente consumida em sua forma *in natura* (TRIGUEIRO *et al.*, 2017). Além disso, as algas *G. domingensis* contém polissacarídeos sulfatados, que são constituintes de parede celulares e a partir deles se obtém o ágar. O ágar é uma mistura de diferentes polissacarídeos sendo cerca de 70% de agarose e 30% de agarpectina. A agarose é formada pela estrutura básica da agarobiose, enquanto a agarpectina são os polissacarídeos formados pela agarobiose substituída normalmente por sulfato e piruvato (JIÃO; ZHANG; EWART, 2011).

Os polissacarídeos sulfatados de algas, como já mencionado, são uma fonte de inúmeras atividades biológicas que podem apresentar benefícios terapêuticos. Além disso, o modo como esses polissacarídeos são rearranjados, parece ter significativa importância para as diferentes bioatividades atribuídas a esses compostos, como por exemplo, maior teor de enxofre pode implicar em maior atividade antiviral. Alguns estudos descrevem aspectos biológicos e aplicações biotecnológicas de extratos de *G. domingensis*, dentre as atividades biológicas foram relatadas ação antibacteriana e antioxidante (LIMA-FILHO *et al.*, 2002; AROKIARAJAN *et al.*, 2022; ELBANDY, 2022).

No entanto, ainda existe uma escassez de estudos que demonstrem outras atividades biológicas desta espécie de alga, dentre os quais, os efeitos biológicos que podem ser utilizados como tratamentos alternativos para diferentes distúrbios inflamatórios e antinociceptivos, como bem demonstrados por outros PLSs de algas do gênero *Gracilária*, em que os numerosos componentes do processos inflamatórios, incluindo edema, citocinas, recrutamento de células imunológicas, dor de origem inflamatória podem ser aliviados através do tratamento com estes compostos extraídos de algas deste gênero. Além disso, existe uma semelhança da estrutura química e dos locais de sulfatação, como mostrados na Figura 5, que pode ser uma das razões para tais efeitos (SOUSA *et al.*, 2022.). Diante de tais evidências é crucial que se investigue também o potencial anti-inflamatório e antinociceptivo da *Gracilária domingensis*. Podendo este bioproduto da biodiversidade regional, vir a ser uma alternativa à abordagem terapêutica anti-inflamatória convencional.

Figura 5 - Alga do gênero *Gracilaria* e estruturas químicas de dissacarídeos sulfatados com fração estrutural responsáveis pelos possíveis efeitos biológicos



3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial anti-inflamatório e antinociceptivo do polissacarídeo sulfatado extraído da alga vermelha *G. domingensis*.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar a atividade antiedematogênica do PLS da *G. domingensis* nos modelos de edema de pata induzidos por carragenina, histamina, serotonina, bradicinina, PGE₂ e composto 48/80;
- Analisar a atividade do PLS da *G. domingensis* sobre a migração leucocitária por meio da concentração da enzima MPO, bem como por contagem total e diferencial no exsudato peritoneal nos animais submetidos a peritonite;
- Analisar a atividade do PLS da *G. domingensis* sobre os parâmetros de estresse oxidativo através da dosagem dos níveis de GSH e MDA no exudato peritoneal nos animais submetidos a indução de peritonite;
- Analisar o efeito antinociceptivo do PLS da *G. domingensis* através do modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético;
- Analisar o efeito antinociceptivo do PLS da *G. domingensis* nas duas fases do teste de lambida de pata induzida por formalina.

4. MÉTODOS

4.1 Coleta da alga vermelha *G. domingensis*

Exemplares de algas da espécie *G. domingensis* foram coletadas na Praia do Coqueiro, situada no município de Luis Correia, Piauí, Brasil (coordenadas: 02°51,1'S e 041°38,7'W), durante os meses de janeiro a outubro de 2021. As coletas manuais foram realizadas no período de entre marés, orientando-se com auxílio da tábua de marés. As amostras foram conduzidas ao Laboratório Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia – Biotec, da Universidade Federal do Delta do Parnaíba - UFDPAr, onde foi realizada a extração do PLS de acordo com Yoshimura (2006) e posterior caracterização.

O trabalho foi desenvolvido de acordo com a Lei nº 13.123, de 20 de maio de 2015, regulamentada pelo decreto nº 8.772, de 11 de maio de 2016 com acesso ao patrimônio genético e ao seu conhecimento tradicional associado, com o número de registro: A00BA4D.

4.2 Animais e procedimentos éticos

Para os experimentos foram utilizados camundongos da espécie Swiss, fêmeas, pesando em média 25 a 30 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Piauí (UFPI). Nos ensaios foram utilizados um número de 6 animais por grupo (n=6) que foram mantidos em ambiente com temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro/escuro (12/12h) controlados. Todos os tratamentos e procedimentos realizados foram de acordo com o Guia de Cuidado em Uso de Animais do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Além disso, no presente trabalho a eutanásia foi realizada ao final de cada experimento utilizando uma dose letal de Quetamina (240 mg/kg) combinada com Xilazina (30 mg/kg), obedecendo os princípios e normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) de acordo com a resolução normativa nº 37 de 15.02.2018. A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFDPAr aprovou os experimentos sob protocolo Nº 480/018 (Anexo I).

4.3 Ensaios para avaliação do efeito anti-inflamatório

Para a avaliação da atividade anti-inflamatória do PLS-*G. domingensis* foram utilizadas as técnicas de edema de pata induzida por carragenina, histamina, serotonina, bradicinina, PGE₂, composto 48/80. Além disso, foi realizado peritonite com determinação de

contagem total e diferencial de leucócitos, mensuração da enzima MPO, dosagem dos níveis de GSH e MDA no exsudato peritoneal.

4.3.1 Edema de pata induzido por carragenina

Nesse ensaio os camundongos foram divididos aleatoriamente em seis grupos (n = 6). O edema foi induzido por carragenina (500µg/pata) dissolvida em solução salina estéril (NaCl a 0,9%) administrada intraplantarmente (50µL) na pata direita traseira dos animais. Camundongos do grupo I (controle negativo) receberam injeção intraplantar com salina 0,9%. Os camundongos dos grupos II, III, IV foram pré-tratados por via intraperitoneal (i.p.) com 2,5; 5 ou 10 mg/kg de PLS respectivamente. Camundongos do grupo V foram pré-tratados com indometacina 10 mg/kg (controle referência). Trinta minutos posteriormente aos tratamentos, os camundongos receberam a suspensão de carragenina, sendo que o grupo VI recebeu somente o inflamógeno. As leituras do volume das patas foram realizadas antes das administrações das drogas (volume basal, Vo) e após meia hora depois das induções (1, 2, 3 e 4 horas – Vt), utilizando para medição o aparelho de pletismômetro (WINTER, 1962).

O efeito do pré-tratamento foi calculado como porcentagem de inibição do edema relativa ao volume da pata do grupo controle não tratado usando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de inibição do edema} = \frac{(Vt-Vo)_{\text{control}} - (Vt-Vo)_{\text{tratado}}}{(Vt-Vo)_{\text{control}}} \times 100$$

Ao término deste ensaio, o efeito anti-inflamatório de cada concentração foi avaliado, e a concentração com melhor resposta de inibição de edema foi utilizada na realização dos experimentos subsequentes.

4.3.2 Edema de pata induzido por diferentes agentes flogísticos: histamina, 5-HT, bradicinina, PGE₂ e composto 48/80

Para avaliar o efeito anti-inflamatório do PLS em edema de pata induzido por diferentes agentes inflamatórios, foram administradas aos grupos de animais (n = 6) injeções de 50 µl de histamina (100µg/pata), 5-HT (100µg/pata), bradicinina (6.0nmol/pata), PGE₂ (3nmol/pata) ou composto 48/80 (12 µg/pata) na pata traseira direita. Um grupo recebeu 50 µl de 0,9% de solução salina estéril e serviu como um grupo de controle não tratado. PLS (10 mg/kg) foi injetado i.p. 30 min antes das injeções intraplantar de agentes flogísticos. O volume da pata foi mensurado imediatamente antes das injeções e nos intervalos de tempo de

30, 60, 90 e 120 minutos por pletismometria (CAMPOS & CALIXTO, 1995; BARBOSA *et al.*, 2009; VASCONCELOS *et al.*, 2012).

4.3.3 Ensaio de peritonite

Para o ensaio de indução de peritonite, os camundongos foram separados em quatro grupos (n=6) e pré-tratados i.p. com solução salina estéril 0,9%, indometacina 10 mg/kg ou PLS 10 mg/kg. Meia hora mais tarde, os camundongos foram injetados com 250 µL de carragenana (500 µg/cavidade) na cavidade peritoneal. Camundongos injetados apenas com solução salina foram usados como controle negativo. Após 4 horas os camundongos foram eutanasiados e a cavidade peritoneal foi lavada com 1,5 ml de PBS para colher as células contidas no exsudato peritoneal (CHAVES *et al.*, 2013). Alíquotas do líquido peritoneal foram utilizadas para determinação da atividade da enzima MPO, executar as contagens de células totais e diferenciais e para análise dos níveis de GSH e MDA.

4.3.3.1 Análise da migração de leucócitos

As contagens totais e diferenciais foram feitas de acordo com o método descrito por Souza e Ferreira (1985). Na contagem de células totais foi realizado inicialmente o preparo da câmara de Neubauer, utilizando 20 µL do exsudato peritoneal diluído em 380 µL de reagente de Turk. A leitura da lâmina foi realizada com auxílio de microscópio óptico sob aumento de 40X e os resultados foram expressos como número total de leucócitos por cavidade.

Para a contagem diferencial de células (100 células totais) foram utilizadas alíquotas de 50 µL em lâminas coradas com corantes panópticos, a leitura foi realizada com auxílio de microscópio óptico com objetiva sob aumento de 40x. Os resultados foram apresentados como o número total de neutrófilos por mililitro de exsudato peritoneal.

4.3.3.2 Análise da atividade da enzima MPO

A MPO é uma enzima presente, predominantemente, nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e tem sido utilizada como um marcador quantitativo da infiltração de neutrófilos nos processos inflamatórios em vários tecidos. Os níveis da atividade de MPO no líquido peritoneal foram determinados por meio da técnica descrita por Bradley *et al.* (1982). Resumidamente, uma alíquota do exsudato peritoneal de animais foram centrifugado a 4500

rpm durante 15 minutos a 4 °C. Uma alíquota de 20µL do sedimento ressuspendido foi colocada em uma placa de ELISA juntamente com uma solução de leitura (27 ml de H₂O + 5 mg de dicloridrato de O-dianisidina em 3 ml de fosfato de potássio + 15 µl de peróxido de hidrogênio 1%). A atividade da MPO foi mensurada medindo a variação da absorbância a 450 nm. Os resultados são apresentados como unidades de MPO/mg de tecido.

4.3.3.3 Análise dos níveis de GSH

O método de Sedlak & Lindsay (1968) será utilizado para análise de glutathione, na qual alíquotas de 400 µL do líquido peritoneal serão misturadas a 320 µL de água destilada e a 80 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 50% para precipitação de proteínas. Os tubos serão centrifugados por 15 minutos a 3.000 rpm a 4° C. A um total de 400 µL do sobrenadante será adicionado 800 µL de tampão Tris 0,4 M (pH 8.9) e 20 µL de DTNB (reagente de Ellman) 0,01 M. A mistura, será então agitada por 3 minutos, e a absorbância lida a 412 nm em espectrofotômetro. Resultado expresso em µg de GSH/ml de tecido.

4.3.3.4 Análise dos níveis de MDA

Os níveis de malonaldeído no exudato peritoneal serão determinados pelo método de Mihara & Uchiyama (1978). Para tanto, 250 mL do líquido peritoneal será pipetado dentro de um tubo e será acrescentado a esse homogenato 1,5 ml de (1%) e 0,5 ml de uma solução aquosa de ácido tiobarbitúrico aquoso (0.6%). Os tubos serão aquecidos por 45 minutos em um banho de água fervendo e a mistura reacional será então resfriada em um banho de água gelada, seguida da adição de 2 ml de n-butanol. Os conteúdos serão misturados por 1 min com um misturador "vortex", centrifugados a 1200rpm por 10 minutos e a absorbância da camada orgânica será mensurada em 520 e 535nm. Os resultados serão expressos em mmol de MDA/ml de tecido.

4.4 Ensaios para avaliar o potencial antinociceptivo

4.4.1 Teste de contorção abdominal induzida por ácido acético

O teste de contorção abdominal induzida pelo agente químico ácido acético é visto como um modelo clássico de nocicepção inflamatória visceral, que desencadeia uma irritação no peritônio, caracterizada pela contração abdominal e pelo alongamento das patas traseiras.

Assim, os camundongos dos grupos controles receberam salina 0,9% (i.p.) ou uma solução de ácido acético 0,6% (i.p.). Os animais dos grupos tratados receberam o PLS 10 mg/kg (i.p.) ou o fármaco de referência morfina 5mg/kg (s.c.). Após 30 min, os animais dos grupos tratados receberam uma injeção intraperitoneal de 250 μ L de uma solução de ácido acético 0,6%. Após 10 minutos da administração de ácido acético, o número de contorções abdominais foi anotado para cada animal por um período de 20 minutos (KOSTER et al., 1959; COLLIER et al., 1968).

4.4.2 Teste da formalina

O teste de formalina consiste em uma lesão tecidual local na pata, e tem sido utilizado como um modelo para a dor neurogênica e dor inflamatória localizada. Os animais (n = 6) foram tratados com PLS (10 mg/kg, i.p.), solução salina estéril (0,9%) i.p. ou morfina (5 mg/kg, droga de referência) subcutânea (s.c.). Trinta minutos após o pré-tratamento, vinte microlitros de formalina a 2,5% foram administrados intraplantarmente na pata traseira direita (20 μ L/pata) dos animais. A quantidade de tempo de lambertura da pata foi registrada de 0 a 5 min (fase 1, neurogênica) e de 20 a 25 minutos (fase 2, inflamatória) após a injeção de formalina (HUNSKAAR et al., 1987; FASMER et al., 1986).

4.5 Análise estatística

Os dados foram expressos como média $\pm$ o erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi feita usando o teste one-way ANOVA, seguida do teste de Newman-keuls. Significância estatística foi observada quando $p < 0,05$. Para realização dos testes estatísticos foi utilizado o *software* Prisma versão 6.0 da *GraphPad Software*.

5. RESULTADOS

5.1 Atividade antiedematogênica do PLS-*G. domingensis* em edema de pata induzido por carragenina.

A Tabela 1 resume os efeitos do PLS-*G. domingensis* sobre o edema nos tempos medidos, na qual é possível ser observado que a injeção de carragenina (500 µg/pata) provocou um aumento significativo no volume da pata em todos os intervalos de tempo especificados ($p < 0,05$) em comparação ao grupo tratado somente com salina, comprovando a eficácia do agente inflamatório.

Além disso, a dose de 10mg/kg mostrou-se a mais eficaz em todos os tempos medidos em relação às outras doses testadas, uma vez que provocou redução do edema de maneira significativa em todo o curso temporal (1h – $0,040 \pm 0,003$ ml; 2h – $0,033 \pm 0,003$ ml; 3h – $0,035 \pm 0,002$ ml; 4h – $0,030 \pm 0,002$ ml) em comparação com os animais que receberam somente carragenina (1h - $0,088 \pm 0,007$ ml; 2h - $0,086 \pm 0,005$ ml; 3h - $0,111 \pm 0,008$ ml; 4h $0,116 \pm 0,004$ ml). Portanto, a dose de 10 mg/kg por ter mostrado efeito antiedematogênico no pico inflamatório $0,035 \pm 0,002$ ml; $0,030 \pm 0,002$ ml (terceira e quarta hora respectivamente), superiores até mesmo ao fármaco de referência, Indometacina (3h - $0,061 \pm 0,003$; 4h - $0,040 \pm 0,002$) em todo curso de tempo, foi a escolhida para posterior avaliação, incluindo seus efeitos sobre o edema da pata induzido por diferentes agentes inflamatórios, peritonite e atividade antinociceptiva.

Tabela 1 - Atividade antiedematogênica do PLS-*G. domingensis* no edema de pata induzido por carragenina

Tratamento mg/kg	Volume da pata em ml (tempo após a administração de carragenina)			
	1h	2h	3h	4h
Sal	0,030 ± 0,014	0,015 ± 0,003	0,011 ± 0,003	0,006 ± 0,004
Cg	0,088 ± 0,007 [#]	0,086 ± 0,005 [#]	0,111 ± 0,008 [#]	0,116 ± 0,004 [#]
PLS 2,5 mg	0,044 ± 0,003 (50%)*	0,047 ± 0,003 (45,3%)*	0,063 ± 0,008 (43,2%)*	0,073 ± 0,009 (37%)*
PLS 5,0 mg	0,055 ± 0,009 (37,5%)*	0,050 ± 0,006 (41,8%)*	0,050 ± 0,013 (54,9%)*	0,076 ± 0,008 (34,4%)*
PLS 10,0 mg	0,040 ± 0,003 (54,5%)*	0,033 ± 0,003 (61,6%)*	0,035 ± 0,002 (68,4%)*	0,030 ± 0,002 (74,1%)*
Indo	0,048 ± 0,003 (45,4%)	0,055 ± 0,004 (36%)	0,061 ± 0,003 (45%)	0,040 ± 0,002 (65,5%)

Valores são expressos como média ± E.P.M. de seis animais por grupo. [#]P <0,05 indica diferença significativa entre o grupo salina e * P<0,05 indica diferença significativa entre o grupo carragenina. A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

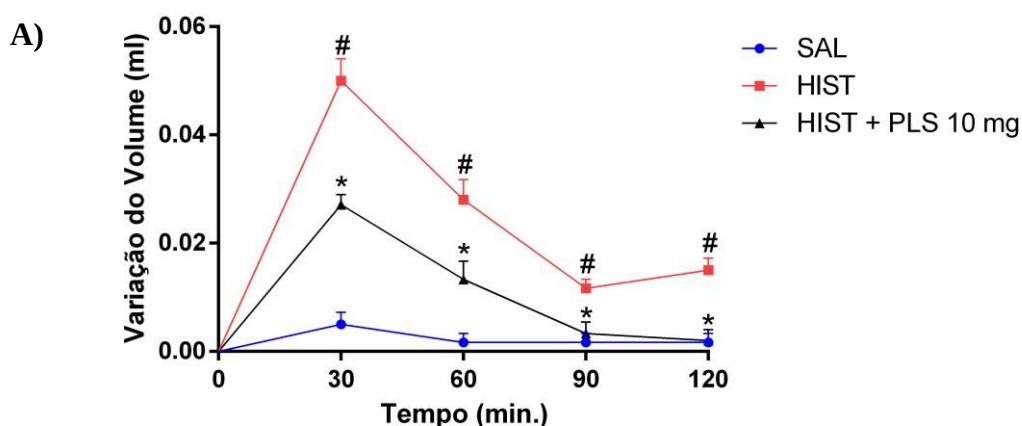
5.2 Atividade antiedematogênica do PLS-*G. domingensis* sobre o edema de pata induzido por diferentes agentes flogísticos: histamina, 5-HT, bradicinina, PGE₂ e composto 48/80

De acordo com a Figuras 6 os animais que receberam os diferentes agentes inflamatórios apresentaram um aumento expressivo no volume da superfície subplantar da pata posterior direita quando comparados com os animais do grupo controle negativo, solução salina 0,9% (histamina - 0,060 ± 0,005 vs sal - 0,005 ± 0,002; 5-HT - 0,077 ± 0,002 vs sal - 0,004 ± 0,002; bradicinina - 0,042 ± 0,002 vs sal - 0,005 ± 0,002; PGE₂ - 0,075 ± 0,002 vs sal - 0,004 ± 0,002; composto 48/80 - 0,061 ± 0,001 vs sal - 0,006 ± 0,002), aos 30 minutos, tempo em que se verifica o pico do edema desses agentes inflamógenos testados, indicando a eficácia dos agentes pró-inflamatórios vasculares utilizados.

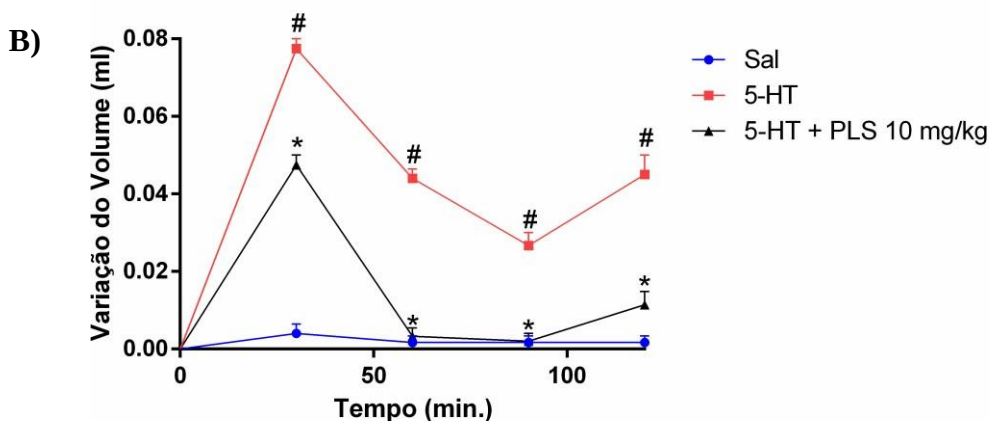
Além disso, foi demonstrado que o PLS-*G. domingensis* na concentração de 10 mg/kg; i.p. reduziu significativamente o edema induzido por vários agentes inflamatórios na superfície subplantar da pata posterior dos camundongos durante todos os cursos de tempo

testados. Aos 30 minutos, o volume do edema no grupo de PLS foi $0,027 \pm 0,001$ ml em comparação com $0,060 \pm 0,005$ ml no grupo de histamina, o que corresponde a 55 % de inibição. O PLS também inibiu de modo significativo o aumento do volume da pata de animais tratados com 5-HT, bradicinina, PGE_2 ou composto 48/80 por 39,9 % e 80,9 %, 40 % e 57,3 % respectivamente.

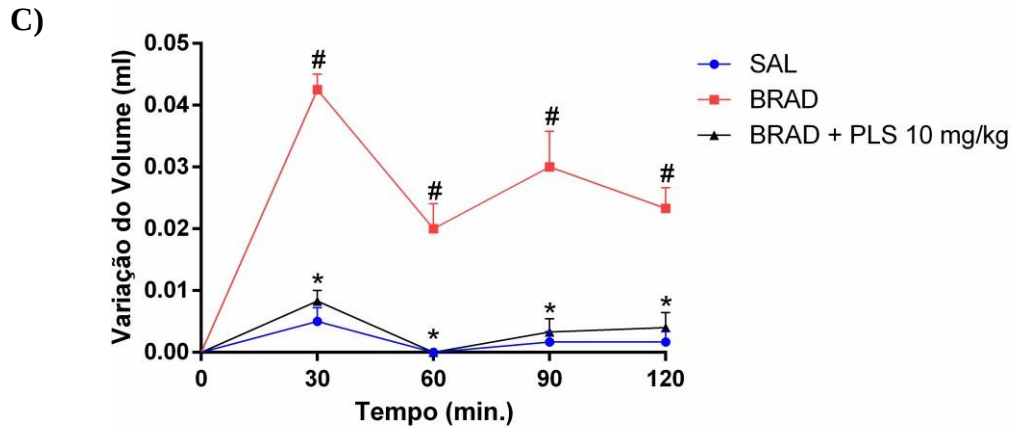
Figura 6 - Atividade antiedematogênica do PLS-*G. domingensis* sobre o edema de pata induzido por vários agentes inflamatórios



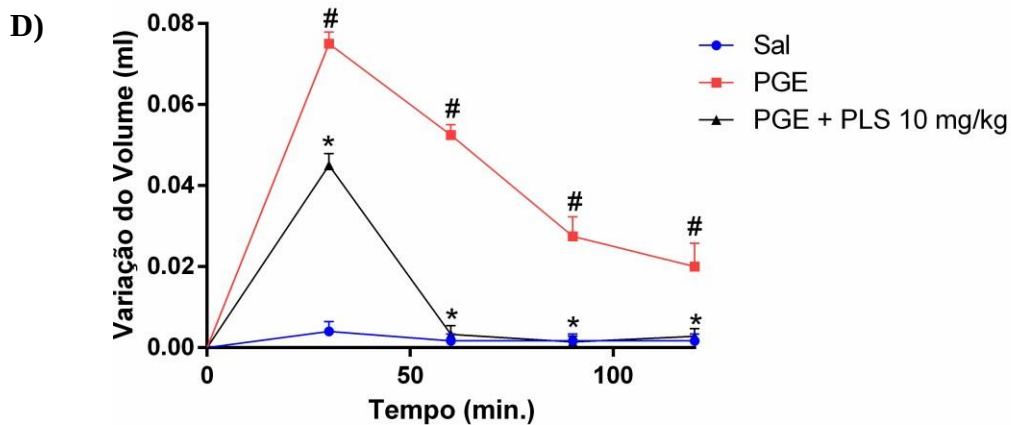
Atividade antiedematogênica do PLS-*G. domingensis* no edema de pata induzido por histamina em camundongos. Os dados estão expressos como média $\pm$ E.P.M. de seis camundongos para cada grupo. #P <0,05 indica diferença significativa entre o grupo salina e *P <0,05 indica diferença significativa entre o grupo histamina. A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.



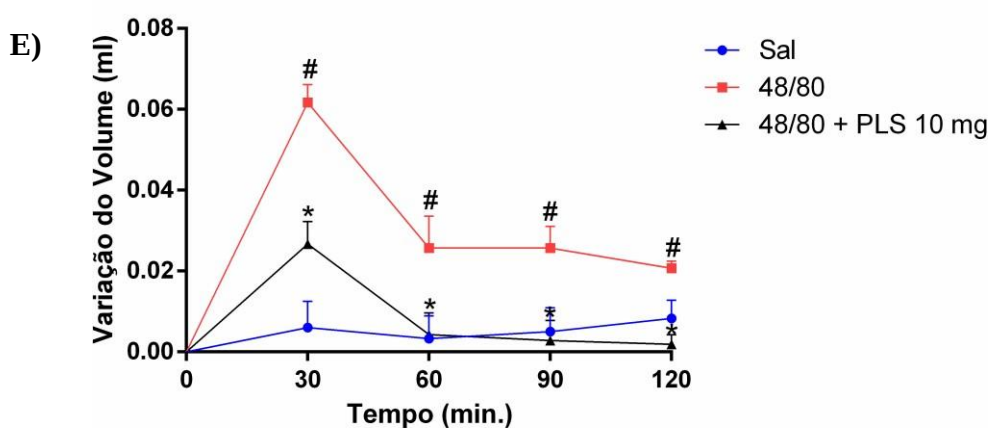
Atividade antiedematogênica do PLS-*G. domingensis* no edema de pata induzido por 5-HT em camundongos. Os dados estão expressos como média $\pm$ E.P.M. de seis camundongos para cada grupo. #P <0,05 indica diferença significativa entre o grupo salina e *P <0,05 indica diferença significativa entre o grupo 5-HT. A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.



Atividade antiedematogênica do PLS-*G. domingensis* no edema de pata induzido por bradicinina em camundongos. Os dados estão expressos como média $\pm$ E.P.M. de seis camundongos para cada grupo. #P <0,05 indica diferença significativa entre o grupo salina e *P <0,05 indica diferença significativa entre o grupo bradicinina. A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.



Atividade antiedematogênica do PLS-*G. domingensis* no edema de pata induzido por Prostaglandina E₂ em camundongos. Os dados estão expressos como média $\pm$ E.P.M. de seis camundongos para cada grupo. #P <0,05 indica diferença significativa entre o grupo salina e *P <0,05 indica diferença significativa entre o grupo Prostaglandina E₂. A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.



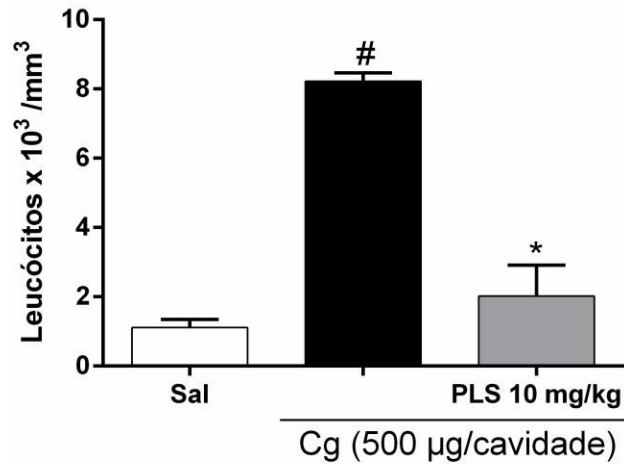
Atividade antiedematogênica do PLS-*G. domingensis* no edema de pata induzido por 48/80 em camundongos. Os dados estão expressos como média $\pm$ E.P.M. de seis camundongos para cada grupo. #P <0,05 indica diferença significativa entre o grupo salina e * P <0,05 indica diferença significativa entre o grupo 48/80. A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

5.3 Atividade anti-inflamatória do PLS-*G. domingensis* sobre a contagem total de leucócitos e diferencial de neutrófilos na peritonite induzida por carragenina

Como mostra a Figura 7, os animais tratados com a administração intraperitoneal de carragenina apresentaram um aumento significativo na contagem de leucócitos totais e neutrófilos no fluido peritoneal quando comparados com os animais tratados somente com solução salina (Cg $8,220 \pm 0,242 \times 10^3$ leucócitos/ml vs Sal $1,114 \pm 0,228 \times 10^3$ leucócitos/ml; $4,081 \pm 0,495 \times 10^3$ neutrófilos/ml vs $0,029 \pm 0,005 \times 10^3$ neutrófilo/ml). Nos animais que foram pré-tratados com a dose de 10 mg/kg de PLS-*G. domingensis* houve redução ($p > 0,05$) no total de leucócitos ($2,021 \pm 0,893 \times 10^3$ células/ml) e na migração de neutrófilos ($0,315 \pm 0,080 \times 10^3$ células/ml) em relação ao grupo controle positivo, a níveis semelhantes com os correspondentes níveis observados na solução salina.

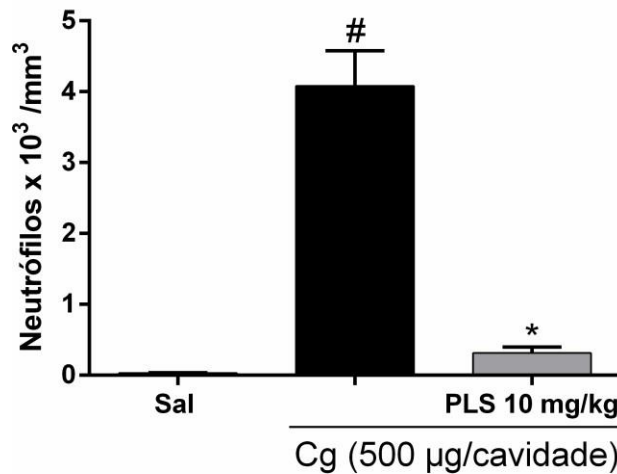
Figura 7 - Atividade antiedematogênica de PLS-*G. dominigensis* na contagem total de leucócitos e na contagem diferencial de neutrófilos

A)



Atividade antiedematogênica de PLS-*G. dominigensis* na migração de leucócitos em peritonite induzida por carragenina. Os camundongos foram administrados com Carragenina (Cg), PLS 10 mg/kg ou salina estéril. Os dados estão expressos como média $\pm$ E.P.M. de seis animais para cada grupo. #P <0,05 indica diferença significativa entre o grupo salina e *P <0,05 indica diferença significativa entre o grupo carragenina. A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

B)

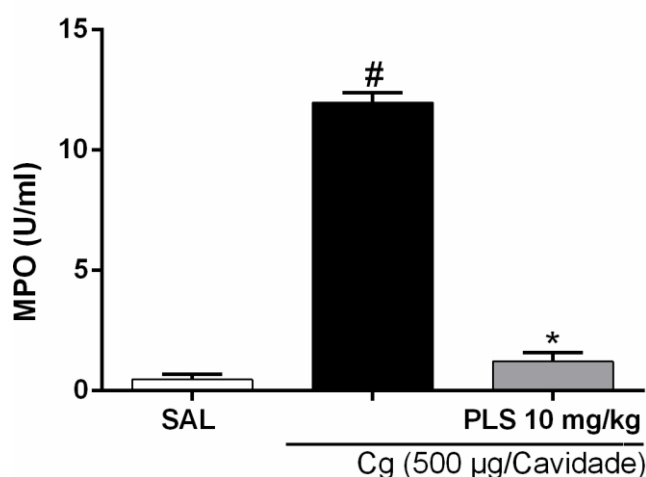


Atividade antiedematogênica de PLS-*G. dominigensis* na migração de neutrófilos em peritonite induzida por carragenina. Os camundongos foram administrados com Carragenina (Cg), PLS 10 mg/kg ou salina estéril. Os dados estão expressos como média $\pm$ E.P.M. de seis animais para cada grupo. #P <0,05 indica diferença significativa entre o grupo salina e *P <0,05 indica diferença significativa entre o grupo carragenina. A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

5.4 Atividade antiedematogênica do PLS-*G. domingensis* sobre a atividade da MPO no fluido peritoneal.

Como mostrado na Figura 8, 4 horas após o tratamento com o estímulo inflamatório de uma injeção intraperitoneal de solução de carragenina (500 µg/cavidade), produziu um aumento significativo na atividade da enzima MPO (uma avaliação indireta do acúmulo de neutrófilos), quando comparado com os valores de animais tratados somente com salina ($11,980 \pm 0,402$ vs $0,470 \pm 0,208$). O pré-tratamento com o PLS-*G. domingensis* 10 mg/kg reduziu consistentemente a atividade de MPO ($1,218 \pm 0,366$ UMPO/ml), quando comparado com o grupo que recebeu somente carragenina ($11,980 \pm 0,402$ UMPO/ml).

Figura 8 - Efeito de PLS-*G. domingensis* sobre a atividade da MPO no exsudato peritoneal



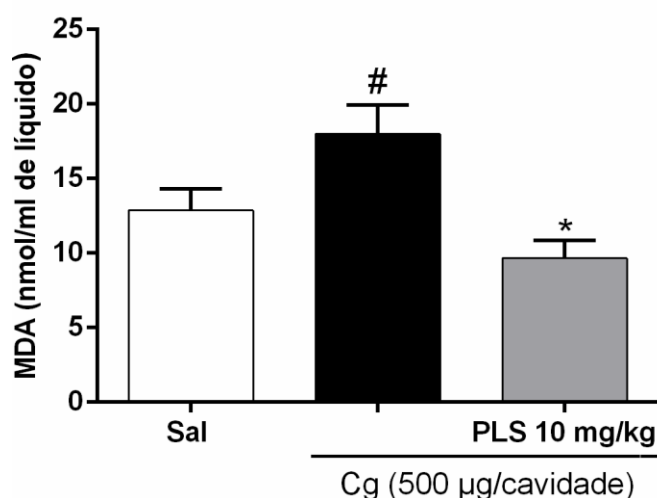
Os valores representam média $\pm$ E.P.M. para a atividade da MPO. A atividade da enzima foi medida em fluido peritoneal de animais submetidos a peritonite por carragenina. A dosagem foi realizada no fluido peritoneal coletado 4h após a aplicação da carragenina. # $p < 0,05$ comparado com o grupo salina e * $p < 0,05$ comparado com o grupo carragenina. A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

5.5 Atividade antioxidante do PLS-*G. domingensis* sobre a peroxidação lipídica por dosagem de MDA no exsudato peritoneal

A administração de injeção intraperitoneal de solução de carragenina (500 µg/cavidade) causou a peroxidação lipídica, verificada pela determinação dos níveis de MDA presentes nas amostras de exsudato peritoneal de camundongos após as quatro horas de indução da peritonite ($17,990 \pm 1,940$) quando comparado ao grupo salina ($12,870 \pm 1,430$).

Nesse sentido, o grupo tratado com PLS com a dose de 10 mg/Kg previniu a peroxidação lipídica de modo significativo ($9,653 \pm 1,221$) quando comparado com o grupo que recebeu somente injeção de carragenina. Esses achados podem ser observados na Figura 9.

Figura 9 - Efeito de *PLS-G. domingensis* sobre a dosagem dos níveis de MDA no exsudato peritoneal

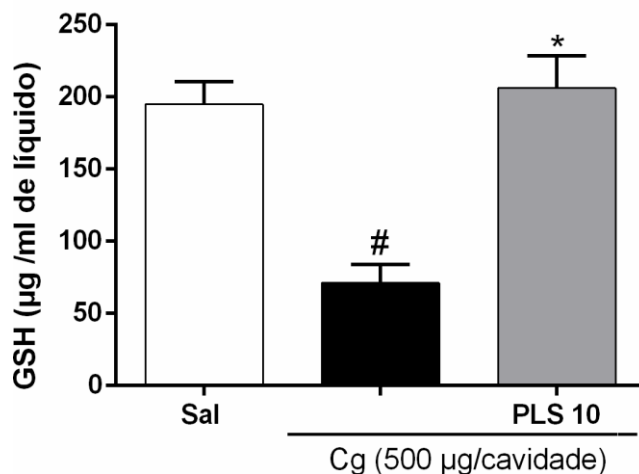


Os níveis de MDA no exsudato peritoneal foram avaliados 4 horas após a administração de carragenina. Os animais foram pré-tratados 30 minutos antes da injeção de carragenina na cavidade peritoneal com PLS (10 mg/kg; i.p.). O grupo controle recebeu apenas injeção de salina (0,9%, i.p.) no peritônio. Os valores foram expressos como média $\pm$ E.P.M. de nmol/mL de MDA. # $p < 0,05$ comparado com o grupo salina e * $p < 0,05$ comparado com o grupo carragenina. A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

5.6 Atividade antioxidante do *PLS-G. domingensis* sobre o estresse oxidativo por dosagem de GSH no exsudato peritoneal

Os resultados mostrados na Figura 10 mostram que, no grupo tratado com injeção intraperitoneal de solução de carragenina (500 µg/cavidade) houve redução significativamente da concentração de GSH ($71,100 \pm 4,821$ µg/ml) quando comparado ao grupo salina ($194,900 \pm 7,083$ µg/ml). O grupo pré-tratado com PLS, na dose de 10 mg/kg, preservou os níveis de GSH ($206,100 \pm 8,550$ µg/ml).

Figura 10 - Efeito de PLS-*G. domingensis* sobre a dosagem dos níveis de GSH no exsudato peritoneal

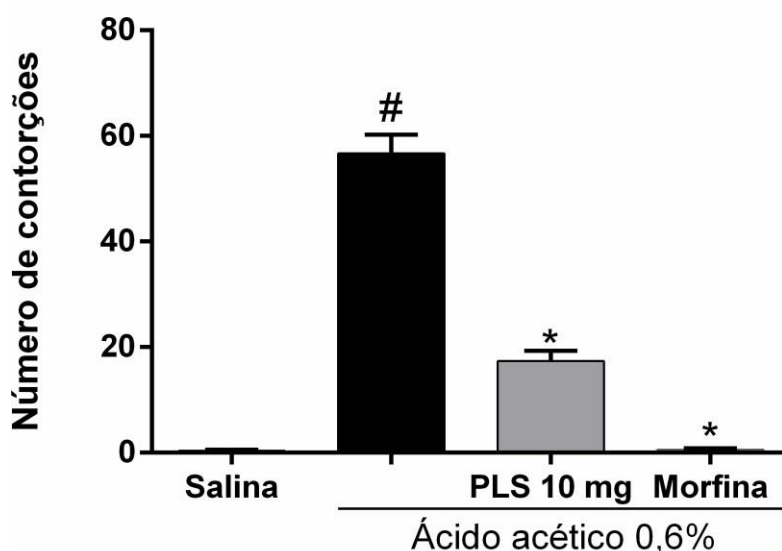


Os níveis de GSH no exsudato peritoneal foram avaliados 4 horas após a administração de carragenina. Os animais foram pré-tratados 30 minutos antes da injeção de carragenina na cavidade peritoneal com PLS (10 mg/kg; i.p.). O grupo controle recebeu apenas injeção de salina (0,9%, i.p.) no peritônio. Os valores foram expressos como média $\pm$ E.P.M. de μ g de NPSH/ml de líquido. # $p < 0,05$ comparado com o grupo salina e * $p < 0,05$ comparado com o grupo carragenina. A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

5.7 Atividade antinociceptiva do PLS-*G. domingensis* na contorção abdominal induzida por ácido acético

Conforme a Figura 11 é observado o efeito antinociceptivo do PLS sobre as contrações abdominais induzidas por ácido acético. A administração de PLS (10 mg/kg; i.p.) 30 minutos antes do estímulo doloroso, reduziu significativamente o número de contorções abdominais ($17,330 \pm 1,978$) em relação ao grupo controle positivo ($56,670 \pm 3,593$). Como esperado, a morfina (5 mg/kg; s.c.), fármaco de referência, mostrou uma resposta analgésica potente ($0,333 \pm 0,210$) em relação ao grupo que recebeu somente ácido acético.

Figura 11 - Efeito de *PLS-G. domingensis* sobre as contorções abdominais induzidas por ácido acético

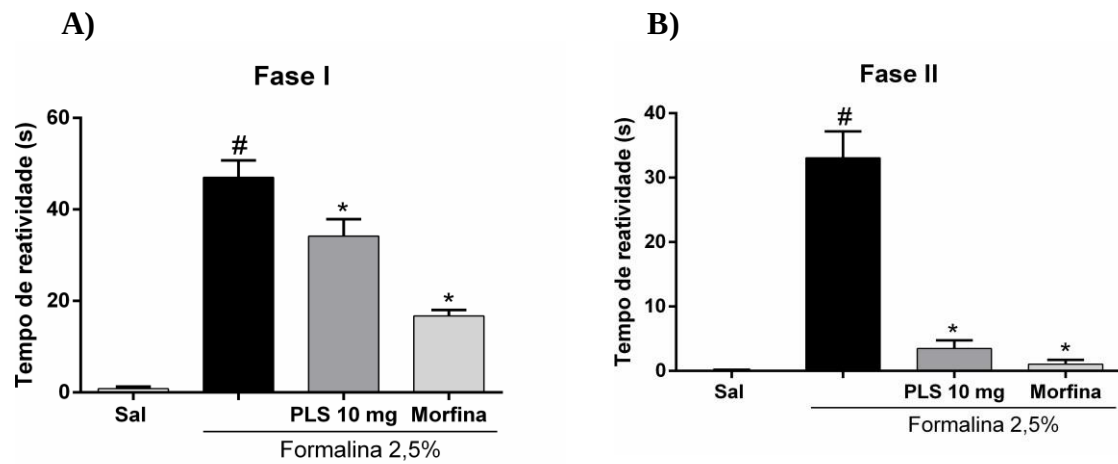


Os animais foram pré-tratados com *PLS-G. domingensis* (10 mg/kg; i.p.) ou morfina (5 mg/kg; s.c.) e após 30 minutos receberam ácido acético a 0,6% via i.p. Os valores foram expressos como média $\pm$ E.P.M. do número de contorções. # $p < 0,05$ comparado com o grupo salina e * $p < 0,05$ comparado com o grupo ácido acético. A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

5.8 Atividade antinociceptiva do *PLS-G. domingensis* no teste de formalina

Os resultados expostos na Figura 12, evidenciam que o PLS (10 mg/kg; i.p.) promoveu redução significativa do tempo em que o animal permaneceu lambendo a pata nas duas fases do teste de formalina (1ª fase – $34,170 \pm 3,688$) (2ª fase – $3,496 \pm 1,252$) quando comparados ao grupo controle positivo (1ª fase – $47,020 \pm 3,702$) (2ª fase – $33,100 \pm 4,070$). O grupo morfina (5 mg/kg; i.p.) também reduziu significativamente (1ª fase – $16,720 \pm 1,321$) (2ª fase – $1,042 \pm 0,666$) o parâmetro avaliado quando comparado ao grupo formalina.

Figura 12 - Efeito de PLS-*G. domingensis* sobre o tempo de reatividade no teste de formalina



Os animais foram pré-tratados com PLS-*G. domingensis* (10 mg/kg; i.p.) ou morfina na dose de (5 mg/kg; s.c.). Após 30 minutos foi injetada formalina. As respostas nociceptivas dos animais à injeção de formalina (2,5 %, 20 µl) foram avaliadas durante as fases I (0-5 min) e II (20-25 min). Os valores nos gráficos representam a média $\pm$ E.P.M. do tempo de lambertura da pata após a aplicação da formalina na pata direita traseira. # $p < 0,05$ comparado com o grupo salina e * $p < 0,05$ comparado com o grupo formalina. A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

6. DISCUSSÃO

O interesse em estudar o potencial anti-inflamatório e antinociceptivo do PLS extraído da alga vermelha *G. domingensis* surgiu devido aos efeitos farmacológicos evidenciados de PLS de outras espécies do gênero *Gracilaria*, podendo ser destacado o efeito anti-inflamatório, antioxidante e antinociceptivo da espécie *Gracilaria intermediata* (COSTA *et al.*, 2020), os efeitos protetores da espécie *Gracilaria caudata* sobre a hipernocicepção, artrite, periodontite e sobre a barreira esofágica (CHAVES *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2019; OLIVEIRA *et al.*, 2020; SALES *et al.*, 2020), e da *Gracilaria birdiae* sobre a redução dos danos causados pela colite (BRITO *et al.*, 2014). Os efeitos biológicos demonstrados pelos PLS destas algas durante a resposta inflamatória nos diferentes tipos de patologia, se caracterizam pela redução da migração celular, da atividade de mediadores químicos, dos níveis de estresse oxidativo, pela preservação dos níveis de antioxidantes endógenos e por ativarem vias bioquímicas com ação antinociceptiva (SOUSA *et al.*, 2022). Corroborando com esses achados, os dados apresentados no presente trabalho demonstraram que o PLS-*G. domingensis* apresenta atividades anti-inflamatória e antinociceptiva em modelos experimentais *in vivo*.

O ponto de partida deste estudo foi avaliar a atividade anti-inflamatória do PLS-*G. domingensis*, para isso foi utilizado o modelo clássico de avaliação de atividade anti-inflamatória de novos fármacos, o edema de pata induzido por carragenina, por exemplo, foi através do uso deste modelo que os pesquisadores da Merck Sharp & Dohme, elucidaram a atividade anti-inflamatória da indometacina. O desenvolvimento do edema induzido por este agente flogístico possui um perfil bifásico. Na fase inicial do modelo, que se inicia aproximadamente uma hora após o estímulo inflamatório, ocorrem eventos vasculares, resultantes do aumento da concentração de histamina e serotonina do espaço intercelular. Na fase mais tardia, que inicia-se aproximadamente 3 h após o tratamento, ocorrem eventos celulares dependentes de citocinas pró-inflamatórias, óxido nítrico e prostaglandinas produzidos pelas células residentes, além disso pode ser observado no local do insulto um intenso infiltrado neutrofílico que podem amplificar a resposta inflamatória ao gerar espécies reativas de oxigênio e mediadores inflamatórios e pela atividade da enzima MPO (WINTER; RISLEY; NUSS, 1962; MORRIS, 2003; POSADAS *et al.*, 2004; BARBOSA *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2022).

Inicialmente foram utilizadas três doses diferentes do PLS-*G. domingensis* (2,5; 5 e 10 mg/kg) com o objetivo de se estabelecer a melhor dose com efeito anti-inflamatório. Todas as

doses testadas neste modelo apresentaram um efeito estatisticamente significativo durante todo o tempo de análise, porém a dose mais eficaz com ação antiedematogênica foi de 10 mg/kg e esta dose foi, portanto, escolhida para as avaliações posteriores.

O tratamento i.p. com a melhor dose de PLS-*G-domingensis*, produziu uma inibição significativa do edema, com valores que superaram os encontrados para o grupo tratado com indometacina, droga AINEs utilizada como padrão neste modelo de experimento, inferindo que o PLS-*G-domingensis* pode estar atuando via inibição da liberação de mediadores pró-inflamatórios da inflamação aguda, como os agentes produzidos durante o metabolismo do ácido araquidônico, mais especificamente as prostaglandinas. Os achados encontrados neste modelo corroboram com os de BRITO *et al.*, 2014 e COSTA *et al.*, 2020 sobre os efeitos anti-inflamatórios de PLS de algas marinhas na inibição do edema induzido por carragenina. Outros PLS extraídos de algas vermelhas também já demonstraram serem capazes de reduzir significativamente edema de pata, conforme nos achados de PEREIRA *et al.*, (2014) que utilizou PLS de *Digenea simplex* e relatou um efeito inibitório dose dependente no edema da pata induzido pela carragenina. De modo semelhante, BATISTA *et al.*, (2014) avaliando o efeito anti-inflamatório do PLS de *Agardhiella ramosissima* verificou uma inibição nas duas fases desse modelo experimental.

No presente estudo pôde se avaliar ainda que o PLS de *G. domingensis* foi ativo nas duas fases da inflamação, ou seja, inibiu o edema antes e após 3h, indicando outros possíveis mecanismos de ação anti-inflamatória, como o envolvimento na inibição de mediadores químicos da inflamação (VINEGAR *et al.*, 1987) e na migração de neutrófilos (KULKARNI; MEHTA; KUNCHANDY, 1986). Partindo deste princípio, que a ação anti-inflamatória do PLS poderia envolver mediadores químicos e migração de polimorfonucleares, foram realizados testes com modelo de edema de pata induzido por diferentes agentes flogísticos e modelo de peritonite induzida por carragenina com o objetivo de elucidar os achados observados no presente modelo.

Neste contexto, foram realizados os modelos de edema de pata induzidos pela injeção intraplantar de histamina e 5-HT, a fim de se esclarecer a influência do PLS-*G. domingensis* sobre esses mediadores na mediação de seus efeitos anti-inflamatórios. É bem conhecido as ações da histamina e 5-HT como aminas vasoativas que desempenham papéis fundamentais no processo inflamatório através do aumento da permeabilidade vascular. A histamina é fundamental para a contração e separação das células, essa ação inicia quando ela se liga aos receptores histamínicos H1 presente na célula endotelial, produzindo assim um aumento dos espaços entre as células, o que facilita o extravasamento das substâncias para o

espaço intersticial e a passagem dos leucócitos circulantes. O principal local de armazenamento da histamina na maioria dos tecidos é no mastócito. Além de seu papel na vasculatura, é importante destacar que essa amina tem um efeito ativador sobre a fosfolipase A_2 , enzima responsável pela formação de prostaglandinas. As ações de 5-HT se assemelham as da histamina (BENJAMIN; CARLINI; BARJA-FIDALGO, 1992). Os resultados mostraram que o PLS-*G. domingensis* é capaz de diminuir o edema induzido pela histamina e por serotonina de modo significativo em todo o curso do edema. Estes resultados apontam para um possível composto anti-inflamatório com efeitos antiaminas vasoativas.

A partir de então, decidiu-se investigar o efeito do PLS-*G. domingensis* sobre a bradicinina, um outro reconhecido mediador inflamatório. A bradicinina é liberada subsequente a histamina e 5-HT, ela é um peptídeo biológico proveniente do sistema de cininas, constitu-se como um potente vasoativo que tem ação semelhante as aminas vasoativas causando aumento da permeabilidade vascular, além de ação característica de hiperalgesia, que é a maior sensibilidade a estímulos dolorosos (CAMPOS & CALIXTO, 1995). As ações deste mediador químico na resposta inflamatória aguda, ocorrem por meio de sua interação com os receptores B_1 presentes nos macrófagos residentes no tecido lesado, a interação induz estas células a produzirem citocinas pró-inflamatórias (IL-1, TNF- α), sua ação exerce também influência na ativação e aderência de neutrófilos. Além disso, nos neurônios nociceptivos, esse biopeptídeo é responsável pela excitação de fibras nociceptivas que ao serem estimuladas podem levar à hiperalgesia com estimulação da liberação de substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), este último é um potente peptídeo vasodilatador amplamente distribuído no sistema nervoso central (SPECTOR, 1956; ANTÔNIO & BRITO, 1998). No presente trabalho, o PLS produziu uma acentuada redução do volume da pata $p < 0,05$ no edema de bradicinina em todo curso temporal avaliado.

Dando seguimento na elucidação dos possíveis mecanismos envolvidos no efeito antiedematogênico do PLS-*G. domingensis*, foi analisado sua atividade no edema de pata induzido por PGE_2 . A prostaglandina E_2 é um eicosanoide sintetizado a partir da metabolização do ácido araquidônico pelas enzimas COX, quando liberado, exerce importantes funções no processo inflamatório, uma vez que ela induz a produção de diversos quimioatraentes, tais como citocinas pró-inflamatórias e leucócitos. A PGE_2 pode ainda atuar de modo sinérgico com outros mediadores incluindo histamina e bradicinina, associação que é responsável pelo quadro de dor e febre. Essa soma de evidências destacam o importante papel da enzima COX por meio da produção de PGE_2 na

resposta inflamatória aguda (KAUR et al., 2004; 2013; LEITE et al., 2014). O PLS demonstrou ação antiedematogênica significativa no edema associado ao agente PGE₂.

Os resultados obtidos nos modelos que utilizaram mediadores químicos corroboram com o trabalho de Chaves et al., (2013) no qual o PLS 10 mg/kg de *Gracilaria caudata* inibiu efetivamente o edema induzido por histamina. Os efeitos do PLS de *G. Domingensis* sobre o edema de PGE₂ se assemelham aos do PLS da alga *Padina tetrastrum* relatados por Mohsin & Kurup, (2011) que relataram uma redução significativa na concentração de COX. Batista et al., (2014) avaliando o PLS da alga *Agardhiella ramosissima* mostrou que o seu efeito sobre a diminuição dos edemas de histamina e 5-HT foi significativo.

Por fim, para validar a hipótese de que parte da ação anti-inflamatória de PLS-*G. domingensis* envolvia a inibição de mediadores da inflamação foi avaliado seu efeito sobre edema de pata provocado pelo composto 48/80. A inflamação induzida por composto 48/80 envolve degranulação de mastócitos, o rompimento da membrana tem como consequência a liberação dos mediadores vasoativos histamina e serotonina, os quais agindo em seus respectivos receptores irão causar o aumento da permeabilidade vascular, além do sinal clínico de coceira (SANTOS & RAO, 1997; SCHEMANN et al., 2012).

A dose testada do PLS-*G. domingensis* nesse modelo reduziu de forma significativa ($p < 0,05$) o volume das patas de camundogos. Semelhantemente, De Sousa et al. (2013), avaliando o efeito anti-inflamatório de um polissacarídeo da alga vermelha *Gelidium crinale*, verificou que o PLS foi capaz de reduzir de maneira significativa o edema de pata induzido pelo composto 48/80 em aproximadamente 32%. Coura et al. (2015) verificou que o polissacarídeo da alga vermelha *Gracilaria cornea* foi eficaz na redução do edema de pata induzido pelo agente 48/80.

Diante dos resultados do presente estudo e das evidências encontradas na literatura, é possível sugerir que o envolvimento da histamina deriva de mastócitos no efeito anti-inflamatório do PLS-*G. Domingensis*, possivelmente atuando sobre os receptores H1 da histamina ou sobre a estabilidade de mastócitos prevenindo assim a liberação dos mediadores presente em seus grânulos, como foi evidenciado por meio do edema de 48/80.

Pode-se, portanto, observar por meio dos resultados apresentados a partir dos modelos de edemas do presente trabalho que o PLS-*G. domingensis*, na dose de 10 mg/kg; i.p., foi eficaz na redução dos edemas de pata induzidos por carragenina, histamina, serotonina, bradicinina, PGE₂ e composto 48/80. Deste modo, pode-se inferir que o PLS-*G. Domingensis*, um biopolímero, afeta o componente celular e vascular do edema e este efeito parece ser

mediado pela redução da ação de diferentes mediadores inflamatórios e pela redução da migração celular.

Partindo da hipótese que o efeito anti-inflamatório de PLS-*G. domingensis* durante a resposta inflamatória induzida por carragenina foi relacionada com uma redução da infiltração de neutrófilos para o local da inflamação, buscou-se evidenciá-la através do modelo experimental de peritonite induzida pelo mesmo agente inflamógeno. Neste modelo, a carragenina induz migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal por ativação indireta dos macrófagos (SOUZA *et al.*, 1988; MONTANHER *et al.*, 2007).

O peritônio é uma membrana serosa que reveste as paredes da cavidade abdominal, os modelos animais envolvendo cavidades permitem a quantificação de células e níveis de vários mediadores inflamatórios induzidos por diferentes agentes irritantes aplicados no interior da cavidade, essas características que envolve este modelo experimental o qualifica como ferramenta farmacológica de grande utilidade para a avaliação de migração de neutrófilos e como teste para drogas anti-inflamatórias (PAULINO *et al.*, 2008; CASH *et al.*, 2009).

Vários trabalhos mostram produtos de algas atuando sobre a peritonite induzida por carragenina. Na análise de uma fração de polissacarídeo sulfatado extraído da alga marinha vermelha *Hypnea musciformis*, Brito *et al.* (2013) mostrou que um dos mecanismos de seu efeito anti-inflamatório ocorre pela inibição da migração de neutrófilos. Pereira *et al.* 2014 demonstrou que o PLS da alga vermelha *Digenea simplex* inibiu a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, de modo semelhante Vanderlei *et al.* (2011) mostrou em seus achados que a fração do polissacarídeo sulfatado da alga vermelha *Gracilaria birdiae* inibiu em até 52% a migração de leucócitos e 54,76% a migração de neutrófilos.

Os resultados do PLS-*G. domingensis* na migração de leucócitos totais e neutrófilos na peritonite induzida por carragenina corroboram com os resultados de edema de pata induzido por carragenina, confirmando que houve redução significativa dos eventos celulares, uma vez que inibiu em aproximadamente 75,41% a migração de leucócitos totais, e notadamente a migração de neutrófilos, 89,83%, para a cavidade peritoneal. Os resultados desses dois ensaios apresentam bons valores e se comparam com os achados da literatura.

Considerando que a inibição da atividade da enzima MPO é mais um indicador de atividade anti-inflamatória (BRADLEY *et al.*, 1982) e um parâmetro comumente usado para avaliação indireta do conteúdo de neutrófilos no líquido peritoneal, visto que essa enzima é encontrada primariamente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos. Ela é uma hemoproteína microbicida, liberada no fagossomo ou no espaço extracelular quando há ativação de neutrófilos, ela ainda tem a capacidade de reagir com espécies reativas de oxigênio formando

radicais livres, por isso a MPO também é um importante indicativo de progressão da inflamação (KLEBANOFF, 2005).

Na análise da atividade de MPO no fluido peritoneal, o resultado mostrou que o PLS-*G. domingensis* reduziu de forma significativa a ação da enzima, evidenciando ser possível que a sua atividade anti-inflamatória envolva, como parte do seu mecanismo de ação, a inibição da migração de neutrófilos para o sítio da inflamação. Este resultado se assemelha com os efeitos anti-inflamatórios do PLS da alga *Gracilaria cornea* relatados por COURA *et al.* (2015).

Está bem estabelecido que no processo inflamatório ocorre uma intensa migração de neutrófilos. Estas células quando ativadas são fontes de EROs que contribuem significativamente para estresse oxidativo, que por sua vez também desempenha um papel importante no recrutamento de neutrófilos, mantendo uma retroalimentação. A geração de EROs está associada à patogênese da inflamação, por levar dano ao tecido ao causar a peroxidação de lipídios, dano as proteínas e indução de proteínas pró-inflamatórias. A consequência da reação dos EROs contra a membrana celular é o acúmulo de MDA (LIMA *et al.*, 2006; GAWEL *et al.*, 2004; TSIKAS, 2017).

O MDA é o mais abundante dialdeído gerado como produto secundário na oxidação de ácidos graxos poli-insaturados, principalmente o ácido araquidônico. Por ele ser um mecanismo bem estabelecido de dano celular, é bastante utilizado como um marcador de estresse oxidativo em células e tecidos (GAWEL *et al.*, 2004). Em um estudo realizado por Brito *et al.* (2014) o PLS da alga vermelha *Gracilaria birdiae* mostrou-se eficaz na redução dos níveis de MDA. No presente trabalho o PLS-*G. domingensis* reduziu de forma significativa os níveis de MDA, aproximadamente 46,34%. Diante desse resultado eficaz é possível inferir que provavelmente a redução dos níveis de MDA pelo PLS-*G. domingensis*, em parte, esteja associado a diminuição da migração de neutrófilos e consequentemente uma menor produção de EROs.

A atividade antioxidante de PLSs tem sido sistematicamente relatada na literatura, esses compostos protegem as células da agressão de espécies reativas de oxigênio. No organismo existem uma variedade de moléculas que atuam como antioxidantes endógenos, incluindo o GSH. No espaço intracelular o GSH é o principal antioxidante, atuando na prevenção do dano oxidativo, remoção de radicais e desintoxicação, essas funções são importantes visto que contribuem para a estabilização das membranas biológicas e manutenção do equilíbrio redox fisiológico (XING *et al.*, 2015).

Partindo dessa premissa, foram dosados os níveis de GSH do exudato peritpneal no

modelo de pritonite, com a finalidade elucidar a possível ação do PLS-G. *domingensis* atuando como uma molécula antioxidante. O pré-tratamento com o PLS-G. *domingensis* foi capaz de preservar os níveis de GSH, mostrando que é possível inferir que um de seus mecanismos estão atrelados ao aumento do GSH, é importante também destacar que não se pode descartar o envolvimento do PLS-G. *domingensis* sobre outras moléculas antioxidantes endógenas. Os resultados deste estudo corroboram com os trabalhos de Silva *et al.*, 2012 e Silva *et al.*, 2015 com polissacarídeos de *Gracilaria birdiae* e *Passiflora edulis* respectivamente, que mostraram eficácia na preservação dos níveis de GSH.

Existe uma forte associação entre o processo inflamatório e o desenvolvimento da dor, de modo que essa experiência sensitiva se estabeleceu como um dos cinco sinais da inflamação. A dor aguda é protetora e uma característica fundamental da inflamação, enquanto a dor crônica está associada à neuroinflamação crônica, uma inflamação local no sistema nervoso periférico ou central (JI; CHAMESSIAN; ZHANG, 2016).

Logo após o início do processo inflamatório alguns mediadores químicos que são sintetizados atuam modulando a dor. Dentre os mediadores, a bradicinina atua por meio da ativação de receptores B₂ desempenhando um papel importante na transmissão da dor diretamente pela ativação dos neurônios sensoriais primários. Este peptídeo está entre os mediadores algogênicos endógenos mais potentes, além disso, é capaz de liberar um grande número de outros mediadores inflamatórios, incluindo prostaglandinas, óxido nítrico, neuropeptídeos e CGRP amplificando a resposta nociceptiva (DRAY & PERKINS, 1997).

Um outro meio pelo qual a bradicinina sensibiliza neurônios aferentes primários ocorre pela interação com a maioria dos mediadores inflamatórios, como prostaglandinas e citocinas levando a alodinia e hiperalgesia. Isso explica por que a ativação induzida por cinina de neurônios sensoriais primários e hiperalgesia podem ser bloqueadas por drogas anti-inflamatórias não esteróides (CALIXTO, 2000).

Assim, para averiguar o efeito antinociceptivo do PLS-G. *domingensis*, foi utilizado o teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético. Trata-se de um modelo experimental de dor visceral, não seletivo, porém bastante utilizado para avaliar o potencial analgésico central e periférico de drogas devido a sua alta sensibilidade. Este agente químico causa dor por diferentes mecanismos nociceptivos, incluindo a liberação de histamina, 5-HT, bradicinina, prostaglandina e citocinas inflamatórias. Os agentes algogênicos como o ácido acético, induzem um comportamento típico em camundongos caracterizado por contrações abdominais, movimentos do corpo como um todo, e torção dos músculos abdominais dorsais

(COLLIER *et al.*, 1968; RIBEIRO *et al.*, 2000; MIRANDA *et al.*, 2001). O efeito antinociceptivo é interpretado por uma diminuição do número de contorções.

No presente estudo foi possível observar a atividade antinociceptiva do PLS-G *domingensis*, visto que reduziu de forma significativa o número de contorções induzida pelo ácido acético. Semelhantemente, Costa *et al.*, (2020) utilizando o PLS da alga *Gracilaria intermedia* em seu trabalho, mostrou que ele foi capaz de diminuir as contorções induzidas pelo ácido acético de forma expressiva ($P < 0,05$) comprovando o seu efeito antinociceptivo. Na mesma perspectiva, Araújo *et al.*, (2011) através de seus achados com o PLS de *Solieria filiformis* demonstrou a redução de contorções abdominais e Chaves *et al.* (2013) relatou que o PLS da alga vermelha *Gracilaria caudata* também possui efeito eficaz na diminuição das contorções abdominais em camundongos. Diante deste resultado obtido no modelo de contorção, juntamente com os resultados obtidos nos experimentos de inflamação, pode-se sugerir que o PLS-G. *domngensis* tem um efeito antinociceptivo, e que dentre os mecanismos implicados na redução da contorção, está o seu efeito sobre mediadores inflamatórios e migração de neutrófilos em resposta ao ácido acético.

Posto que, o modelo em questão não apresenta uma especificidade satisfatória, buscou-se avaliar melhor o mecanismo de ação do PLS-G. *domingensis* na nocicepção a nível de sistema nervoso central e periférico, para tal foi realizado o modelo de formalina.

A resposta nociceptiva induzida pela formalina é caracterizada por duas fases que envolvem diferentes mecanismos, portanto pode relacionar-se a diferentes tipos de dor. A fase um é observada durante os cinco primeiros minutos após a aplicação do agente flogístico, que irá desencadear uma dor de origem neurogênica. A nocicepção nessa fase é resultado da estimulação química direta de nociceptores das fibras sensoriais aferentes, principalmente as fibras C, e pode ser suprimida por medicamentos opióides como a morfina. A segunda fase se inicia por volta de 20 minutos após a indução com o inflamógeno, nesta fase a dor é de origem inflamatória, e se desenvolve por uma combinação de diferentes estímulos de componentes da resposta inflamatória e de mecanismos de sensibilização nervosa (HUNSKAAR; FASMER; HOLE, 1985; SAEED-ABADI *et al.*, 2012).

Vários estudos demonstraram que na fase um deste modelo são liberadas principalmente substância P e a bradicinina e por isso drogas de ação central, tais como morfina, reduzem o tempo de lambertura de pata induzida por formalina nas duas fases. Já na segunda fase, os mediadores envolvidos são principalmente histamina, serotonina, aminoácidos excitatórios, prostaglandinas e bradicinina, mediadores que sofrem a ação de medicamentos como os AINEs (HUNSKAAR; FASMER; HOLE, 1985). Portanto,

compostos com características semelhantes aos AINEs quando testados neste modelo, possuem efeito inibidor de lambida de pata na segunada fase do teste de formalina.

Os resultados obtidos neste estudo são indicativos que o PLS-*G. domingensis* possui indícios de aliviar a dor neurogênica, pois apresentou uma redução no tempo de lambedura de pata nos animais em aproximadamente 27,32 %, e inflamatória com redução do tempo de lambedura de pata nos animais em aproximadamente 89,43 %, sugerindo que a atividade antinociceptiva pode ser devida, pelo menos em parte, à ação anti-inflamatória, visto que é notório a expressiva redução de lambidas de pata nos animais do grupo tratado com o PLS-*G. Domingensis*, efeito antinociceptivo semelhante ao apresentado pelo fármaco de referência, a morfina, que reduziu as lambidas de pata em 96,85 %.

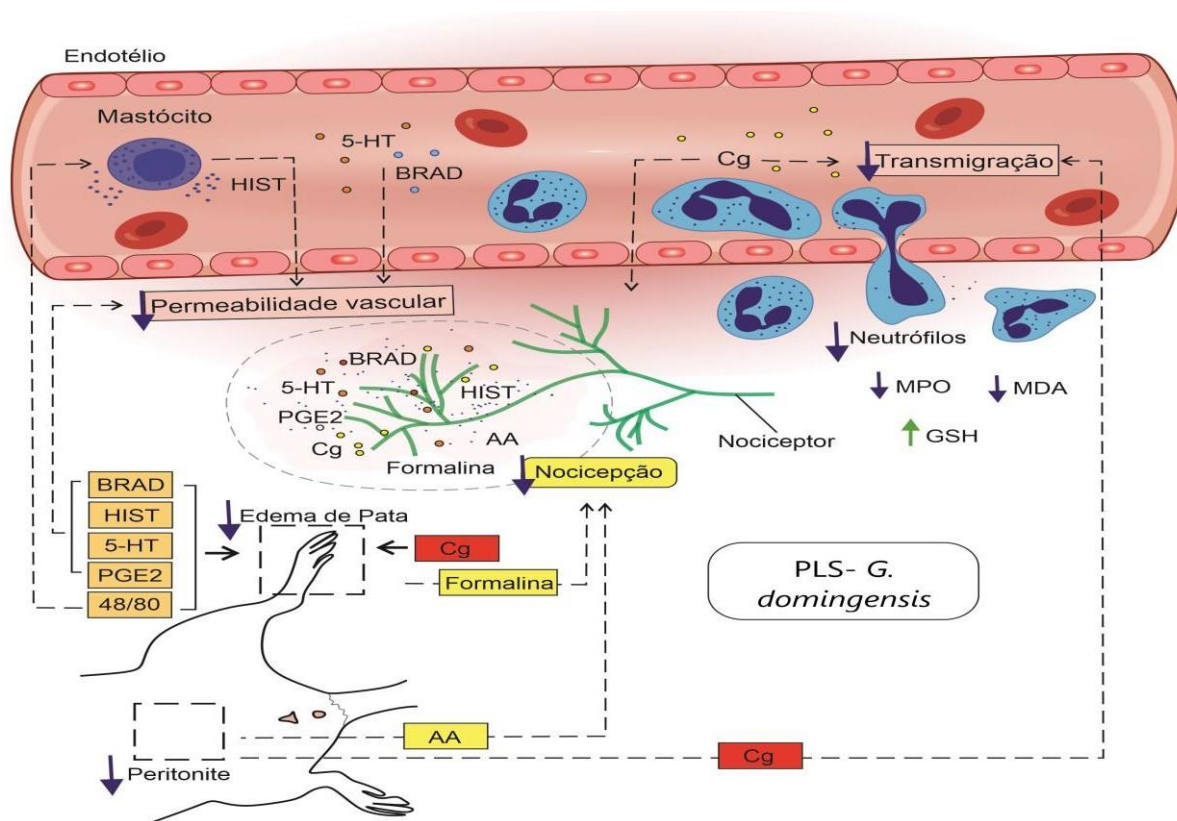
Estudos procurando esclarecer os mecanismos antinociceptivos, pelos quais os polissacarídeos extraídos de algas marinhas exercem os seus efeitos, mostraram que o PLS de *Digenea simplex* possui a capacidade de reduzir de forma significativa o tempo de lambedura de patas nos dois tempos do teste de formalina, como relatado por Pereira *et al.* (2014). Nos achados de Costa *et al.* (2020), o PLS de *Gracilaria intermedia* reduziu o tempo de lambedura de pata $p < 0,05$. Esses achados corroboram com os que foram encontrados no presente trabalho.

O efeito inibitório de PLS-*G. Domingensis* como mostrado anteriormente, foi mais expressivo na segunda fase do teste de formalina, o que está em conformidade com os resultados encontrados nos testes anti-inflamatórios, nos quais o PLS-*G. Domingensis* apresentou capacidade de inibição dos diferentes mediadores inflamatórios. Portanto, é possível inferir que o efeito antinociceptivo de PLS se deva principalmente à um mecanismo periférico.

7. CONCLUSÃO

O PLS-*G. domingensis* 10 mg/kg apresentou efeito antiedematogênico. É possível que seu mecanismo de atuação esteja envolvido na redução da atividade de componentes vasculares por diminuir os edemas de carragenina, histamina, 5-HT, bradicinina e PGE₂, por prevenir a degranulação de mastócitos induzida pelo composto 48/80, pela inibição da migração de neutrófilos e redução dos níveis de MDA com preservação dos níveis de GSH no exsudato peritoneal. Além disso, apresentou efeito antinociceptivo por diminuir as contorções induzidas por ácido acético e o tempo de lambida de pata induzida por formalina, mostrando ação principalmente através de mecanismos periféricos (Figura 13). Deste modo, os resultados do presente trabalho mostram que o PLS-*G. domingensis* apresenta propriedades anti-inflamatória e antinociceptiva.

Figura 13 - Mecanismo de ação do PLS-*G. domingensis*



Legenda – 48/80: composto 48/80; 5-HT: serotonina; AA: ácido acético; BRAD: bradicinina; Cg: carragenina; GSH: glutatona; HIST: histamina; MDA: malondialdeído; MPO: mieloperoxidase; PGE₂: prostaglandina E₂; PLS: polissacarídeo sulfatado

Fonte: Elaborado pelo autor, adaptado de Coura, 2011/ Hordijk, 2022.

8. REFERÊNCIAS

- ABDULKHALEQ, L. A. *et al.* The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. **Veterinary world**, v. 11, n. 5, p. 627, 2018.
- AGHASAFARI, P.; GEORGE, U.; PIDAPARTI, R. A review of inflammatory mechanism in airway diseases. **Inflammation research**, v. 68, p. 59-74, 2019.
- ALCOCK, M. M. Defining pain: past, present, and future. **Pain**, v. 158, n. 4, p. 761-762, 2017.
- ALESSANDRI, A. L. *et al.* Resolution of inflammation: mechanisms and opportunity for drug development. **Pharmacology & therapeutics**, v. 139, n. 2, p. 189-212, 2013.
- ANTONIO, M. A.; BRITO, A. R. M. S. Oral anti-inflammatory and anti-ulcerogenic activities of a hydroalcoholic extract and partitioned fractions of *Turnera ulmifolia* (Turneraceae). **Journal of ethnopharmacology**, v. 61, n. 3, p. 215-228, 1998.
- AYDEDE, M. Defending the IASP definition of pain. **The Monist**, v. 100, n. 4, p. 439-464, 2017.
- AZIZ, E. *et al.* An overview on red algae bioactive compounds and their pharmaceutical applications. **J Complement Integr Med**, jul., 2020.
- BANSKOTA, S.; GHIA, J.-E.; KHAN, W. I. Serotonin in the gut: Blessing or a curse. **Biochimie**, v. 161, p. 56-64, 2019.
- BARBOSA, A. L. R. *et al.* Tumor bearing decreases systemic acute inflammation in rats—role of mast cell degranulation. **Inflammation Research**, v. 58, p. 235-240, 2009.
- BATISTA, J. A. *et al.* Polysaccharide isolated from *Agardhiella ramosissima*: Chemical structure and anti-inflammation activity. **Carbohydrate polymers**, v. 99, p. 59-67, 2014.
- BEERMANN, S. *et al.* Histamine H1-and H4-receptor signaling cooperatively regulate MAPK activation. **Biochemical pharmacology**, v. 98, n. 3, p. 432-439, 2015.
- BELGHIT, I. *et al.* In-depth metabolic profile of marine macroalgae confirms strong biochemical differences between brown, red and green algae. **Algal Res**, v. 26, p. 240-249, 2017.
- BENJAMIN, C. F.; CARLINI, C. R.; BARJA-FIDALGO, C. Pharmacological characterization of rat paw edema induced by canatoxin, the toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds. **Toxicon**, v. 30, n. 8, p. 879-885, 1992.
- BERNELA, M. *et al.* Anti-inflammatory therapeutics: Conventional concepts and future with nanotechnology. **Recent Advances in Inflammation & Allergy Drug Discovery**, 2022.
- BESEDOVSKY, L.; LANGE, T.; HAACK, M. The sleep-immune crosstalk in health and disease. **Physiological reviews**, 2019.
- BINDER, M. D.; HIROKAWA, N.; WINDHORST, U. **Encyclopedia of neuroscience**. Berlin, Germany: Springer, 2009.

BINDU, S.; MAZUMDER, S.; BANDYOPADHYAY, U. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. **Biochemical pharmacology**, v. 180, p. 114147, 2020.

BLASER, H. *et al.* TNF and ROS crosstalk in inflammation. **Trends in cell biology**, v. 26, n. 4, p. 249-261, 2016.

BLEAKLEY, S.; HAYES, M. Algal Proteins: Extraction, Application, and Challenges Concerning Production. **Foods**, v. 6, n. 5, p. 33, 2017.

BOZZA, M. T. *et al.* The role of MIF on eosinophil biology and eosinophilic inflammation. **Clinical reviews in allergy & immunology**, v. 58, p. 15-24, 2020.

BRADLEY, P. P. *et al.* Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal of investigative dermatology**, v. 78, n. 3, p. 206-209, 1982.

BRANCO, A. C. C. C. *et al.* Role of histamine in modulating the immune response and inflammation. **Mediators of inflammation**, v. 2018, 2018.

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. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, n. 5, p. 724-733, 2013.

BRITO, T. V. *et al.* Sulfated polysaccharide from the marine algae *Hypnea musciformis* inhibits TNBS-induced intestinal damage in rats. **Carbohydrate polymers**, v. 151, p. 957-964, 2016.

BRITO, T. V. *et al.* Sulfated-polysaccharide fraction extracted from red algae *Gracilaria birdiae* ameliorates trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis in rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 66, n. 8, p. 1161-1170, 2014.

BRUMMETT, C.; CLAUW, D. J. Fibromyalgia and centralized pain states. In: **Essentials of Pain Medicine**. Elsevier, p. 213-222, 2018.

BUENO J. R.; REUBEN A.; NEUMEISTER; M. W. Pain Management in Plastic Surgery An Issue of Clinics in Plastic Surgery. **Elsevier Health Sciences**, 2020.

CALDER, P. C. Eicosanoids. **Essays in Biochemistry**, v. 64, n. 3, p. 423-441, 2020.

CALIXTO, J. B. *et al.* Kinins in pain and inflammation. **Pain**, v. 87, n. 1, p. 1-5, 2000.

CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. Involvement of B1 and B2 receptors in bradykinin-induced rat paw oedema. **British journal of pharmacology**, v. 114, n. 5, p. 1005- 1013, 1995.

CASH, J. L.; WHITE, G. E.; GREAVES, D. R. Zymosan-induced peritonitis as a simple experimental system for the study of inflammation. **Methods in enzymology**, v. 461, p. 379-396, 2009.

CASTANHEIRA, F. V. S.; KUBES, P. Neutrophils and NETs in modulating acute and chronic inflammation. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 133, n. 20, p. 2178-2185, 2019.

CHATTERJEE, S. Oxidative stress, inflammation, and disease. In: **Oxidative stress and biomaterials**. Academic Press, p. 35-58, 2016.

CHAVES, L. S. *et al.* Antiinflammatory and antinociceptive effects in mice of a sulfated polysaccharide fraction extracted from the marine red algae *Gracilaria caudata*. **Immunopharmacology and immunotoxicology**, v. 35, n. 1, p. 93-100, 2013.

CHEN, J. S.; KANDLE, P. F.; MURRAY I. *et al.* Physiology, Pain. [Updated 2022 Jul 25]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): **StatPearls Publishing**, 2022.

CHEN, O.; DONNELLY, C. R.; JI, R. R. Regulation of pain by neuro-immune interactions between macrophages and nociceptor sensory neurons. **Current opinion in neurobiology**, v. 62, p. 17-25, 2020.

CHENG, H. *et al.* Role of prostaglandin E2 in tissue repair and regeneration. **Theranostics**, v. 11, n. 18, p. 8836, 2021.

CHOI, S. I.; HWANG, S. W. Depolarizing effectors of bradykinin signaling in nociceptor excitation in pain perception. **Biomolecules & therapeutics**, v. 26, n. 3, p. 255, 2018.

CHU, D. *et al.* Neutrophil-based drug delivery systems. **Advanced materials**, v. 30, n. 22, p. 1706245, 2018.

CICINSKAS, E. *et al.* In vitro antitumor and immunotropic activity of carrageenans from red algae *Chondrus armatus* and their low-molecular weight degradation products. **J Biomed Mater Res A**, v. 108, n. 2, p. 254-266, fev. 2020.

COSTA, L. E. C. *et al.* Chemical structure, anti-inflammatory and antinociceptive activities of a sulfated polysaccharide from *Gracilaria intermedia* algae. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 159, p. 966-975, 2020.

COSTA, L. E. C. **Fração polissacarídica extraída da alga vermelha *Gracilaria intermedia*: atividade anti-inflamatória e antinociceptiva**. 80f. Dissertação de Mestrado. 2014.

COTAS, J. *et al.* A comprehensive review of the nutraceutical and therapeutic applications of red seaweeds (*Rhodophyta*). **Life**, v. 10, n. 19, 2020.

COURA, C. O. Atividades antinociceptiva e antiinflamatória dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Gracilaria cornea* J. Agardh. 2011, 123 f. **Dissertação (Mestrado em Bioquímica)** - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

COURA, C. O. *et al.* Mechanisms involved in the anti-inflammatory action of a polysulfated fraction from *Gracilaria cornea* in rats. **PloS one**, v. 10, n. 3, p. e0119319, 2015.

CUI, J.; JIA, J. Natural COX-2 inhibitors as promising anti-inflammatory agents: an update. **Current medicinal chemistry**, v. 28, n. 18, p. 3622-3646, 2021.

DALAL, P. J.; MULLER, W. A.; SULLIVAN, D. P. Endothelial cell calcium signaling during barrier function and inflammation. **The American journal of pathology**, v. 190, n. 3, p. 535-542, 2020.

DAS, V. An introduction to pain pathways and pain “targets”. **Progress in molecular biology and translational science**, v. 131, p. 1-30, 2015.

DE SOUSA, A. K. *et al.* Polysaccharides from macro algae: Anti-inflammatory actions against systemic inflammatory process and in the gastrointestinal tract. **Journal of Applied Phycology**, p. 1-15, 2022.

DE SOUZA, G. E. P.; FERREIRA, S. H. Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. **Agents and Actions**, v. 17, p. 97-103, 1985.

DENG, W. *et al.* The Role of Natural Products in Chronic Inflammation. **Frontiers in Pharmacology**, p. 1521, 2022.

DESANTANA, J. M. *et al.* Tradução para a língua portuguesa da definição revisada de dor pela Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor. **BrJP**, v. 3, n. 3, p. 197-8, 2020.

DI CARLO, M.; SMERILLI, G.; SALAFFI, F. Mechanisms and Mediators of Pain in Chronic Inflammatory Arthritis. **Current Treatment Options in Rheumatology**, v. 7, p. 194-207, 2021.

DRAY, A.; PERKINS, M. Kinins and pain. In: Farmer SG, editor. *The Handbook of Immunopharmacology: The Kinin System*. **London: Academic Press**, 157–172, 1997.

ELBANDY, M. Anti-Inflammatory Effects of Marine Bioactive Compounds and Their Potential as Functional Food Ingredients in the Prevention and Treatment of Neuroinflammatory Disorders. **Molecules**, v. 28, n. 1, p. 2, 2022.

FEEHAN, K. T.; GILROY, D. W. Is resolution the end of inflammation?. **Trends in molecular medicine**, v. 25, n. 3, p. 198-214, 2019.

FERRER, M. D. *et al.* Cyclooxygenase-2 inhibitors as a therapeutic target in inflammatory diseases. **Current medicinal chemistry**, v. 26, n. 18, p. 3225-3241, 2019.

FILIPPI, M. D. Neutrophil transendothelial migration: updates and new perspectives. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 133, n. 20, p. 2149-2158, 2019.

FILIPPI, M.D. Mechanism of diapedesis: importance of the transcellular route. **Advances in immunology**, v. 129, p. 25-53, 2016.

FINNERUP, N. B.; KUNER, R.; JENSEN, T. S. Neuropathic pain: from mechanisms to treatment. **Physiological reviews**, 2020.

FITZGERALD, G. A.; RICCIOTTI, E. Prostaglandins and inflammation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 31, n. 5, p. 986-1000, 2011.

FOLCI, M. *et al.* Eosinophils as major player in type 2 inflammation: autoimmunity and beyond. **Cell Biology and Translational Medicine, Volume 14: Stem Cells in Lineage Specific Differentiation and Disease**, p. 197-219, 2021.

GALVÃO, I. *et al.* Mediators of inflammation. **Immunopharmacology and inflammation**, p. 3-32, 2018.

GANDHI, G. R. *et al.* Anti-inflammatory natural products as potential therapeutic agents of rheumatoid arthritis: A systematic review. **Phytomedicine**, v. 93, p. 153766, 2021.

GAWEL, S. *et al.* Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker. **Wiadomosci lekarskie (Warsaw, Poland: 1960)**, v. 57, n. 9-10, p. 453-455, 2004.

GERMOLEC, D. R. *et al.* Markers of inflammation. **Immunotoxicity Testing: Methods and Protocols**, p. 57-79, 2018.

GOES, V. N. *et al.* Aplicabilidade do Alecrim (*Rosmarinus officinalis*) como potencial fitoterápico em Odontologia: uma revisão da literatura. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, v. 9, n. 7, p. e645974767, 2020.

GOUVEA, N. N. **O genoma da alga vermelha *Gracilaria domingensis* (Rhodophyta, Gracilariales)**. 74f. 2022. Dissertação de Mestrado – Programa Interunidades de Pós-Graduação em Bioinformática – Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, 2022.

GUEDES, M. *et al.* Potent antioxidant and anti-inflammatory bioactivities of fish roe-derived extracts. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 82, p. 103198, 2022.

GUIMARÃES, M.; PLASTINO, E. M.; OLIVEIRA, E. C. Life history, reproduction and growth of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta) from Brazil. 1999.

GUIRY, G. M. Publicação eletrônica mundial. National University of Ireland, Galway, **AlgaeBase**, 12 de abril de 2021. <https://www.algaebase.org>; pesquisado em 29 de janeiro de 2023.

HAMEY, F. K. *et al.* Single-cell molecular profiling provides a high-resolution map of basophil and mast cell development. **Allergy**, v. 76, n. 6, p. 1731-1742, 2021.

HOEGH, M. Pain science in practice (part 3): peripheral sensitization. **Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy**, v. 52, n. 6, p. 303-306, 2022.

HOFMAN, Z. *et al.* Bradykinin: inflammatory product of the coagulation system. **Clinical reviews in allergy & immunology**, v. 51, p. 152-161, 2016.

HORDIJK, P. L. The tension rises in leukocyte extravasation. **Blood**, v. 21, p. 165-166, 2022.

HUNSKAAR, S.; FASMER, O. B.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **Journal of neuroscience methods**, v. 14, n. 1, p. 69-76, 1985.

HUSSAIN, T. *et al.* Oxidative stress and inflammation: what polyphenols can do for us?. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016, 2016.

HUWAIT, E.; AL-SAEDI, D. A.; MIRZA, Z. Anti-inflammatory potential of fucoidan for atherosclerosis: in silico and in vitro studies in THP-1 cells. **Molecules**, v. 27, n. 10, p. 3197, 2022.

HYOUNG, P. S.; LEE, C. R.; HONG, S. K. Implications of agar and agarase in industrial applications of sustainable marine biomass. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 104, n. 7, p. 2815-2832, 2020.

IASP. **IASP terminology**. 2017. Disponível em: <<https://www.iasp-pain.org/resources/terminology/?ItemNumber=1698>>. Acesso em: 16 de janeiro de 2019.

JAGUSCH, H. *et al.* 14, 17, 18-Trihydroxy-Eicosatetraenoic Acid: A Novel Pro-Resolving Lipid Mediator from Marine Microalgae. **ACS Pharmacology & Translational Science**, v. 4, n. 3, p. 1188-1194, 2021.

JAGUSCH, H.; BAUMEISTER, T. U. H.; POHNERT, G. Mammalian-Like Inflammatory and Pro-Resolving Oxylipins in Marine Algae. **ChemBioChem**, v. 21, n. 17, p. 2419-2424, 2020.

JESUS, A *et al.* Isolation and Potential Biological Applications of Haloaryl Secondary Metabolites from Macroalgae. **Mar Drugs**, v. 17, n. 2, p. 3, 2019.

Ji, R. R.; CHAMESSIAN, A.; ZHANG, Y. Q. Pain regulation by non-neuronal cells and inflammation. **Science**, v. 354, n. 6312, p. 572-577, 2016.

JIAO, G. *et al.* Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. **Marine drugs**, v. 9, n. 2, p. 196-223, 2011.

JÚNIOR, G. J. D. *et al.* Macromolecule extracted from *Gracilaria caudata* reduces inflammation and restores hepatic function in nimesulide-induced hepatic damage. **Journal of applied phycology**, v. 32, p. 1511-1520, 2020.

JUTEL, M.; BLASER, K.; AKDIS, C. A. The role of histamine in regulation of immune responses. **Allergy and Asthma in Modern Society: A Scientific Approach**, v. 91, p. 174-187, 2006.

KARKUCINSKA-WIECKOWSKA, A. *et al.* Mitochondria, oxidative stress and nonalcoholic fatty liver disease: A complex relationship. **European journal of clinical investigation**, v. 52, n. 3, p. e13622, 2022.

KASSIANIDES, X.; WHITE, S.; BHANDARI, S. Markers of Oxidative Stress, Inflammation and Endothelial Function following High-Dose Intravenous Iron in Patients with Non-Dialysis-Dependent Chronic Kidney Disease—A Pooled Analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 24, p. 16016, 2022.

KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase: friend and foe. **Journal of leukocyte biology**, v. 77, n. 5, p. 598-625, 2005.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature reviews immunology**, v. 13, n. 3, p. 159-175, 2013.

KRAGEL, P. A. *et al.* Representation, pattern information, and brain signatures: from neurons to neuroimaging. **Neuron**, v. 99, n. 2, p. 257-273, 2018.

KRATOFIL, R. M. *et al.* A monocyte–leptin–angiogenesis pathway critical for repair post-infection. **Nature**, v. 609, n. 7925, p. 166-173, 2022.

KRATOFIL, R. M.; KUBES, P.; DENISET, J. F. Monocyte conversion during inflammation and injury. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 37, n. 1, p. 35-42, 2017.

KULKARNI, S. K.; MEHTA, A. K.; KUNCHANDY, J. Anti-inflammatory actions of clonidine, guanfacine and B-HT 920 against various inflammagen-induced acute paw oedema in rats. **Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie**, v. 279, n. 2, p. 324-334, 1986.

KUMAR, V. *et al.* **Robbins patologia básica**. Elsevier Brasil, 2008.

LEE, G. I.; NEUMEISTER, M. W. Pain: Pathways and physiology. **Clinics in plastic surgery**, v. 47, n. 2, p. 173-180, 2020.

LEITE, F. C. *et al.* Curine, an alkaloid isolated from *Chondrodendron platyphyllum* inhibits prostaglandin E2 in experimental models of inflammation and pain. **Planta medica**, v. 80, n. 13, p. 1072-1078, 2014.

LIAO, H. *et al.* Novel reactivation and degranulation of mast cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 127, p. 110157, 2020.

LIMA-FILHO, J. V. *et al.* Antibacterial activity of extracts of six macroalgae from the northeastern brazilian coast. **Brazilian journal of Microbiology**, v. 33, p. 311-314, 2002.

LIU, N. *et al.* The mechanism of secretion and metabolism of gut-derived 5-hydroxytryptamine. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 15, p. 7931, 2021.

MACHADO, Matilde de Albuquerque Veloso. **Organismos Marinhos como Fonte de Novos Fármacos**. 33f. Tese de Doutorado. Portugal, Universidade de Lisboa-Portugal, 2019.

MARGRAF, A.; LOWELL, Clifford A.; ZARBOCK, A. Neutrophils in acute inflammation: current concepts and translational implications. **Blood**, v. 139, n. 14, p. 2130-2144, 2022.

MARINHO-SORIANO E.; CARNEIRO M. A. A. Macroalgas marinhas: biologia, ecologia e importância econômica. In: Viana, DL; Oliveira, JEL; Hazin, F.H.V.; et. al. 1 ed., Ciências do Mar: dos oceanos do mundo ao Nordeste do Brasil, Recife: Via Design Publicações, p. 91-119, 2021.

MARTINEZ, F. O.; GORDON, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. **F1000prime reports**, v. 6, 2014.

MARTINS, T.; FONSECA, B. M.; REBELO, I. Antioxidant effects of chalcones during the inflammatory response: an overall review. **Current Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 37, p. 7658-7713, 2021.

MCCARTNEY, C. J. L.; TREMBLAY, S. Chronic pain after surgery. In: **Essentials of pain medicine**. Elsevier, p. 147-154, 2018.

MEIZLISH, M. L. *et al.* Tissue homeostasis and inflammation. **Annual review of immunology**, v. 39, p. 557-581, 2021.

MENAA, F. et. al. Ecological and Industrial Implications of Dynamic Seaweed-Associated Microbiota Interactions. **Mar. Drugs**, v. 18, p. 641, 2020.

MESQUITA, J. X. *et al.* Lectin from red algae *Amansia multifida* Lamouroux: Extraction, characterization and anti-inflammatory activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 170, p. 532-539, 2021.

MICHAEL, M.; VERMEREN, S. A neutrophil-centric view of chemotaxis. **Essays in biochemistry**, v. 63, n. 5, p. 607-618, 2019.

MITCHELL, J. A.; KIRKBY, N. S. Eicosanoids, prostacyclin and cyclooxygenase in the cardiovascular system. **British journal of pharmacology**, v. 176, n. 8, p. 1038-1050, 2019.

MOHSIN, S.; KURUP, G. M. Mechanism underlying the anti-inflammatory effect of sulphated polysaccharide from *Padina tetrastromatica* against carrageenan induced paw edema in rats. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 1, n. 4, p. 294-301, 2011.

- MONTANHER, A. B. *et al.* Evidence of anti-inflammatory effects of *Passiflora edulis* in an inflammation model. **Journal of ethnopharmacology**, v. 109, n. 2, p. 281-288, 2007.
- MONTINARI, M. R.; MINELLI, S.; DE CATERINA, R. The first 3500 years of aspirin history from its roots—A concise summary. **Vascular pharmacology**, v. 113, p. 1-8, 2019.
- MOORE, C. *et al.* Regulation of pain and itch by TRP channels. **Neuroscience bulletin**, v. 34, p. 120-142, 2018.
- MORRIS, C. J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. Inflammation Protocols. Edited by: **Winyard PG, Wiloughby DA**. 2003.
- MORRIS, G. *et al.* Redox regulation of the immune response. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 19, n. 10, p. 1079-1101, 2022.
- MOTA, D. M.; VIGO, A.; KUCHENBECKER, R. S. Reações adversas a medicamentos no sistema de farmacovigilância do Brasil, 2008 a 2013: estudo descritivo. **Cad. Saúde Pública**, v. 35, n. 8, 2019.
- MUHAMAD, I. I. *et al.* Bioactive algal-derived polysaccharides: Multi-functionalization, therapeutic potential and biomedical applications. **Current pharmaceutical design**, v. 25, n. 11, p. 1147-1162, 2019.
- NAGAMALLA, L. *et al.* In-silico study of seaweed secondary metabolites as AXL kinase inhibitors. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 29, n. 2, p. 689-701, 2022.
- NAGLE, V. *et al.* Marine red alga *Porphyridium* sp. as a source of sulfated polysaccharides (SPs) for combating against COVID-19. 2020.
- NAKAMURA-GOUVEA, N. *et al.* Insights into agar and secondary metabolite pathways from the genome of the red alga *Gracilaria domingensis* (Rhodophyta, Gracilariales). **Journal of Phycology**, v. 58, n. 3, p. 406-423, 2022.
- NAUSEEF, W. M.; BORREGAARD, N. Neutrophils at work. **Nature immunology**, v. 15, n. 7, p. 602-611, 2014.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **J Nat Prod.**, v. 27, p.770-803, 2020.
- NORE, K. G. *et al.* Elevated levels of anti-inflammatory eicosanoids and monocyte heterogeneity in *Mycobacterium tuberculosis* infection and disease. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 579849, 2020.
- O'MAHONY, L.; AKDIS, M.; AKDIS, C. A. Regulation of the immune response and inflammation by histamine and histamine receptors. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 128, n. 6, p. 1153-1162, 2011.
- OLIVEIRA, M. M. C. *et al.* Adverse reactions to nonsteroidal Anti-Inflammatory drugs (NSAIDS) in Brazil: a systematic review. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 7, n. 6, p. 54653-54661, jun. 2021.
- PANIGRAHY, D. *et al.* Resolution of inflammation: An organizing principle in biology and medicine. **Pharmacology & therapeutics**, v. 227, p. 107879, 2021.

- PAPAYANNOPOULOS, V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. **Nat Rev Immunol**, 18, 134-147, 2018.
- PAULINO, N. *et al.* Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis. **European Journal of Pharmacology**, v. 587, n. 1-3, p. 296-301, 2008.
- PETRI, B.; SANZ, M. J. Neutrophil chemotaxis. **Cell and tissue research**, v. 371, p. 425-436, 2018.
- PINTO, L. G.; SOUZA, G. R.; KUSUDA, R. *et al.* Non-peptidergic nociceptive neurons are essential for mechanical inflammatory hypersensitivity in mice. **Mol Neurobiol**, v. 56, p. 5715–5728 2019.
- PIRAHANCHI, Y.; SHARMA, S. Physiology, Bradykinin. **StatPearls Publishing**, 2019.
- POLUHA, R. L.; GROSSMANN, E. Inflammatory mediators related to arthrogenic temporomandibular dysfunctions. **BrJP**, v. 1, p. 60-65, 2018.
- POSADAS, I. *et al.* Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **British journal of pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 331-338, 2004.
- PRADHAN, B. *et al.* Multifunctional role of fucoidan, sulfated polysaccharides in human health and disease: A journey under the sea in pursuit of potent therapeutic agents. **International journal of biological macromolecules**, v. 164, p. 4263-4278, 2020.
- QADRI, F.; BADER, M. Kinin B1 receptors as a therapeutic target for inflammation. **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 22, n. 1, p. 31-44, 2018.
- RAFFAELI, W.; ARNAUDO, E. Pain as a disease: an overview. **Journal of pain research**, p. 2003-2008, 2017.
- RAJA, S. N. *et al.* Definição revisada de dor pela Associação Internacional para o Estudo da Dor: conceitos, desafios e compromissos. **Associação Internacional para o estudo da dor (IASP)**, 2020.
- RAJAN, M. S. A. *et al.* Advance research in biomedical applications on marine sulfated polysaccharide. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2021.
- RAMOS-ROMERO, S. *et al.* Edible Microalgae and Their Bioactive Compounds in Prevention and Treatment of Metabolic Changes. **Nutrients**, v. 13, p. 563, 2021.
- RANG, H. P.; DALE, M. M. Farmacologia. **Editora Elsevier**, 8ª edição, 2016.
- RANKIN, J. A. Biological mediators of acute inflammation. **AACN Advanced Critical Care**, v. 15, n. 1, p. 3-17, 2004.
- RAPOSO, M. F. J.; DE MORAIS, A. M. M. B.; DE MORAIS, R. M. S. C. Bioactivity and applications of polysaccharides from marine microalgae. **Polysaccharides: bioactivity and biotechnology**, p. 1683-1727, 2014.
- RECASENS, M.; RICART, W.; FERNÁNDEZ-REAL, J. M. Obesidad e inflamación. **Rev Med Univ Navarra**, v. 48, n. 2, p. 49-54, 2004.

REN, X. et. al. Marine natural products: a potential source of anti-hepatocellular. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, p. 7879-7899, 2021.

RIBEIRO, R. A. *et al.* Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **European journal of pharmacology**, v. 387, n. 1, p. 111-118, 2000.

RINGKAMP, M.; DOUGHERTY, P. M.; RAJA, S. N. Anatomy and physiology of the pain signaling process. In: **Essentials of pain medicine**. Elsevier, p. 3-10, 2018.

ROBB, C. T. *et al.* Non-steroidal anti-inflammatory drugs, prostaglandins, and COVID-19. **British Journal of pharmacology**, v. 177, n. 21, p. 4899-4920, 2020.

ROCHA, D. H. A.; SECA, A. M. L.; PINTO, D. C. G. A. Seaweed secondary metabolites in vitro and in vivo anticancer activity. **Marine drugs**, v. 16, n. 11, p. 410, 2018.

ROGERIO, A. P. *et al.* The role of lipids mediators in inflammation and resolution. **BioMed research international**, v. 2015, 2015.

ROSA, G. P. *et al.* Seaweed secondary metabolites with beneficial health effects: An overview of successes in in vivo studies and clinical trials. **Marine drugs**, v. 18, n. 1, p. 8, 2019.

SAEED-ABADI, S. *et al.* Effects of Papaver rhoeas (L.) extract on formalin-induced pain and inflammation in mice. **Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS**, v. 15, n. 21, p. 1041-1044, 2012.

SAMPATH, P. *et al.* Monocyte subsets: phenotypes and function in tuberculosis infection. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 1726, 2018.

SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. Mast cell involvement in the rat paw oedema response to 1, 8-cineole, the main constituent of eucalyptus and rosemary oils. **European journal of pharmacology**, v. 331, n. 2-3, p. 253-258, 1997.

SANTOS, P. S. **Potencial antibiótico, antioxidante e teste de letalidade frente *Artemia salina* de extratos de *Gracilaria* (Rhodophyta, Gracilariales)**. 76f. Dissertação de Mestrado. 2015.

SANTOS, S. A. O. et. al. The Quest for Phenolic Compounds from Macroalgae: A Review of Extraction and Identification Methodologies. **Biomolecules**, v. 9, n. 12, p. 847, dez./2019.

SARASOLA, M. P. *et al.* Histamine in cancer immunology and immunotherapy. Current status and new perspectives. **Pharmacology Research & Perspectives**, v. 9, n. 5, p. e00778, 2021.

SCHEMANN, M. *et al.* The mast cell degranulator compound 48/80 directly activates neurons. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e52104, 2012.

SCHIRMER, B.; NEUMANN, D. The function of the histamine H4 receptor in inflammatory and inflammation-associated diseases of the gut. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 11, p. 6116, 2021.

SCHJERNING, A. M.; MCGETTIGAN, P.; GISLASON, G. Cardiovascular effects and safety of (non-aspirin) NSAIDs. **Nature Reviews Cardiology**, v. 17, n. 9, p. 574-584, 2020.

SCHMIDT, M. *et al.* Cardiovascular risks of non-steroidal anti-inflammatory drugs treatment. **Ugeskrift for Laeger**, v. 178, n. 52, p. V08160612-V08160612, 2016.

SEPIASHVILI, R. I.; BALMASOVA, I. P.; STAURINA, L. N. Serotonin and its immune and physiological effects. **Rossiiskii fiziologicheskii zhurnal imeni IM Sechenova**, v. 99, n. 1, p. 17-32, 2013.

SERHAN, C. N. *et al.* Resolvins in inflammation: emergence of the pro-resolving superfamily of mediators. **The Journal of clinical investigation**, v. 128, n. 7, p. 2657-2669, 2018.

SERHAN, C. N. Treating inflammation and infection in the 21st century: new hints from decoding resolution mediators and mechanisms. **The FASEB Journal**, v. 31, n. 4, p. 1273, 2017.

SHAJIB, M. S.; KHAN, W. I. The role of serotonin and its receptors in activation of immune responses and inflammation. **Acta physiologica**, v. 213, n. 3, p. 561-574, 2015.

SHIKOV, A. N. *et al.* Farmacocinética de drogas derivadas do mar. **Mar. Drugs**, v. 18, p. 557, 2020.

SILVA, C. R. O.; OLIVEIRA, G. F.; OLIVEIRA, J. A. P. Fitoterápicos: uma alternativa para o tratamento odontológico.

SILVA, M. M. *et al.* O uso crônico de anti-inflamatórios não-esteroidais e seus efeitos adversos. **Cadernos da Medicina-UNIFESO**, v. 2, n. 2, 2019.

SILVA, R. O. *et al.* A sulfated-polysaccharide fraction from seaweed *Gracilaria birdiae* prevents naproxen-induced gastrointestinal damage in rats. **Marine drugs**, v. 10, n. 12, p. 2618-2633, 2012.

SILVA, R. O. *et al.* Polysaccharide fraction isolated from *P. assiflora edulis* inhibits the inflammatory response and the oxidative stress in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 67, n. 7, p. 1017-1027, 2015.

SOARES, L. P. Diversidade das rodofíceas marinhas bentônicas do estado do Ceará, Brasil, baseada em evidências morfológicas e moleculares. **Tese de Doutorado**. Doctoral Thesis, Instituto de Botânica, São Paulo, 2015.

SOPACUA, M. *et al.* Small-fiber neuropathy: expanding the clinical pain universe. **Journal of the Peripheral Nervous System**, v. 24, n. 1, p. 19-33, 2019.

SOUSA, S. G. *et al.* Chemical structure and anti-inflammatory effect of polysaccharide extracted from *Morinda citrifolia* Linn (Noni). **Carbohydrate Polymers**, v. 197, p. 515-523, 2018.

SOUZA, G. E. P. *et al.* Neutrophil migration induced by inflammatory stimuli is reduced by macrophage depletion. **Agents and Actions**, v. 24, p. 377-380, 1988.

SPECTOR, W. G. The mediation of altered capillary permeability in acute inflammation. **The Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 72, n. 2, p. 367-380, 1956.

STURTZEL, C. Endothelial cells. **The Immunology of Cardiovascular Homeostasis and Pathology**, p. 71-91, 2017.

SUGIMOTO, M. A. *et al.* Mediators of the resolution of the inflammatory response. **Trends in immunology**, v. 40, n. 3, p. 212-227, 2019.

SUN, H. *et al.* Using PAMPs and DAMPs as adjuvants in cancer vaccines. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 17, n. 12, p. 5546-5557, 2021.

SUZUKI, Koji; TERASAWA, Masahiro. Biological activities of Rhamnan sulfate extract from the green algae *Monostroma nitidum* (Hitoegusa). **Marine Drugs**, v. 18, n. 4, p. 228, 2020.

SWITZER, C. H.; FUKUTO, J. M. The antioxidant and oxidant properties of hydropersulfides (RSSH) and polysulfide species. **Redox Biology**, v. 57, p. 102486, 2022.

TALARICO, L. B. *et al.* The antiviral activity of sulfated polysaccharides against dengue virus is dependent on virus serotype and host cell. **Antiviral research**, v. 66, n. 2-3, p. 103-110, 2005.

TANNA, B.; MISHRA, A. Nutraceutical Potential of Seaweed Polysaccharides: Structure, Bioactivity, Safety, and Toxicity. **Compr Rev Food Sci Food Saf**, v. 18, n. 3, pág. 817-831, mar., 2019.

TASNEEM, S. *et al.* Molecular pharmacology of inflammation: Medicinal plants as anti-inflammatory agents. **Pharmacological research**, v. 139, p. 126-140, 2019.

TINNIRELLO, A.; MAZZOLENI, S.; SANTI, C. Chronic pain in the elderly: mechanisms and distinctive features. **Biomolecules**, v. 11, n. 8, p. 1256, 2021.

TORRES, P. *et al.* A comprehensive review of traditional uses, bioactivity potential, and chemical diversity of the genus *Gracilaria* (Gracilariales, Rhodophyta). **Algal Research**, v. 37, p. 288-306, jan./2019.

TRACY, R. P. The five cardinal signs of inflammation: calor, dolor, rubor, tumor... and penuria (apologies to Aulus Cornelius Celsus, De medicina, c. AD 25). **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 61, n. 10, p. 1051-1052, 2006.

TRIGUEIRO, T. G. *et al.* Cultivo de três linhagens coloridas de *Gracilaria domingensis* em sistema orgânico integrado. **Int. Aquat. Res.**, v. 9, p. 225-233, 2017.

TSAI, C. F. *et al.* Regulatory effects of quercetin on M1/M2 macrophage polarization and oxidative/antioxidative balance. **Nutrients**, v. 14, n. 1, p. 67, 2021.

TSIKAS, D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. **Analytical biochemistry**, v. 524, p. 13-30, 2017.

TSOLAKI, M. Future strategies of management of Alzheimer's Disease. The role of homotaurine. **Hell J Nucl Med**, v. 22, Suppl:82-94, jan./abr., 2019.

VASCONCELOS, R. M. C. *et al.* Synthesis, acute toxicity and anti-inflammatory effect of bornyl salicylate, a salicylic acid derivative. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 34, n. 6, p. 1028-1038, 2012.

VERÍSSIMO, A. C. S. *et al.* Secondary metabolites from marine sources with potential use as leads for anticancer applications. **Molecules**, v. 26, n. 14, p. 4292, 2021.

VIEIRA, E. F. *et al.* Algas marinhas da costa portuguesa como fonte de material proteico: Perfil da composição de aminoácidos totais e livres. **Química alimentar**, v. 269, p. 264-275, 2018.

VINEGAR, R. *et al.* Pathway to carrageenan-induced inflammation in the hind limb of the rat. In: **Federation proceedings**. p. 118-126, 1987.

WASSIE, T. *et al.* Extraction techniques, biological activities and health benefits of marine algae *Enteromorpha prolifera* polysaccharide. **Frontiers in nutrition**, v. 8, p. 747928, 2021.

WECHSLER, M. E. *et al.* Eosinophils in health and disease: a state-of-the-art review. In: **Mayo Clinic Proceedings**. Elsevier, p. 2694-2707, 2021.

WINTER, C. A.; FISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Procedure for anti-inflammatory activity. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 11, p. 544-547, 1962.

WU, H. *et al.* Beyond a neurotransmitter: The role of serotonin in inflammation and immunity. **Pharmacological Research**, v. 140, p. 100-114, 2019.

XING, R. *et al.* Antioxidant activity of differently regioselective chitosan sulfates in vitro. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 13, n. 4, p. 1387-1392, 2005.

YAMAGUCHI, A.; BOTTA, E.; HOLINSTAT, M. Eicosanoids in inflammation in the blood and the vessel. **Frontiers in Pharmacology**, p. 3973, 2022.

YÁÑEZ, A. *et al.* Granulocyte-monocyte progenitors and monocyte-dendritic cell progenitors independently produce functionally distinct monocytes. **Immunity**, v. 47, n. 5, p. 890-902, 2017.

YAO, C.; NARUMIYA, S. Prostaglandin-cytokine crosstalk in chronic inflammation. **British journal of pharmacology**, v. 176, n. 3, p. 337-354, 2019.

YE, H. *et al.* Hypoglycemic activity and mechanism of the sulfated rhamnose polysaccharides chromium (III) complex in type 2 diabetic mice. **Bioorganic Chemistry**, v. 88, p. 102942, 2019.

YUAN, Q. *et al.* Isolation, structures and biological activities of polysaccharides from *Chlorella*: A review. **Int J Biol Macromol**, v. 163, p. 2199-2209, nov., 2020.

YUNNA, C. *et al.* Macrophage M1/M2 polarization. **European journal of pharmacology**, v. 877, p. 173090, 2020.

ZHONG, H. *et al.* The Structural Characteristics of Seaweed Polysaccharides and Their Application in Gel Drug Delivery Systems. **Mar Drugs**, v. 18, n. 12, pág. 658, dez., 2020.

ZINDEL, J.; KUBES, P. DAMPs, PAMPs, and LAMPs in immunity and sterile inflammation. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 15, p. 493-518, 2020.

ANEXO 1



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
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 "*Efeito antinociceptivo e anti-inflamatório de polissacarídeos modificados da macroalga Gracilaria domingensis em modelos farmacológicos clássicos de inflamação aguda em camundongos*", registrada nº 480/18, sob a responsabilidade do Prof. Dr. ANDRÉ LUIZ DOS REIS BARBOSA do 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 **24/08/2018**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	Novembro/ 2018 à Dezembro/ 2020
Espécie/Linhagem/raça	Camundongo heterogênico/Swiss
Nº de Animais	626
Peso/ Idade	25-30g
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Central da UFPI.

Teresina, 24 de Agosto de 2018.

Prof^a. Ivete L. de Mendonça
 Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
 Coordenadora