



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ - UECE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - CCS
MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

RÔMMULO CELLY LIMA SIQUEIRA

**EFEITOS DO POLISSACARÍDEO SULFATADO DA ALGA
MARINHA PARDA *Lobophora variegata* (Lamouroux) NO
PROCESSO INFLAMATÓRIO AGUDO**

FORTALEZA – CE

2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

S618e

Siqueira, Rômmulo Celly Lima

Efeitos do polissacarídeo sulfatado da alga marinha parda
Lobophora variegata (Lamouroux) no processo inflamatório agudo/
Rômmulo Celly Lima Siqueira. – Fortaleza, 2008.

95p.;i il.

Orientadora: Prof^a. Dra. Ana Maria Sampaio Assreuy

Dissertação (Mestrado Acadêmico de Ciências Fisiológicas) –
Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciências da Saúde.

1. Alga marinha parda - Efeito do polissacarídeo. 2. Processo
inflamatório agudo. I. Universidade Estadual do Ceará, Centro de
Ciências da Saúde.

CDD:574.1

RÔMMULO CELLY LIMA SIQUEIRA

**EFEITOS DO POLISSACARÍDEO SULFATADO DA ALGA
MARINHA PARDA *Lobophora variegata* (Lamouroux) NO
PROCESSO INFLAMATÓRIO AGUDO**

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

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Sampaio Assreuy.

FORTALEZA – CE

2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
CURSO DE MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

**Título do Trabalho: EFEITOS DO POLISSACARÍDEO SULFATADO
DA ALGA MARINHA PARDA *Lobophora variegata* (Lamouroux)
NO PROCESSO INFLAMATÓRIO AGUDO**

Autor: Rômulo Celly Lima Siqueira

Defesa em: 10 / 04 /2008

Conceito obtido: _____

Banca examinadora

Profa. Dra. Ana Maria Sampaio Assreuy
Orientadora
Universidade Estadual do Ceará- UECE

Prof. Dr. Wladimir Ronald Lobo Farias
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares
Universidade Federal do Ceará - UFC

*“Se um homem não sabe a que porto se dirige, nenhum vento lhe será favorável”
(Sêneca – filósofo romano nascido em 4 a.C.)*

*Primeiramente ao meu bom Deus,
por toda atenção e força em todos
os momentos para comigo, minha
família e amigos.*

*Á minha mãe, Célia, pelo amor e
carinho que sempre tem e teve com
seu “primogênito”.*

*A meu pai, Siqueira, pelos
conselhos, grande amizade e
exemplo de pai, auxiliando-me nos
momentos mais difíceis e me
ensinando que “tudo tem seu
tempo”.*

*Aos meus além de irmãos
(Rammila, Hans e Hanna),
amigos, que apesar das discussões,
alegraram e alegam a minha vida.*

*A minha namorada, Juliana,
pela ajuda, paz, felicidade, carinho
e amor, que possamos estar juntos
por todo o sempre!*

À toda minha amada família (vó Terezinha, vô Zezito, vó Lurdes, meus tios e primos) pelos momentos felizes.

À minha esplendorosa orientadora, Ana Maria Sampaio Assreuy, por me acolher no seu laboratório, por ser paciente com seu mestrando teimoso, por sua amizade e pelos valiosos ensinamentos e incentivos não apenas voltados à vida científica, mas para meu engrandecimento pessoal.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Aos meus amigos Michelle (“Rochelle”), Natália e Albertina (“tininha”), pelas incansáveis horas de experimento e pela compreensão com seu amigo meio “desligado”; Sabrina (“bina”) por sua amizade e por ser a “cúpida” mais eficiente que já conheci (hehehe); Débora (“Dedeca”), pelas alegrias e risadas hilárias, Alana (“laninha”) por ser mais que especial estando sempre disponível a ajudar e aconselhar; Clauber (“Crawbin”) por ser meu grandioso amigo e irmão científico, confiando e auxiliando nos momentos difíceis.

Aos meus colegas “Laffincenses” (Paulo, Edson, Carol, Paloma, Pâmela, Rafaela, Maria, Pedro, Gabriela e Dr. Ferdinando) pela amizade e ajuda no engrandecimento deste trabalho.

Aos colegas do Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas pela companhia no decorrer desta jornada científica.

Aos docentes do Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas pelos ensinamentos no decorrer do curso.

Às professoras Luilma Gurgel, Paula Matias e Silvânia Vasconcelos por me incentivarem na vida acadêmica.

Ao professor Dr. Wladimir Ronald Lobo Farias pela paciência e pela imensa contribuição com os polissacarídeos sulfatados fornecidos na realização desta pesquisa.

Ao professor Dr. Pedro Marcos Gomes Soares por aceitar o convite de compor esta banca, pela tentativa em conseguir o inibidor de leucotrienos e pelas relevantes considerações ao melhoramento deste trabalho.

Ao Glaydson, pela importante ajuda no laboratório e pelos cuidados aos animais utilizados neste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Cearense de Apoio a Pesquisa (FUNCAP), pelos convênios e auxílios concedidos.

RESUMO

Os organismos que apresentam a maior quantidade de polissacarídeos sulfatados (PS) são as macroalgas marinhas, estes polissacarídeos são muito estudados devido sua ampla de atividades biológicas. PS são conhecidos por modular uma série de funções biológicas, das quais as ações anticoagulante e antitrombótica as mais estudadas. No presente trabalho procurou-se investigar os efeitos vasculares e celulares de um polissacarídeo sulfatado da alga parda *Lobophora variegata* (PLS) na inflamação aguda e na contratilidade do músculo liso vascular em ratos e avaliar os possíveis sinais de toxicidade decorrentes do tratamento dos animais com o PLS. No estudo da inflamação, contratilidade e toxicidade foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos (150 e 300g). A investigação da atividade anti-inflamatória desta molécula, no modelo de edema de pata, mostrou que o pré-tratamento (30 min) com PLS nas doses 0,01; 0,1 ou 1mg/kg de massa corporal, antes da injeção subcutânea intraplantar dos estímulos inflamatórios, inibiu o edema de pata induzido por todos os estímulos: 19% com dextrana (300mg/pata), 47% com carragenina (2mg/pata), 32% com zymosan (1mg/pata), sendo no entanto, mais efetivo na inibição do curso temporal deste último agente. Além disso, observou-se que o PLS inibiu também em 44%, o aumento de permeabilidade no modelo de edema de pata e em 75% a migração de neutrófilos no modelo de peritonite, induzidos por zymosan. Visto que o PLS inibiu tanto os eventos vasculares quanto os celulares da inflamação, procurou-se investigar por quais vias o PLS estava agindo. Para tanto, comprovou-se que o PLS inibiu em 57% o edema de pata induzido por L-arginina (15 mg/kg; s.c.), um substrato para formação de óxido nítrico (NO) e em 19% o edema de pata induzido por fosfolipase A₂ (30mg/kg; s.c.), substância que libera prostaglandinas (PG), evidenciando a ação inibitória do PLS sobre esses dois mediadores da inflamação, NO e PG. Por outro lado, não foi verificado nenhuma ação edematogênica do PLS, fato que veio de acordo com os resultados da avaliação *in vitro*, sobre as contrações induzidas por fenilefrina em anéis de aorta de ratos, onde também se evidenciou ação vasodilatadora em concentração extremamente elevada. A identificação do exato mecanismo de ação do PLS de *L. variegata* carece de maiores investigações. No entanto, estudos indicam que as atividades biológicas destes compostos estão relacionadas com as interações entre carboidratos e proteínas, e estas são fatores determinantes para a função biológica e fisiológica destes compostos. O tratamento endovenoso dos animais com o PLS (1mg/kg), durante 7 dias consecutivos, não causou toxicidade *in vivo* (peso corporal, órgão, função renal e hepática). Assim como o PLS não alterou a responsividade endotelial das aortas *in vitro*, visto que as mesmas conservaram a capacidade de contração. Em conclusão, através deste estudo, a lista de atividades biológicas de polissacarídeos sulfatados raramente relatadas de algas marinhas se estende ainda mais, principalmente na modulação *in vivo* da inflamação. Por fim, os resultados do presente trabalho mostram o potencial farmacológico do PLS de *L. variegata* como ferramenta para o estudo do processo inflamatório e possível aplicação biotecnológica, através da produção de medicamentos para o tratamento da inflamação.

Palavras-chave: Polissacarídeos sulfatados; Processo inflamatório; alga parda

ABSTRACT

The organisms that have the greatest amount of sulfated polysaccharides (PS) are the marine macroalgae, these polysaccharides are studied because of its extensive biological activities. PS are known to modulate a number of biological functions, including anticoagulant and antithrombotic actions the most studied. In the present study sought to investigate the cellular and vascular effects of a sulfated polysaccharide from brown algae *Lobophora variegata* (PLS) in acute inflammation and contractility of vascular smooth muscle in rats and to evaluate the possible signs of toxicity resulting from treatment of animals with PLS. In the study of inflammation, contractility and toxicity were used Wistar rats (*Rattus norvegicus*) male (150 and 300g). The investigation of anti-inflammatory activity of this molecule in the model of paw edema, showed that pre-treatment (30 min) with PLS at doses 0.01, 0.1 or 1mg/kg body weight, before the subcutaneous injection intraplantar of inflammatory stimuli, inhibited the edema of paw induced by all stimuli: 19% with dextran (300mg/pata), 47% with carrageenan (2mg/pata), 32% with zymosan (1mg/pata), but, more effective in inhibiting the temporal course of the latter agent. Furthermore, we observed that PLS also inhibited by 44%, the increase in permeability in the model of paw edema and 75% the migration of neutrophils in the model of peritonitis, induced by zymosan. Since the PLS inhibited both vascular events in the cellular inflammation, we tried to investigate the ways in which PLS was acting. Thus, it was found that the PLS inhibited in 57% of the paw edema induced by L-arginine (15 mg / kg, sc), a substrate for formation of nitric oxide (NO) and 19% of the paw edema induced by phospholipase A2 (30mg/kg, sc), substance that releases prostaglandins (PG), showing the inhibitory action of PLS on these two mediators of inflammation, NO and PG. Furthermore, no action was not observed edema of PLS, which came in line with the results of the evaluation *in vitro* on the contractions induced by phenylephrine in rings of aorta from rats, which also showed vasodilating at extremely high concentrations. The identification of the exact mechanism of action of the PLS *L. variegata* needs further investigation. However, studies indicate that the biological activities of these compounds are related to the interactions between carbohydrates and proteins, and these factors are decisive for the biological and physiological function of these compounds. The intravenous treatment of animals with the PLS (1mg/kg), for 7 consecutive days, caused no toxicity *in vivo* (body weight, body, renal and hepatic function). As the PLS did not alter the responsiveness of endothelial aortas *in vitro*, since they retained the capacity for contraction. In conclusion, through this study, the list of biological activities of sulfated polysaccharides from marine algae reported rarely extends further, especially in the modulation of inflammation *in vivo*. Finally, the results of this study show the potential of pharmacological PLS of *L. variegata* as a tool for studying the inflammatory process and possible biotechnological application, through the production of medicines for the treatment of inflammation.

Keywords: Polysaccharides sulfated; inflammatory process; brown algae

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	<i>Lobophora variegata</i> (Lamouroux).....	18
Figura 2	Ilustração cômica dos cinco sinais cardinais da inflamação.....	25
Figura 3	Migração de neutrófilos da corrente sanguínea para o sítio da infecção.....	28
Figura 4	Cascata do Complemento, mostrando suas três vias de ativação....	33
Figura 5	Ratos Wistar.....	38
Figura 6	<i>Lobophora variegata</i> (Lamouroux).....	38
Figura 7	O polissacarídeo sulfatado de <i>L. variegata</i> reduz parcialmente a fase inicial do edema de pata induzido por dextrana.....	48
Figura 8	O polissacarídeo sulfatado de <i>L. variegata</i> inibe a segunda hora do edema de pata induzido carragenina.....	50
Figura 9	O polissacarídeo sulfatado de <i>L. variegata</i> inibe o curso temporal do edema de pata induzido por zymosan.....	52
Figura 10	O polissacarídeo sulfatado de <i>L. variegata</i> inibe o aumento de permeabilidade vascular induzido por zymosan.....	54
Figura 11	O polissacarídeo sulfatado de <i>Lobophora variegata</i> inibe a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos induzida por zymosan.....	56
Figura 12	O polissacarídeo sulfatado de <i>L. variegata</i> inibe o edema de pata induzido por L-arginina a partir da primeira hora.....	58
Figura 13	O polissacarídeo sulfatado de <i>L. variegata</i> inibe o edema de pata induzido por fosfolipase A ₂ a partir da segunda hora.....	60
Figura 14	O polissacarídeo sulfatado de <i>Lobophora variegata</i> não é edematogênico.....	62
Figura 15	Efeito relaxante do polissacarídeo sulfatado de <i>Lobophora variegata</i> em aortas com e sem endotélio contraídas por fenilefrina.....	64
Figura 16	O polissacarídeo sulfatado de <i>L. variegata</i> não altera o tônus basal de aortas isoladas.....	66
Figura 17	Mecanismo de ação do PLS.....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Atividades farmacológicas atribuídas as fucanas.....	24
Tabela 2	O tratamento de ratos com o polissacarídeo sulfatado de <i>L. variegata</i> não altera o peso corporal dos animais e o peso úmido de seus órgãos.....	68
Tabela 3	O tratamento de ratos com o polissacarídeo sulfatado de <i>L. variegata</i> não altera o leucograma dos animais.....	69
Tabela 4	O tratamento de ratos com o polissacarídeo sulfatado de <i>L. variegata</i> não altera parâmetros bioquímicos.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS

PLS – Polissacarídeo Sulfatado de *Lobophora variegata*
PS – Polissacarídeos Sulfatados
NO – Óxido Nítrico
L-NAME – L-nitroarginina métil éster
PG – Prostaglandinas
LAFFIN – Laboratório de Físio-Farmacologia da Inflamação
TNF- α – Fator de Necrose Tumoral
ICAM-1 – Molécula de Adesão Intercelular-1
ICAM-2 – Molécula de Adesão Intercelular-2
PAF – Fator Ativador de Plaquetas
LTB4 – Leucotrieno B4
fMLP – N-formil-met-L-metionil-L-leucil-fenilalanina
IL8 – Interleucina-8
PSP II – Subunidade II da Espermidina Suína
IgG – Imunoglobulina G
MPO – Mieloperoxidases
COX-1 – Ciclooxigenase-1
COX-2 – Ciclooxigenase-2
NOS – Óxido Nítrico Sintase
eNOS - Óxido Nítrico Sintase endotelial
nNOS – Óxido Nítrico Sintase neuronal
iNOS – Óxido Nítrico Sintase induzida
MAC – Complexo de Ataque a Membrana
PST – Polissacarídeos Sulfatados Totais
ASC – Área Sob a Curva
e.v. – via endovenosa
i.p. – via intraperitoneal
s.c. – via subcutânea
Ach – Acetilcolina
Phe – Fenilefrina
HE – Hematoxilina-eosina
ALT – Alanina Transaminase
AST – Aspartato Transaminase
PLA₂ – Fosfolipase-A₂

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	14
1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Algas.....	16
1.1.1 Algas pardas.....	17
1.1.2 <i>Lobophora variegata</i> (Lamouroux).....	17
1.2 Carboidratos.....	18
1.2.1 Polissacarídeos sulfatados.....	19
1.2.2 Atividades biológicas de polissacarídeos sulfatados.....	21
1.2.3 Atividades biológicas de polissacarídeos sulfatados de algas pardas.....	22
1.3 Resposta inflamatória.....	25
1.3.1 Eventos celulares.....	27
1.3.2 Eventos vasculares.....	30
1.3.3 Sistema do complemento	32
2 OBJETIVOS	35
2.1 Geral.....	36
2.2 Específicos.....	36
3 MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 Animais.....	38
3.2 Alga marinha parda <i>Lobophora variegata</i>	38
3.3 Obtenção do polissacarídeo sulfatado da alga marinha parda <i>Lobophora variegata</i>	39
3.4 Drogas e reagentes.....	39
3.5 Caracterização das atividades do polissacarídeo sulfatado da alga <i>L. variegata</i> em modelos experimentais de inflamação e contratilidade.....	40
3.5.1 Modelo de Edema de Pata.....	40
3.5.2 Modelo de peritonite	42
3.5.3 Modelo de contratilidade: anéis isolados de aorta.....	43
3.6 Avaliação da toxicidade após tratamento endovenoso com polissacarídeo sulfatado da alga parda <i>Lobophora variegata</i>	44
3.7 Análise Estatística.....	45

4 RESULTADOS	46
4.1 O polissacarídeo sulfatado de <i>Lobophora variegata</i> reduz parcialmente a fase inicial do edema de pata induzido por dextrana.....	47
4.2 O polissacarídeo sulfatado de <i>Lobophora variegata</i> inibe apenas a segunda hora do edema de pata induzido por carragenina.....	49
4.3 O polissacarídeo sulfatado de <i>Lobophora variegata</i> inibe o curso temporal do edema de pata induzido por zymosan.....	51
4.4 O polissacarídeo sulfatado de <i>Lobophora variegata</i> inibe o aumento da permeabilidade vascular induzido por zymosan.....	53
4.5 O polissacarídeo sulfatado de <i>Lobophora variegata</i> inibe a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos induzida por zymosan.....	55
4.6 O polissacarídeo sulfatado de <i>Lobophora variegata</i> inibe o edema de pata induzido por L-arginina a partir da primeira hora de seu desenvolvimento.....	57
4.7 O polissacarídeo sulfatado de <i>Lobophora variegata</i> inibe o edema de pata induzido por fosfolipase A ₂ a partir da segunda hora de seu desenvolvimento.....	59
4.8 O polissacarídeo sulfatado de <i>Lobophora variegata</i> não é Edematogênico.....	61
4.9 O polissacarídeo sulfatado de <i>Lobophora variegata</i> inibe as contrações induzidas por fenilefrina apenas em aortas endotelizadas e em concentração elevada.....	63
4.10 O polissacarídeo sulfatado de <i>Lobophora variegata</i> não altera o tônus basal de aortas.....	65
4.11 O tratamento subcrônico de ratos com o polissacarídeo sulfatado de <i>L. Variegata</i>	67
5 DISCUSSÃO	71
6 CONCLUSÕES	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

APRESENTAÇÃO

O interesse científico nos ramos das ciências biomédicas tem se acentuado na investigação e identificação de compostos oriundos de organismos marinhos que possam apresentar ações biológicas de grande aplicabilidade biotecnológica. Aproximadamente, metade da biodiversidade do planeta é composta de espécies marinhas. No entanto, a maioria dos estudos de atividade biológica se concentra em espécies terrestres. Os polissacarídeos sulfatados são compostos naturais com significativa atividade biológica, e estão amplamente distribuídos entre vertebrados, invertebrados e algas marinhas (PAINTER, 1983). Por muito tempo as algas marinhas foram conhecidas como os únicos organismos do reino vegetal (são agora classificados como protistas) a apresentar estes compostos em sua estrutura (ROCHA *et al.*, 2004), apenas recentemente foram encontrados polissacarídeos sulfatados em angiospermas marinhas (AQUINO *et al.*, 2005).

O Laboratório de Fisiologia e Farmacologia da Inflamação da Universidade Estadual do Ceará - **LAFFIN** tem estudado algumas atividades biológicas de polissacarídeos de algas marinhas provenientes da costa cearense. Estes estudos têm apontado os polissacarídeos sulfatados como alternativas terapêuticas em recursos naturais e considerados como importantes estratégias científicas para a solução de problemas associados à terapia analgésica e imunostimulante convencionais, como efeitos colaterais, toxicidade e o elevado custo de alguns medicamentos.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Algas

O termo algas vem do latim, *algae* (singular: *alga*). As algas são encontradas em ambientes marinhos e continentais, exercem função comparada àquela dos vegetais no ambiente terrestre, fornecendo proteção para diversos organismos microscópicos, invertebrados e peixes que também podem utilizá-las como alimento. As algas apresentam grande variação de forma e possuem, assim como as plantas, parede celular composta de celulose. São organismos eucariotos (Domínio Eucaria) fotossintetizantes, unicelulares ou multi-celulares com dois tipos de reprodução (sexuada e assexuada), sendo filogeneticamente distantes dos mamíferos (ROCHA *et al.*, 2004). Necessitam de luz e gás carbônico para a geração de alimentos e para seu crescimento, mas não utilizam compostos orgânicos do ambiente. Como resultado da fotossíntese, as algas produzem oxigênio e carboidratos, que são utilizados por outros organismos, inclusive os animais. Dessa forma, possuem um papel importante no equilíbrio da natureza (TORTORA *et al.*, 2002) representando a base da cadeia alimentar nos ecossistemas aquáticos, sustentando mais de dois terços da biomassa mundial e responsáveis por aproximadamente metade da atividade fotossintética global (DAY *et al.*, 1999; OLIVEIRA, 2002).

As algas apresentam importância econômica diversa. São utilizadas como alimento suplementar em muitos países orientais, fornecendo sais necessários, bem como vitaminas importantes e elementos raros. Podem ser utilizadas diretamente como fertilizantes além de fornecer substâncias intensamente exploradas na indústria farmacêutica, alimentícia e de cosméticos (VAN DEN HOCK *et al.*, 1989).

As algas marinhas podem ser classificadas nas divisões: Chlorophyta (algas verdes), Rhodophyta (vermelhas), Phaeophyta (marrons ou pardas) (RAVEN *et al.*, 2001) e Cyanophyta (azuis –procariótica).

1.1.1 Algas pardas

As algas pardas ou marrons são multicelulares e existem aproximadamente cerca de 2.000 espécies destas, quase todas marinhas, abundantes nas costas frias, podendo crescer até profundidades de 25 metros. Suas células contêm tipicamente numerosos plastídios em forma de disco marrom-dourado (JOLY, 1965). Esse tipo de alga possui clorofila *a* e *c*, e cloroplastos ricos em vários carotenóides, incluindo uma grande quantidade de fucoxantina, xantofila que proporciona aos representantes desta divisão a cor marrom escura ou verde oliva característica (RAVEN *et al.*, 2001). As algas pardas produzem três tipos de polissacarídeos: ácido algínico, laminaranas e fucanas. O ácido algínico é geralmente usado na medicina como cicatrizantes, em tintas e em alimentos. O alginato mantém um microambiente fisiologicamente úmido que promove a cicatrização e a formação de tecido de granulação (DEALEY, 2001). Enquanto as fucanas apresentam efeitos biológicos diversos.

As algas pardas produzem fucanas sulfatadas que são polissacarídeos extremamente heterogêneos e ramificados, compostos por unidades de α -L-fucose (1 \rightarrow 3) e α -L-fucose (1 \rightarrow 4) sulfatadas em C3, C2 e/ ou C4 (LEITE, 1998).

1.1.2 *Lobophora variegata* (Lamouroux)

Lobophora variegata é uma alga marinha parda pertencente à divisão Phaeophyta, sub-classe Isogeneratae, ordem Dictyotales, família Dictyotaceae. Em geral cresce com um hábito prostrado sobre substratos rochosos ou crostas calcárias, de formato achatado, coloração laranja a castanho escuro, comprimento de 2 a 4 cm. Possui talo foliáceo expandido em forma de ventarola (Figura 1). A zona ventral da fronde apresenta rizóides moniliformes que a fixam ao substrato. (JOLY, 1965).

Figura 1 – *Lobophora variegata* (Lamouroux).



Fonte: www.horta.uac.pt/.../Lobophora_variegata.htm

1.2 Carboidratos

Os carboidratos, também conhecidos como glicídios ou açúcares são as biomoléculas mais abundantes do planeta, sendo base da dieta na maior parte do mundo e sua oxidação é a principal via metabólica fornecedora de energia das células não-fotossintéticas. Caracterizam-se por um grupo diverso de compostos contendo primariamente átomos de carbono ligados a hidrogênios e grupos hidroxila (LEHNINGER *et al.*, 2002).

No século 12 as propriedades dos carboidratos já eram estudadas pelos alquimistas, (POMIN e MOURÃO, 2006). Durante o século XIX o termo carboidrato significava uma família de compostos denominados hidratos de carbono representados pela fórmula geral $C_n(H_2O)_n$. Porém, com o aparecimento de novos compostos que não apresentavam as mesmas propriedades químicas, o significado do termo foi modificado e ampliado. Atualmente inclui poliidroxialdeídos, álcoois cetônicos, ácidos e derivados simples, assim como polímeros contendo ligações do tipo acetal (SZNALDMAN, 1999).

Acreditou-se por muito tempo que os carboidratos tinham função apenas energética no organismo humano, mas o estudo desses compostos permitiu a descoberta de vários eventos biológicos como o reconhecimento e a sinalização

celular, e tornou possível entender os mecanismos moleculares envolvidos em algumas doenças causadas por deficiência ou excesso dessas moléculas. A combinação das diferentes funções bioquímicas de cada uma dessas moléculas permite a integridade da célula e de todos os processos metabólicos, fisiológicos e genéticos dos organismos vivos (POMIN e MOURÃO, 2006).

Alguns carboidratos são relativamente pequenos com pesos moleculares menores que 100 kDa. Já outros são grandes macromoléculas com pesos moleculares na ordem de centenas de milhares de KDa. Perante tal diversidade, existem, segundo o seu tamanho, três classes principais de carboidratos: monossacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos. Em sua grande maioria, monossacarídeos e oligossacarídeos apresentam pequeno peso molecular, são compostos cristalinos e solúveis em água tendo geralmente sabor doce, já os polissacarídeos, embora em geral também sejam solúveis em água, não apresentam sabor e possuem alto peso molecular. Os polissacarídeos consistem de longas cadeias contendo centenas de milhares de unidades de monossacarídeos. Alguns, como a celulose, ocorrem em cadeias lineares, enquanto outros, como o glicogênio, em cadeias ramificadas. Os polissacarídeos mais abundantes, amido e celulose, sintetizados pelos vegetais, consistem de unidades repetitivas de D-glicose, mas diferem entre si no tipo de ligação glicosídica (β na celulose e α no amido).

1.2.1 Polissacarídeos sulfatados

Os polissacarídeos sulfatados são macromoléculas complexas de amplo espectro de ação em função de apresentar uma estrutura química rica em poliânions, o que possibilita sua ligação a um grande número de proteínas em solução, seja na matriz celular ou no plasma sanguíneo (ARFORS; LEY, 1993). Apresentam ampla distribuição na natureza, podendo ser encontrados em microrganismos, animais vertebrados e invertebrados (DIETRICH *et al.*, 1985) e também em algas marinhas. Nestas, estão presentes como estrutura complexas, altamente heterogêneas e muitas vezes ramificadas (MULLOY *et al.*, 1994), sendo, entretanto até bem pouco tempo consideradas ausentes nas plantas superiores (YOON *et al.*, 2002; ROCHA *et al.*, 2004). Contudo, recentemente foram

encontrados galactanas sulfatados em *Ruppia maritima* uma gramínia marinha (AQUINO *et al.*, 2005).

Os organismos que apresentam uma maior quantidade de polissacarídeos sulfatados com propriedades biológicas estudadas são as algas marinhas, contudo, as estruturas dos polissacarídeos de algas são complexas e heterogêneas (POMIN; MOURÃO, 2008). Aqueles encontrados nas algas vermelhas (Rodophyta) apresentam como açúcar mais representativo a galactose, sendo, portanto, classificados como galactanas (PERCIVAL; MACDOWELL, 1967). Nas algas verdes (Chlorophyta) os polissacarídeos sulfatados encontrados em maior quantidade são compostos por unidades de D-manose e galactose (RAMANA; RAO, 1991), sendo classificados como arabinogalactanas (PERCIVAL; MACDOWELL, 1967). Já os polissacarídeos sulfatados abundantes das algas pardas (Phaeophyta), por terem a α -L-fucose como seu monômero majoritário, são conhecidos como fucanas (PATANKAR *et al.*, 1993; BOISSON-VIDAL *et al.*, 1995; ROCHA *et al.*, 2004), e sua presença em algas pardas foi demonstrada inicialmente por KILLING (1913), originalmente denominadas de fucoidans.

As fucanas possuem freqüentemente monossacarídeos como L-fucose, D-xylose, D-galactose e ácido D-glucurônico e em menor quantidade D-mannose e D-glucose. As algas pardas produzem, em sua grande maioria, fucanas ramificadas que são usualmente heterogêneas em sua composição monossacarídica (heterofucanas) e com um padrão de sulfatação irregular (NISHINO *et al.*, 2000; DUARTE *et al.*, 2001; BILAN *et al.*, 2004).

Fucanas também podem ser encontradas em equinodermos, que são conhecidos por produzir fucanas sulfatadas homogêneas em sua composição monossacarídica com cadeias lineares e padrões regulares de sulfatação (MULLOY *et al.*, 2000).

1.2.2 Atividades biológicas de polissacarídeos sulfatados

Os polissacarídeos sulfatados são conhecidos por modular uma série de funções biológicas, como visto em estudos do metabolismo da L-galactose (MOURÃO; ASSREUY, 1995), atividades antitumoral (COOMBE *et al.*, 1987; SOEDA *et al.*, 1994), antimetastática (ZACHARSKI; ORNSTEIN, 1998), antiproliferativa (McCAFREY *et al.*, 1992), antiangiogênica (LINHARDT; TOIDA, 1997; CUMASHI *et al.*, 2007), antiaterosclerótica (ENGELBERG, 1991) e antiviral (SUGAWARA *et al.*, 1989; BOURGOUGNON *et al.*, 1993; WITVROUW *et al.*, 1994; DAMONTE *et al.*, 1994), anticoagulante (ANDERSON *et al.*, 1976; PEREIRA *et al.*, 1999; MOURÃO; PEREIRA, 2000; PEREIRA *et al.*, 2002; PEREIRA *et al.*, 2005; ASSREUY *et al.*, 2008), antitrombótica (GRAUFFEL *et al.*, 1989; MOURÃO; PEREIRA, 2000; BERTEAU; MULLOY, 2003), antioxidante (ZHANG *et al.*, 2003) e antiinflamatória (BERTEAU; MULLOY, 2003; MATSUI *et al.*, 2003). Apesar da imensa variedade de atividades, estudos em andamento mostram que as relações entre estrutura e função de polissacarídeos sulfatados não são claramente estabelecidas devido a muitas dificuldades relacionadas com a determinação mais precisa das suas estruturas (FERREIRA *et al.*, 2006).

A propriedade antiinflamatória e antiadesiva dos polissacarídeos sulfatados heparina, dextran-sulfato e compostos relacionados são relatados em vários artigos. A heparina e o dextran sulfato, por exemplo, reduzem o dano endotelial causado pela liberação de produtos da ativação de granulócitos (NEEDHAM *et al.*, 1988; ARFORS; LEY, 1993).

As ações anticoagulante e antitrombótica de polissacarídeos sulfatados, contudo, são as mais estudadas (MOURÃO; PEREIRA, 2000). A D-galactana sulfatada extraída da alga vermelha *Botryocladia occidentalis* é descrita como um polissacarídeo anticoagulante, por potencializar a inibição da trombina e do fator Xa na presença de antitrombina e/ou cofator II da heparina (FARIAS *et al.*, 2000). Foi também demonstrado, neste mesmo trabalho, que o conteúdo de sulfato destas moléculas é importante para a ação anticoagulante, uma vez que galactanas dessulfatadas perdem suas atividades. Entretanto, esta não é a única exigência para

o desempenho desta função, visto que polissacarídeos altamente sulfatados, como as dextranas, apresentam atividade anticoagulante menor que o polissacarídeo de *B. occidentalis*. Tendo em vista que a heparina, um polissacarídeo altamente sulfatado, apresenta alguns efeitos colaterais no seu uso clínico, tais como, ineficácia para alguns pacientes com deficiência de antitrombina, complicações hemorrágicas e trombocitopenia (WEITZ, 1994), torna-se de suma importância o estudo de polissacarídeos que possam substituí-la (TRENTO *et al.*, 2001), visto que a atividade anticoagulante deste compostos não é necessariamente ligada ao padrão de sulfato (HAROUN-BOUHEDJA *et al.*, 2000). Farias e colaboradores (2001) mostraram a atividade antitrombótica do polissacarídeo sulfatado da alga marinha *B. occidentalis* testado no modelo de trombose venosa em veia cava de ratos.

Estudos recentes do Laboratório de Fisiologia-Farmacologia da Inflamação sugeriram um efeito imunoestimulante para o polissacarídeo sulfatado da alga marinha vermelha *Champia feldmannii* após a demonstração dos efeitos pró-inflamatório, antinociceptivo, e anticoagulante (ASSREUY *et al.*, 2008). Esta sugestão foi em seguida comprovada pela demonstração do efeito antitumoral deste polissacarídeo (LINS *et al.*, 2009).

Também foi demonstrada a atividade antinociceptiva de polissacarídeos sulfatados, através da administração oral de polissacarídeos totais extraídos da alga vermelha *Bryothamnion seaforthii* em camundongos. Observou-se inibição do número de contorções abdominais, induzidas por ácido acético, bem como a primeira e segunda fase no modelo de formalina, além de aumentar o tempo de reação ao estímulo térmico no modelo de placa quente (VIEIRA *et al.*, 2004).

1.2.3 Atividades biológicas de polissacarídeos sulfatados de algas pardas

É visto que muitos polissacarídeos sulfatados de algas marinhas pardas possuem ações biológicas diversas. O fucoidan extraído da alga *Fucus vesiculosus* possui atividades anti-viral, anti-angiogênica, anti-tumoral, contraceptiva, anti-trombótica, anti-coagulante e antiinflamatória, além de ser um importante

suplemento alimentar nos Estados Unidos e no Japão. O fucoidan apresenta alta porcentagem de L-fucose e de grupos éster sulfatados, sendo suas características estruturais semelhantes à heparina. Destacam-se ainda suas ações anti-complemento, inibidora da migração de leucócitos, e anti-proliferativa em células musculares lisas (YANG *et al.*, 2006).

A atividade antitrombótica também foi demonstrada para fucanas sulfatadas de *Spatoglossum schröderi* em diferentes modelos animais (NADER *et al.*, 2001). E no que se refere à atividade anticoagulante, estudos preliminares recentes envolvendo a alga parda em estudo (*Lobophora variegata*) mostraram que as frações obtidas de várias extrações praticamente não foram anticoagulantes, com exceção da fração eluída com 1,2 M de NaCl proveniente da 1ª extração, a qual duplicou o tempo de coagulação normal do plasma humano (ALENCAR, 2007).

Verificou-se que polímeros de polissacarídeos sulfatados extraídos de algas pardas (fucanas) apresentam potente inibição do sistema do complemento humano (BLONDIN *et al.*, 1994), sendo capazes de inibir de maneira dose dependente, as vias clássica e alternativa deste sistema. Posteriormente, TISSOT e DANIEL (2003) descreveram que frações de uma fucana de estrutura bem definida extraída da alga parda *Ascophyllum nodosum* apresentam efeito inibitório sobre o consumo das proteínas C2, C4 e em menor grau de C3, porém com pouca atividade anticoagulante. Ou seja, este polissacarídeo sulfatado tem a vantagem de inibir a ativação da via clássica do sistema do complemento logo nos primeiros passos, evitando assim sua amplificação e a consequente produção de peptídeos pró-inflamatórios. Tais polímeros têm, portanto, grande potencial farmacológico podendo ser utilizados como drogas anticomplemento e antiinflamatória atuando na prevenção de danos teciduais.

Demonstrou-se ainda que fucanas de elevado peso molecular são capazes de inibir o rolamento venular de leucócitos, provavelmente através da ligação a L-selectina (WESTON; PARISH, 1991) e P-selectinas (ARUFFO *et al.*, 1991) com subsequente inibição da adesão endotelial de linfócitos.

Várias atividades de fucanas sulfatadas são listadas na tabela 1.

Tabela 1: Atividades farmacológicas atribuídas as fucanas.

ATIVIDADE	ALGA
Angiogênico	<i>Fucus vesiculosus</i>
Anti complemento	<i>Laminaria cichorioides</i> , <i>L. japonica</i> , <i>fucus evanescens</i> , <i>Ascophyllum nodosum</i>
Anti migratória	<i>Fucus vesiculosus</i> , <i>Ascophyllum nodosum</i>
Antiadesiva	<i>Ascophyllum nodosum</i> , <i>Laminaria brasiliensis</i> , <i>Spatoglossum schröderi</i> , <i>Sargassum stenophyllum</i>
Anticoagulante	<i>Ascophyllum nodosum</i> , <i>Ecklonia kurome</i> , <i>Eisenia bicyclis</i>
Antioxidante	<i>Fucus vesiculosus</i>
Antiproliferativa	<i>Ascophyllum nodosum</i> , <i>Turbinaria ornata</i>
Antitrombótico	<i>Ascophyllum nodosum</i>
Antitumoral	<i>Ascophyllum nodosum</i> , <i>Sargassum thumbergii</i> , <i>Eisenia bicyclis</i>
Anti-úlceras	<i>Cladosiphon okamuranus</i>
Antiviral	<i>Sargassum horneri</i> , <i>Fucus vesiculosus</i>
Antimetástico	<i>Fucus vesiculosus</i>
Bloqueio de ligação de célula-célula via selectina	<i>Fucus vesiculosus</i>
Bloqueio de ligação de <i>Helicobacter pylori</i> a células da parede gástrica	<i>Cladosiphon okamuranus</i> , <i>Fucus vesiculosus</i>
Bloqueio de ligação espermatozóide-epitélio do oviducto	<i>Fucus vesiculosus</i>
Estímulo da liberação de TNF- α de monócitos	<i>Fucus vesiculosus</i>
Estímulo de síntese de heparan antitrombótico por células endoteliais	<i>Spatoglossum schröderi</i>
Fibrinolítica	<i>Ecklonia kurome</i> , <i>Fucus vesiculosus</i>
Impedir a rolagem de leucócitos	<i>Fucus vesiculosus</i>

Fonte: Adaptado de Albuquerque, 2005.

1.3 Resposta inflamatória

A inflamação ou flogose (do latim *inflamare* e do grego *phlogos*, que significa pegar fogo) é uma reação complexa do tecido conjuntivo vascularizado em resposta a estímulos endógenos ou exógenos que podem causar dano celular (PEREIRA; BOGLIOLO, 1998). Esse mecanismo de defesa do organismo tem como objetivo destruir, imobilizar ou diluir o agente lesivo que podem ser estímulos agressores de origem química, física ou biológica (ROBBINS; CONTRAN, 2005).

A resposta inflamatória está intimamente interligada ao processo de reparação, contudo dependendo da extensão da substituição do tecido original pelo tecido cicatricial, pode haver comprometimento ou perda da função do órgão (GLYNN, 1978; DAVIDSON, 1992). A perda de função foi apontada por Virchow, no século XIX, como o quinto sinal cardeal da inflamação (ROCHA; SILVA, 1979). Antes disso, no início da era cristã, Cornelius Celsus, escritor romano, descreveu os sinais cardinais da inflamação: eritema, edema local, febre e dor, que são as primeiras manifestações clínicas observadas na inflamação aguda (Figura 2).

Figura 2 – Ilustração cômica dos cinco sinais cardinais da inflamação.



A reação inflamatória ocorre em duas fases distintas. A fase inicial, chamada de fase aguda, geralmente tem duração relativamente curta e apresenta infiltrado predominantemente neutrofílico. É uma resposta imediata e precoce e possui três componentes principais: alterações do calibre vascular, que acarretam o aumento do fluxo sanguíneo; alterações estruturais da microvasculatura, que permitem que as proteínas plasmáticas e leucócitos deixem a circulação; e transmigração de leucócitos da microcirculação e seu acúmulo no foco de lesão (ROCHA; SILVA, 1979; SEDGWICK; WILLOUGHBY, 1985, ROBBINS; CONTRAN, 2005).

A segunda fase da reação inflamatória denomina-se fase crônica, e apresenta uma duração mais longa, estando, associada histopatologicamente a presença de linfócitos e macrófagos, proliferação vascular, fibrose e necrose tecidual (SEDGWICK; WILLOUGHBY, 1985). Esta fase dura de semanas a meses e nela a inflamação é mais ativa, onde a destruição tecidual e as tentativas de reparação ocorrem simultaneamente, de forma insidiosa, como uma resposta de baixo grau, latente e muitas vezes assintomática (ROBBINS; CONTRAN, 2005).

Todas as respostas envolvidas nos eventos inflamatórios, em qualquer fase do processo, são ocasionadas por mediadores químicos provenientes do plasma sanguíneo ou de células que se encontram no local, sejam elas residentes ou não. Os mediadores inflamatórios participam da resposta inflamatória amplificando e influenciando a evolução desta resposta (BAUHMANN; GAULDIE, 1994). Portanto, caso estes mediadores sejam inibidos pode haver a modulação negativa da inflamação ou vice-versa. Em determinadas condições fisiológicas ou patológicas, o processo inflamatório pode tornar-se prejudicial às células normais do indivíduo, tornando-se necessário que os mediadores inflamatórios envolvidos sejam modulados negativamente. Isto justifica a busca de novas drogas que idealmente possam controlar as conseqüências nocivas do processo inflamatório (BROID, 1991; BAUHMANN; GAULDIE, 1994; ROBBINS; CONTRAN, 2005).

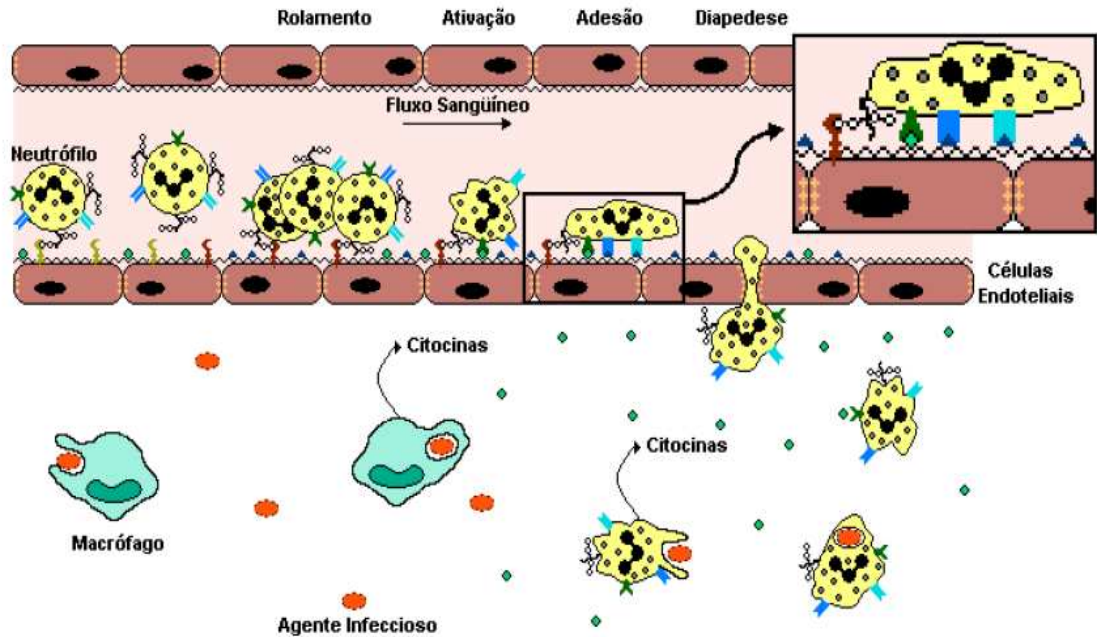
1.3.1 Eventos celulares

Uma das funções da inflamação é o transporte de leucócitos para o local da lesão. Desta forma acontece uma migração de células ao foco da infecção que irão fagocitar, degradar e destruir antígenos ou o tecido necrótico. Contudo, a inflamação pode ser prolongada e induzir dano tecidual por liberação de enzimas, mediadores químicos e radicais tóxicos de oxigênio. Os mediadores vasoativos e quimiotáticos liberados pelo próprio infiltrado celular contribuem para a amplificação dos eventos vasculares e celulares da resposta inflamatória (BEVILACQUA *et al.*, 1994, ROBBINS; CONTRAN, 2005).

As alterações celulares ocorridas variam de acordo com o tipo de estímulo e estágio em que a lesão se encontra. As primeiras 24 horas se caracterizam por um infiltrado de origem neutrofílica, que com o decorrer do processo vai sendo substituído por células mononucleares. Os leucócitos alcançam o foco da infecção devido a uma série de alterações locais que resultam na adesão destas células ao endotélio vascular e componentes da matriz extracelular e conseqüente passagem das mesmas para o espaço extravascular (ROBBINS; CONTRAN, 2005).

Os fenômenos celulares da inflamação envolvem o acionamento da capacidade das células de movimentação, de adesão e de englobamento de partículas. Mais detalhadamente, a saída de leucócitos da luz vascular para o local agredido obedece à seqüência: 1. marginação; 2. rolamento (adesão fraca); 3. adesão firme; 4. diapedese; 5. quimiotaxia (ROBBINS; CONTRAN, 2005). (figura 3)

Figura 3 - Migração de neutrófilos da corrente sanguínea para o sítio da infecção.



Fonte: Albuquerque, 2005.

A marginação, processo de acúmulo dos leucócitos, faz com estes se posicionem adjacentes as células do endotélio devido à quebra do fluxo laminar, como resultado das alterações vasculares (estase sangüínea). Com o tempo, os leucócitos revestem o endotélio, por um processo chamado de pavimentação (ROBBINS; CONTRAN, 2005). Posteriormente, os leucócitos interagem com moléculas de adesão que são expressas nas membranas das células endoteliais e/ou dos leucócitos sob estímulos apropriados ou constitutivamente. Essas moléculas de adesão foram reunidas em três famílias, as selectinas, as integrinas e as imunoglobulinas, e são de extrema importância, pois tornam possível a adesão do leucócito ao endotélio (McEVER, 1991).

As selectinas medeiam à adesão fraca, que é seguida de rolamento. Segue-se a adesão firme dos leucócitos, fenômeno mediado por imunoglobulinas e β -2-integrinas. Estas últimas, presentes na superfície dos leucócitos podem ter sua expressão aumentada após a ativação dos leucócitos por mediadores inflamatórios como o fator ativador de plaquetas - PAF ou citocinas. Posteriormente a adesão firme, segue-se a ligação estável mediada por imunoglobulinas, principalmente molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), moléculas de adesão intercelular-2

(ICAM-2) e molécula de adesão de célula endotelial e plaquetas (PCAM-1) que estão presentes no endotélio, denominadas de β -2-integrinas (ROBBINS; CONTRAN, 2005).

Após estes processos adesivos, os leucócitos migram pelas fendas entre as células do endotélio, graças a movimentos amebóides que realizam, fenômeno este denominado diapedese (ROBBINS; CONTRAN, 2005).

Já no espaço extravascular, os leucócitos podem sofrer quimiotaxia para o foco infeccioso por agentes tanto de origem endógena (produtos liberados pelas próprias células através da cascata do sistema do complemento, da lipoxigenase, citocinas, etc), quanto de origem exógena (agentes liberados pelo microrganismo invasor). Além disso, os agentes quimiotáticos podem se diferenciar como de ação direta, que atraem diretamente a célula imune [leucotrieno B4 (LTB4), C5a, peptídeo N-formil-metil-L-metionil-L-leucil-L-fenilalanina (fMLP), interleucina-8 (IL-8)], subunidade I da espermedesina suína-PSP-I (ASSREUY *et al.*, 2003) ou de ação indireta, que agem estimulando as células residentes (macrófagos, mastócitos, fibroblastos, dentre outras) a liberar agentes quimiotáticos diretos (lipopolissacarídeo bacteriano, IL-8, IL-1, TNF- α) (RIBEIRO *et al.*, 1991; 1996).

Seguida a quimiotaxia, ainda se faz necessário que os leucócitos reconheçam a partícula ou célula causadora da infecção para subsequente fagocitose, degradação e destruição deste agente. Participam do processo de reconhecimento e fixação de opsoninas (imunoglobulina G - IgG; fragmentos de C3 como o C3b, algumas lectinas endógenas) partículas que se ligam a receptores específicos dos leucócitos e receptores do sistema complemento. Após a ligação da partícula opsonizada ao Fc γ R ocorre o engolfamento e formação de fagossomo que é seguido pela destruição da partícula ingerida através da geração de metabólitos do oxigênio, passo este dependente de oxidases (NADPH-oxidase, que produz peróxido de hidrogênio; mieloperoxidases-MPO, as quais na presença de halóides, como o Cl⁻, converte H₂O₂ em HOCl; de oxidação de lipídios ou ainda de proteínas (proteína bactericida por aumento de permeabilidade; lisozima; lactoferrina, etc) presentes nos grânulos leucocitários (ROBBINS; CONTRAN, 2005).

1.3.2 Eventos vasculares

As alterações no fluxo e calibre vascular após a lesão tecidual acontecem em velocidades variadas de acordo com a intensidade da lesão (ROBBINS; CONTRAN, 2005). Os vasos sanguíneos locais sofrem uma vasoconstrição que dura alguns segundos, seguida de vasodilatação por ação de uma variedade de mediadores inflamatórios produzidos no plasma e/ou pela interação do microrganismo com células teciduais, que são formadas e liberadas principalmente pelas arteríolas e, depois, resultam em neovascularização (VANE, 1994; ROBBINS; CONTRAN, 2005). Ocorre então o aumento do fluxo sanguíneo que provoca calor e eritema. Posteriormente, o alentecimento da circulação decorrente da permeabilidade da microvasculatura, faz com que haja um extravasamento de líquido rico em proteínas para dentro dos tecidos. A concentração de hemácias nos pequenos vasos devido à perda de líquido aumenta a viscosidade sanguínea, refletida pela presença de vasos pequenos repletos de hemácias, um distúrbio denominado estase. Com o desenvolvimento da estase os leucócitos começam a se orientar mais periféricamente (principalmente os neutrófilos) ao longo do endotélio vascular (ROBBINS; CONTRAN, 2005).

O aumento da permeabilidade vascular pode ser originado por mecanismos diretos, em que o próprio agente agressor atua sobre a parede vascular, ou indiretos, em que há ação de mediadores químicos que podem ativar receptores nas células endoteliais. Neste processo, estão envolvidos citocinas como a interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral (TNF- α) que causam reorganização citoesquelética endotelial; histamina e leucotrienos que causam contração endotelial, leucócito e agente agressor que provocam lesão do vaso e consequente extravasamento de fluidos; fator de crescimento endotelial que promove transcitose e neovascularização, que também aumenta o extravasamento de fluidos. Portanto, são várias as substâncias químicas produzidas durante a inflamação que modulam os processos vasculares e a ativação leucocitária. Essas substâncias podem ter origem tecidual (serotonina, histamina, óxido nítrico e prostaglandinas), via ativação de células inflamatórias residentes (KATZ *et al.*, 1984) ou plasmática, via ativação das cascatas enzimáticas do sistema de coagulação

(trombina, fator Xa), do sistema fibrinolítico (fibrina), do sistema das cininas (bradicinina) e do sistema do complemento (C3ab, C5a) (ROBBINS; CONTRAN., 2005).

As prostaglandinas são metabólitos do ácido araquidônico formados em consequência da ativação da via enzimática das ciclooxigenases. Estas enzimas existem sob duas isoformas, uma constitutiva, a ciclooxigenase-1 (COX-1), que tem clara função fisiológica e sua ativação leva à produção de baixas quantidades de prostaglandinas. Outra, induzida, a ciclooxigenase-2 (COX-2), produz prostaglandinas em grandes quantidades, responsáveis pelos eventos inflamatórios. As prostaglandinas participam de diversas ações metabólicas, processos fisiológicos e patológicos, vasodilatação ou vasoconstrição; hiperalgesia; contração ou relaxamento da musculatura brônquica e uterina; hipotensão; ovulação; aumento do fluxo sanguíneo renal; proteção da mucosa gástrica e inibição da secreção ácida também no estômago; resposta imunológica (p. Ex: inibição da agregação plaquetária); regulação de atividade quimiotática; progressão metastática; função endócrina, entre outras. Desta forma, as prostaglandinas podem ser produzidas em praticamente todos os tecidos do organismo, sempre que necessário (ROBBINS; CONTRAN, 2005).

O óxido nítrico (NO) é uma molécula pequena, relativamente instável, formada na atmosfera durante tempestades com raios. Em mamíferos e outras espécies mais primitivas, o NO é também formado numa reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) entre o oxigênio molecular e a L-arginina. Existem três isoformas de NOS, duas constitutivas, a endotelial (eNOS) e a neuronal (nNOS), e uma NOS induzida (iNOS), relacionada com a inflamação (NATHAN, 1997; THIEMERMAN, 1997). É um radical livre que, dependendo da sua quantidade pode ter efeitos benéficos ou maléficos sobre o organismo. Sabe-se que o NO atua como mecanismo fundamental de sinalização nos sistemas cardiovascular e nervoso e desempenha a função de defesa do hospedeiro. Uma das funções fisiológicas do NO foi inicialmente descoberta na vasculatura, quando foi demonstrado que o fator de relaxamento derivado do endotélio, descrito por Furchgott e Zawadzki, em 1980, podia ser explicado pela formação de NO pelas células endoteliais (PALMER *et al.*, 1987; MONCADA *et al.*, 1991). O NO tem participação no controle do fluxo

sanguíneo (FORTES *et al.*, 1994) e do aumento da permeabilidade vascular induzida por PAF (fator ativador de plaquetas) e pela própria bradicinina (MAYHAN, 1992).

1.3.3 Sistema do complemento

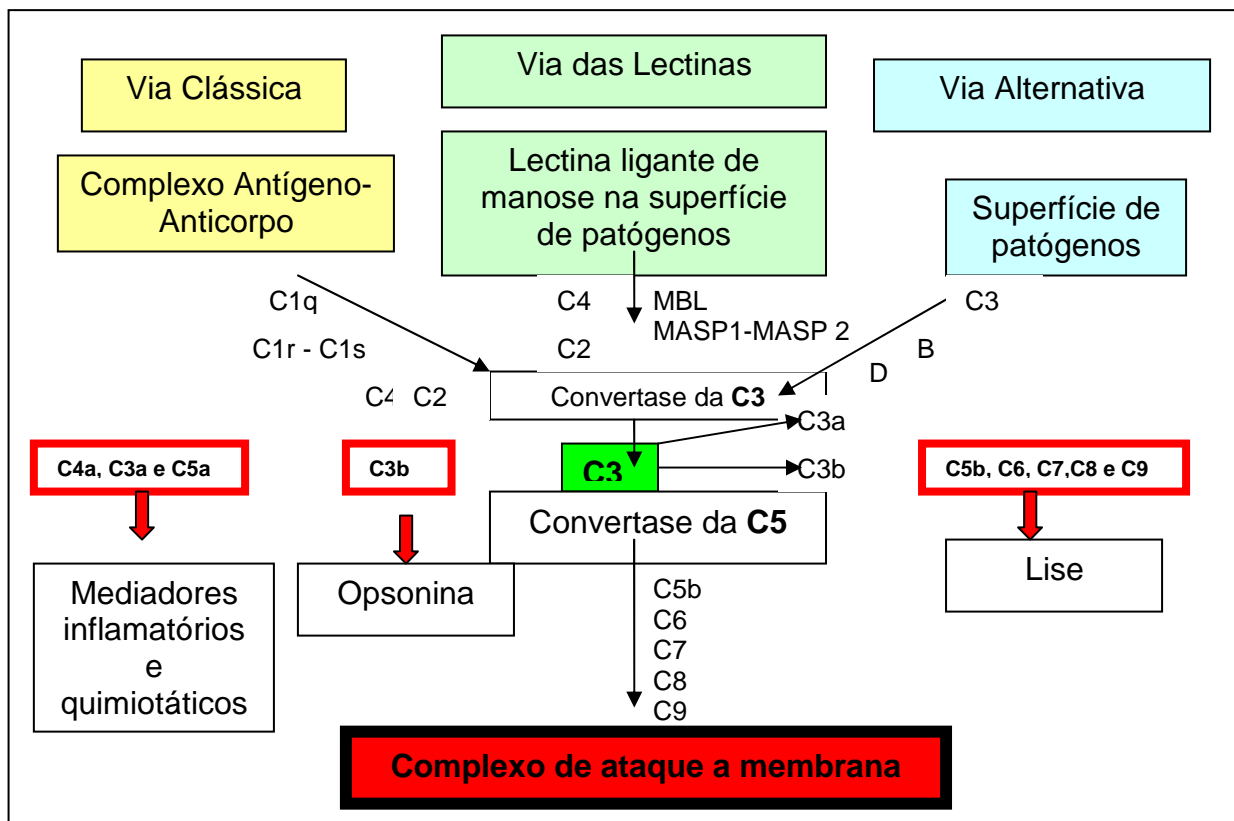
O sistema do complemento é um mecanismo efetor da imunidade humoral, tanto inata como adquirida, que tem papel importante na defesa do organismo contra infecções, sendo formado por mais de 30 proteínas que podem ser encontradas solúveis no plasma ou ligadas à superfície de certos tipos celulares. Essas proteínas podem participar da sua ativação, regulação ou das suas diversas funções biológicas, dentre as quais, sua ação em receptores protéicos presentes na superfície de várias células inflamatórias. A ativação deste sistema se dá de forma seqüencial em cascata, onde cada proteína participa da ativação da seguinte (ISAAC *et al.*, 2000).

A ativação do sistema do complemento pode ocorrer por três vias: via clássica, via das lectinas e via alternativa. A ativação das duas últimas não requer a participação de moléculas de anticorpos, enquanto a via clássica necessita de Imunoglobulina –M e imunoglobulina-G ligadas a antígenos específicos. O componente C3 tem um papel central na ativação deste sistema pelas três vias, que culminará em uma via terminal comum, responsável pela formação e deposição de um complexo protéico conhecido por complexo de ataque à membrana, o qual promove a lise celular (ISAAC *et al.*, 2000).

As três vias de ativação convergem para a geração da enzima chave, denominada convertase de C3 ou C3-convertase, principal ponto de amplificação da cascata do complemento. As C3 convertases apesar de estruturalmente distintas, apresentam uma atividade proteolítica comum, que é clivar C3 em C3a e C3b. O fragmento C3b gerado vai se combinar com a C3-convertase dando origem à C5-convertase. A clivagem de C5 pela C5-convertase inicia a via citolítica comum que culmina com a polimerização de C9 na membrana da célula-alvo, formando o complexo de ataque à membrana (MAC). A unidade funcional do MAC é um poro

inserido na bicamada lipídica que interfere na propriedade de permeabilidade seletiva da membrana, permitindo a entrada de água, íons e pequenas moléculas para o citosol da célula-alvo, distendendo a membrana além de sua capacidade elástica e levando à sua ruptura (lise). Durante a ativação da cascata do complemento são gerados peptídeos com atividade biológica: o C3a e o C5a que têm atividade quimiotática e de anafilatoxina; o C3b, que além de funcionar como opsonina, facilitando a fagocitose de partículas por fagócitos profissionais, também participa na composição da C3-convertase da via alternativa (C3bBb), e assim funciona como uma molécula amplificadora de ativação desta cascata (Figura 4).

Figura 4 – Cascata do Complemento, mostrando as três vias de ativação.



Fonte: Isaac *et al.* (modificado).

A inflamação como resposta protetora a diversos tipos de agressão é um mecanismo importante do organismo, contudo apresenta potencial lesivo aos tecidos. Portanto, pesquisas que estudem as moléculas participantes do processo inflamatório bem como a caracterização de novas substâncias mais eficazes e inócuas, que interfiram neste processo são de extrema relevância. Baseado na

demonstração das atividades anticoagulante, antitrombótica, anticomplemento e antinociceptiva de outros polissacarídeos sulfatados, em sua maioria *in vitro*, é que a investigação e comparação das propriedades do polissacarídeo sulfatado da alga parda *Lobophora variegata* na resposta inflamatória *in vivo* atende a vários interesses. Os resultados desse estudo poderão indicar este polissacarídeo como ferramenta importante para melhorar a compreensão dos mecanismos envolvidos no processo inflamatório ou noutros estudos no campo da glicobiologia e gerar um perfil terapêutico na melhora do prognóstico de várias doenças de cunho inflamatório tais como asma, choque séptico e artrite reumatóide em que a migração excessiva de neutrófilos se torna destrutiva para os tecidos.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Investigar os efeitos vasculares e celulares do polissacarídeo sulfatado da alga parda *Lobophora variegata* na inflamação aguda e na contratilidade do músculo liso vascular em ratos e avaliar os sinais de toxicidade decorrentes do tratamento dos animais com o polissacarídeo.

2.2 Específicos

1. Avaliar a toxicidade decorrente do tratamento endovenoso dos animais com o polissacarídeo de *L. variegata* durante 14 dias, através dos parâmetros:

- a) peso corporal e de alguns órgãos do sistema imune
- b) leucograma
- c) Dosagens bioquímicas

2. Estudar a atividade antiedematogênica do polissacarídeo sulfatado de *L. variegata* no modelo de edema de pata induzido por estímulos inflamatórios osmóticos e não osmóticos:

- a) inibição do edema;
- b) inibição do aumento da permeabilidade vascular;

3. Avaliar a atividade edematogênica do polissacarídeo sulfatado de *L. Variegata*.

4. Investigar a participação de prostaglandinas e óxido nítrico no efeito antiedematogênico do polissacarídeo de *L. variegata*;

5. Estudar a atividade inibitória da migração de leucócitos do polissacarídeo sulfatado de *L. variegata* no modelo de peritonite induzida por zymosan;

6. Estudar a atividade relaxante do polissacarídeo sulfatado da alga de *L. variegata* sobre anéis de aorta isoladas.

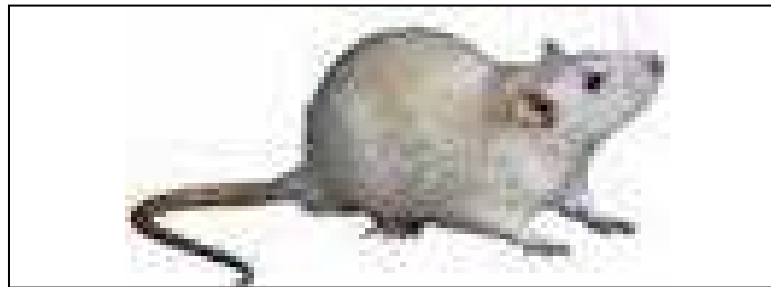
METODOLOGIA

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos (150 e 300g) procedentes do Biotério Central do Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará (UFC). Estes animais receberam ração e água *ad libitum*, sob condições adequadas de luz e temperatura e foram manipulados de acordo com os padrões estabelecidos pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual do Ceará (UECE).

Figura 5 – Ratos Wistar.



Fonte: www.fob.usp.br/adm/bioterio/imagens/image004.jpg

3.2 Alga marinha parda *Lobophora variegata*

Figura 6 – *Lobophora variegata* (Lamouroux).



DIVISÃO: Phaeophyta,

SUB-CLASSE: Isogeneratae

ORDEM: Dictyotales

FAMÍLIA: Dictyotaceae

GÊNERO: *Lobophora*

ESPÉCIE: *Lobophora variegata*

Fonte: www.horta.uac.pt/.../Lobophora_variegata.htm

3.3. Obtenção do polissacarídeo sulfatado de *Lobophora variegata*

A alga marinha parda *Lobophora variegata* após coletada durante maré baixa na praia do Pacheco-Caucaia-CE, foi transportada para o Laboratório de Bioquímica Marinha-BIOMARLAB do Departamento de Engenharia de Pesca (UFC), onde foram lavadas em água corrente e secas ao sol para sua utilização nos processos de extração e purificação.

A extração foi realizada a partir de 2g do tecido seco previamente cortado, segundo o método de Farias e colaboradores (2000). O resíduo algal final foi submetido a sucessivas extrações (2^a, 3^a, 4^a e 5^a extração) com o objetivo de otimizar o rendimento dos polissacarídeos sulfatados totais (PST). Os PST obtidos de cada extração foram submetidos ao fracionamento por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose. O perfil cromatográfico acompanhado através das dosagens de carboidratos (DUBOIS *et al.*, 1956) e sulfatos totais (metacromasia) com azul de 1,9-dimetilmetileno, revelou a presença de uma fração majoritária eluída com 0,5 M de NaCl. A mesma apresentou maior homogeneidade e pureza por eletroforese em gel de agarose (VIEIRA *et al.*, 1991) em relação às demais frações cromatográficas. No entanto, a fração 0,5 M (4^a extração) não prolongou o tempo de coagulação sanguínea pelo teste do tempo de ativação parcial da tromboplastina (APTT) (ALENCAR, 2007).

O polissacarídeo sulfatado (PLS) purificado a partir do fracionamento dos PS da alga parda *Lobophora variegata* por DEAE-celulose (fração 0,5 M, 4^a extração), foi utilizado nos nossos estudos de atividade biológica em modelos clássicos *in vivo* e *in vitro*.

3.4 Drogas e reagentes

Azul de Evans, Carragenina- λ , Fenilefrina, L-nitro-arginina metil ester (L-NAME), Formalina, Zymosan, Dextrana (Pharmacia), L-arginina e Phospholipase A-2 foram adquiridos da Sigma Chemical Company, St. Louis, USA; Indometacina (cápsulas, 25mg; Indocid®) foram adquiridos da Prodome Química e Farmacêutica;

Corante histológico (hematoxilina/eosina) e solução de Turk (ácido acético 2% e violeta de genciana 1%) foram adquiridos da *Isofar*®, Duque de Caxias, BRA.

Todos os reagentes utilizados foram de pureza analítica.

3.5 Caracterização das atividades do polissacarídeo sulfatado da alga *L. variegata* em modelos experimentais de inflamação e contratilidade

3.5.1 Modelo de Edema de Pata

Este modelo foi utilizado para avaliar a capacidade do polissacarídeo em induzir, ou inibir o edema de pata provocado por diversos estímulos inflamatórios e inibir o aumento de permeabilidade vascular induzida por zymosan. Também foram estudados os mediadores envolvidos, e a indução por agentes flogísticos específicos.

Os volumes de líquido deslocados pelas patas direitas de cada rato foram medidos pletismograficamente antes (tempo zero) e após 1/2, 1, 2, 3, 4 e 5h da injeção subcutânea (s.c.) intraplantar dos estímulos inflamatórios. O edema foi calculado como a diferença entre o volume de líquido deslocado antes e após o estímulo e expresso em mL. As áreas sob as curvas (ASC) foram calculadas usando o método do trapézio (LANDUCCI *et al.*, 1995) e expressas em unidades arbitrárias.

a) Avaliação das atividades edematogênica e antiedematogênica do polissacarídeo de *L. variegata*

Na avaliação da atividade antiedematogênica, o polissacarídeo de *L. variegata* foi administrado por via endovenosa (e.v.) nas doses de 0,01; 0,1 ou 1,0 mg/Kg (0,1mL/100g de massa corporal), 30 min. antes da aplicação s.c. dos estímulos inflamatórios (zymosan, 1mg/pata; carragenina, 2 mg/pata; e dextrana, 300 µg/pata). O grupo controle positivo de edema foi administrado com zymosan,

carragenina ou dextrana e o controle negativo com salina s.c.

Na avaliação da atividade edematogênica, o polissacarídeo de *L. variegata* foi administrado localmente (s.c.) como estímulo nas doses de 0,01; 0,1 e 1,0mg/pata. O curso temporal de desenvolvimento do edema foi acompanhado até a 5ª h. O grupo controle negativo de edema recebeu apenas salina estéril s.c.

b) Avaliação do mecanismo da ação anti-edematogênica do polissacarídeo de *L. variegata*

Na investigação da participação dos possíveis mediadores inflamatórios envolvidos no efeito do PLS, utilizou-se alguns importantes agentes inflamatórios para indução do edema de pata, tendo sido os mesmos administrados 30 minutos após o tratamento com o polissacarídeo (1mg/Kg; e.v.).

Participação de óxido nítrico: o edema de pata foi induzido por L-arginina (15 µg/kg; s.c.), 30 min após o tratamento com o PLS (1mg/Kg; e.v.). Como controle de inibição do edema, foi utilizado o inibidor não seletivo da síntese de NO (L-NAME; 25mg/Kg; e.v.), 1 h antes da L-arginina (CUZZOCREA *et al.*, 1996).

Participação de prostaglandinas: o edema de pata foi induzido por fosfolipase A₂ (30 mg/kg; s.c.), 30 min após o tratamento com o PLS (1mg/Kg; e.v.). Como controle do bloqueio da via das ciclooxigenases, foi utilizado o inibidor não seletivo indometacina (5mg/Kg, s.c.), 1 h antes da fosfolipase A₂ (LEMOS *et al.*, 2002).

c) Avaliação do efeito inibitório do polissacarídeo de *L. variegata* sobre o aumento de permeabilidade vascular induzido por zymosan

A quantificação de permeabilidade vascular foi feita baseada naquela utilizada por Garcia-Leme e Wilhelm (1975). Os animais receberam azul de Evans

(25 mg/kg) por via intraperitoneal, 1h antes do sacrifício. Em seguida, as patas foram seccionadas abaixo do maléolo, pesadas e incubadas com 1ml de formamida concentrada, à temperatura de 36°C por 72h. A quantificação do azul de Evans extraído dos tecidos foi realizada por espectrofotometria (A600 nm) a partir do sobrenadante da solução de incubação. Os dados obtidos em absorbância foram convertidos em µg de azul de Evans, através de regressão linear baseado em uma curva padrão de azul de Evans e expressos como média ± E.P.M. em µg de azul de Evans/g pata.

Os animais receberam o PLS de *L. variegata* (1mg/kg; e.v.) 30 min antes da injeção de zymosan (1mg/pata; s.c.) e 90 min antes do azul de Evans, sendo sacrificados 1 hora após a injeção do azul de Evans, tempo coincidente com a melhor atividade antiinflamatória do PLS. O grupo controle recebeu salina estéril s.c. em substituição ao zymosan.

3.5.2 Modelo de peritonite

Os animais receberam zymosan (1mg/ cavidade) contidos em 1,0 mL de uma solução de salina estéril (NaCl 0,15 M), por via intraperitoneal (i.p.) e após 4h foram sacrificados por deslocamento cervical. As células presentes na cavidade peritoneal foram coletadas através da lavagem de cada cavidade, injetando-se 10 mL de salina contendo 5 UI/mL de heparina. A contagem total e diferencial dos leucócitos foi realizada conforme metodologia descrita por Souza e Ferreira (1985).

Para a avaliação da atividade do PLS em inibir a migração de neutrófilos induzida por zymosan, este foi administrado, em solução (via endovenosa – e.v.), 30 min antes da injeção i.p. do agente flogístico zymosan. O controle positivo de migração de neutrófilos foi o grupo administrado com o agente flogístico e o controle negativo, administrado com salina, em substituição ao estímulo inflamatório.

Foram realizados controles adequados para descartar a possibilidade de contaminação por endotoxina sendo os polissacarídeos filtrados antes de sua

administração.

3.5.3 Modelo de contratilidade: anéis isolados de aorta

a) Descrição do modelo

Os animais foram sacrificados por concussão cerebral. Em seguida a região torácica foi aberta cirurgicamente para exposição, retirada e dissecação da artéria aorta. A mesma foi preparada como anéis de 2-3mm, após a remoção de gordura e tecido conectivo. O tecido foi mantido em solução fisiológica de Tyrode, a 37°C e pH 7.4 até o momento de sua utilização. Em seguida, os anéis foram colocados verticalmente em uma câmara muscular com capacidade de 10 mL, contendo solução nutritiva aerada com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% CO₂) e mantidos à 37°C e pH 7.4. Uma das extremidades da preparação foi presa a uma base fixa e a outra a um transdutor de força isométrico ligado ao sistema computadorizado (Powerlab, AD Instruments) de aquisição de dados. Os registros e análises das contrações foram realizados utilizando o programa Chart®(versão 4.1).

Nos experimentos realizados com ausência de endotélio, a superfície íntima dos anéis de aorta foi friccionada (ZHENG *et al.*,1994). Para avaliação da preservação do endotélio foi adicionado ACh [10⁻⁶M] (FURCHGOTT e ZAWADZKI, 1980) sobre os tecidos contraídos por fenilefrina [0,1µM], sendo a ausência de relaxamento interpretada como ausência de endotélio, mas só foram considerados endotelizados aqueles que apresentaram relaxamento ≥ 75% .

O tecido foi submetido a uma tensão passiva de 2g e estabilizado por um período de aproximadamente 1 hora (MATEO; ARTIÑANO, 2001).

b) Protocolo experimental

Efeito no estado contraído: Após 40 minutos de estabilização, o polissacarídeo sulfatado foi adicionado sobre aortas endotelizadas pré-contraídas com fenilefrina [0,1µM] em concentrações cumulativas (1-300µg/mL) a intervalos de

10 minutos. No início e ao final de cada experimento foi adicionado KCl [60mM] para avaliar a responsividade dos tecidos. Este protocolo foi realizado com tecidos endotelizados e não endotelizados.

Efeito sobre o tônus: Após 40 minutos de estabilização, foram adicionadas concentrações cumulativas (1-300µg/mL) de polissacarídeo em aortas endotelizadas. Antes e após o experimento foi adicionado KCl [60mM] para verificar a responsividade do tecido.

3.6 Avaliação da toxicidade após tratamento endovenoso com polissacarídeo sulfatado da alga parda *Lobophora variegata*

a) Protocolo experimental

Foram utilizados dois grupos de 7 ratos cada. Um grupo recebeu polissacarídeo em solução durante sete dias por via e.v. (caudal), obedecendo a posologia de dose única diária de 1mg/kg contido em 0,1mL/100g de peso corporal. O grupo controle recebeu o mesmo volume de salina estéril pela mesma via. Após o tratamento, foi feita a avaliação dos parâmetros abaixo descritos.

b) Parâmetros avaliados

- Peso corporal e de órgãos do sistema imune: os animais foram pesados antes e após o tratamento com o polissacarídeo. Após o sacrifício foi feita a excisão do fígado, baço, rim e coração e a pesagem dos mesmos ainda úmidos. O peso de cada órgão foi expresso por 100g de peso corporal e comparado ao grupo controle.
- Avaliação macroscópica: foram observadas possíveis alterações (vermelhidão, esteatose, nódulos, focos hemorrágicos).
- Leucograma: imediatamente antes do sacrifício, foi coletado sangue para a contagem total e diferencial de leucócitos. A contagem total foi feita em

câmara de Neubauer após diluição (1:20) da amostra em Líquido de Turk. Para a contagem diferencial destas células foram confeccionados esfregaços sobre lâminas de vidro, coradas pelo método da hematoxilina-eosina (HE), utilizando-se microscópio óptico com objetiva de imersão.

- Testes bioquímicos: amostras de sangue foram coletadas para a dosagem de uréia e creatinina como indicadores de funções renal e avaliação da atividade das enzimas AST (aspartato transaminase) e ALT (alanina transaminase), bem como a dosagem de proteínas totais (e albumina) como indicadores de função hepática. Estas dosagens são utilizadas na clínica médica para avaliação da função destes órgãos.

3.7 Análise Estatística

De todos os experimentos foram calculadas as médias das respostas \pm erro padrão da média. As diferenças estatísticas entre os grupos foram obtidas através da análise de variância (ANOVA) e teste de *Duncan* ou teste t de *Student* para dados pareados ou não-pareados. $p < 0,05$ foi fixado para indicar significância estatística.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 O polissacarídeo sulfatado de *Lobophora variegata* reduz parcialmente a fase inicial do edema de pata induzido por dextrana

Com o intuito de investigar a propriedade antiinflamatória do PLS de *L. variegata* utilizou-se inicialmente a dextrana, um agente que promove edema osmótico sem infiltrado celular (LO *et al.*, 1982). A injeção subcutânea (s.c.) intraplantar de dextrana (300 μ g/pata) causou um intenso edema, com pico máximo nos primeiros 30 minutos (1,22 \pm 0,06 mL), em relação ao grupo salina (0,40 \pm 0,07 mL), mantendo-se elevado até o tempo de 300min. O PLS injetado por via endovenosa (e.v.) na dose de 1mg/kg, 30 minutos antes da administração do estímulo, reduziu em apenas 19% (0,98 \pm 0,06 mL), e somente nos primeiros 30 minutos, embora de forma significativa o efeito edematogênico elicitado pela dextrana (**Figura 7a**). Tal diferença estatística não foi observada contudo, sobre o curso temporal, o que foi verificado pelo cálculo da integral da área sob a curva (**Figura 7b**).

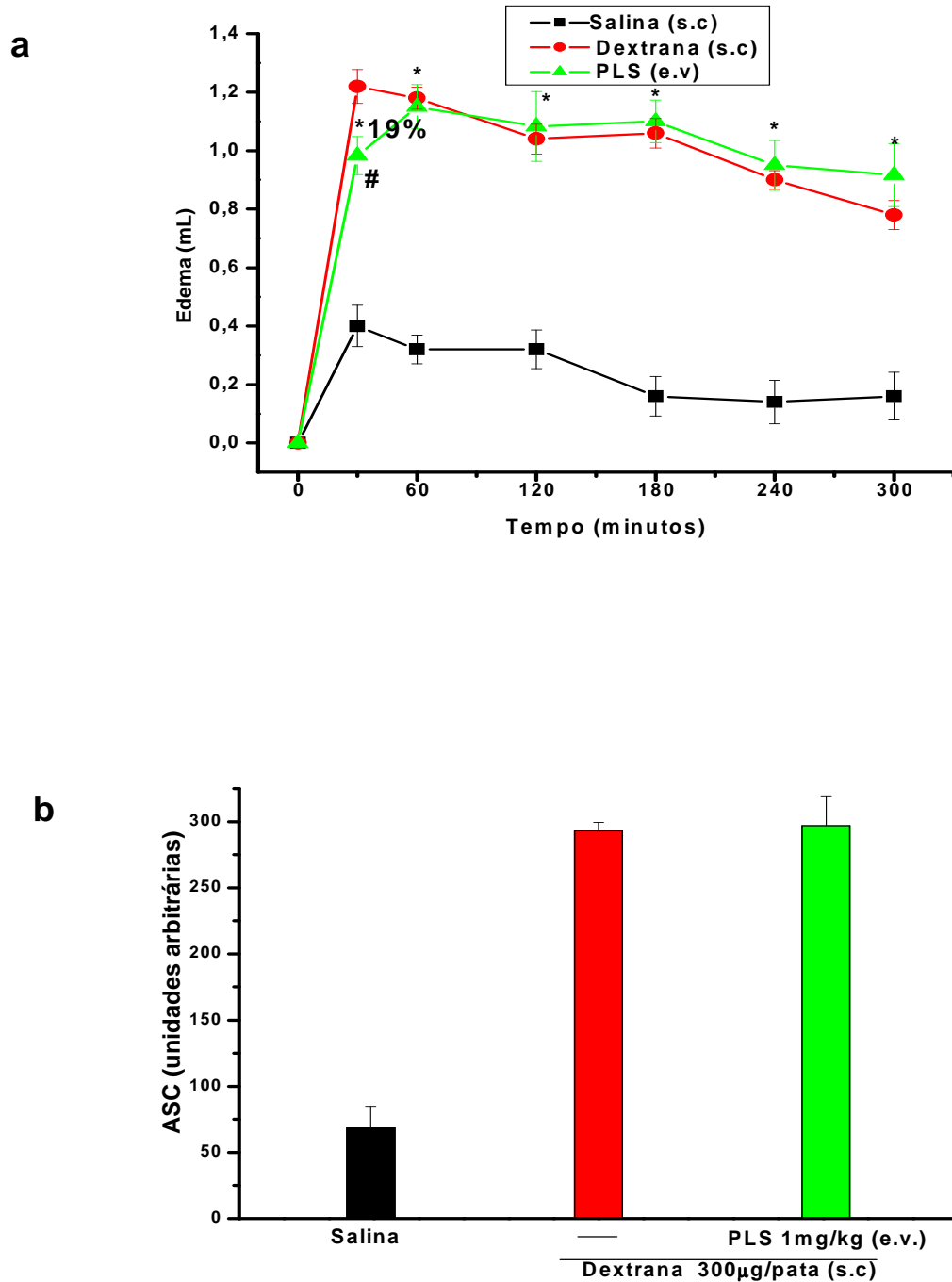


Figura 7. O polissacarídeo sulfatado de *L. variegata* reduz parcialmente a fase inicial do edema de pata induzido por dextrana. O edema foi medido antes (tempo zero) e 30, 60, 120, 180, 240 e 300 min. após a dextrana e calculado como a variação dos volumes (mL) deslocados pelas patas (**Painel A**). As áreas sob a curva (ASC) foram determinadas pelo método do trapézio (**Painel B**). O controle positivo de edema recebeu dextrana (300µg/pata, s.c.) e o controle negativo salina (0,1 mL/100g de massa corporal; s.c.). Média ± E.P.M. (n=6). *p<0,05 em relação a salina; # p<0,05 em relação a dextrana.

4.2 O polissacarídeo sulfatado de *Lobophora variegata* inibe apenas a segunda hora do edema de pata induzido por carragenina

Baseado na baixa atividade antiedematogênica do PLS sobre o edema elicitado por dextrana, procurou-se investigar sua atividade sobre outro estímulo inflamatório, a carragenina que produz edema de pata com grande infiltrado leucocitário e liberação temporal de vários mediadores inflamatórios (LO *et al.*, 1982). A injeção subcutânea intraplantar de carragenina (1mg/pata) promoveu intenso edema, com início na 1ª hora ($0,28 \pm 0,04$ mL), elevação brusca na 2ª hora ($0,92 \pm 0,07$ mL), atingindo valores máximos na 3ª hora ($0,98 \pm 0,04$ mL) de seu desenvolvimento em relação ao grupo salina ($0,067 \pm 0,04$ mL) ($0,067 \pm 0,04216$ mL) ($0,03 \pm 0,03$ mL) nas respectivas horas. A administração e.v. do PLS (1mg/kg), 30 minutos antes da injeção de carragenina, inibiu significativamente este edema somente aos 120 minutos em cerca de 47% ($0,48 \pm 0,04$ mL) (**Figura 8a**). Neste experimento, a diferença estatística também não foi detectada no cálculo da integral da área sob a curva (**Figura 8b**).

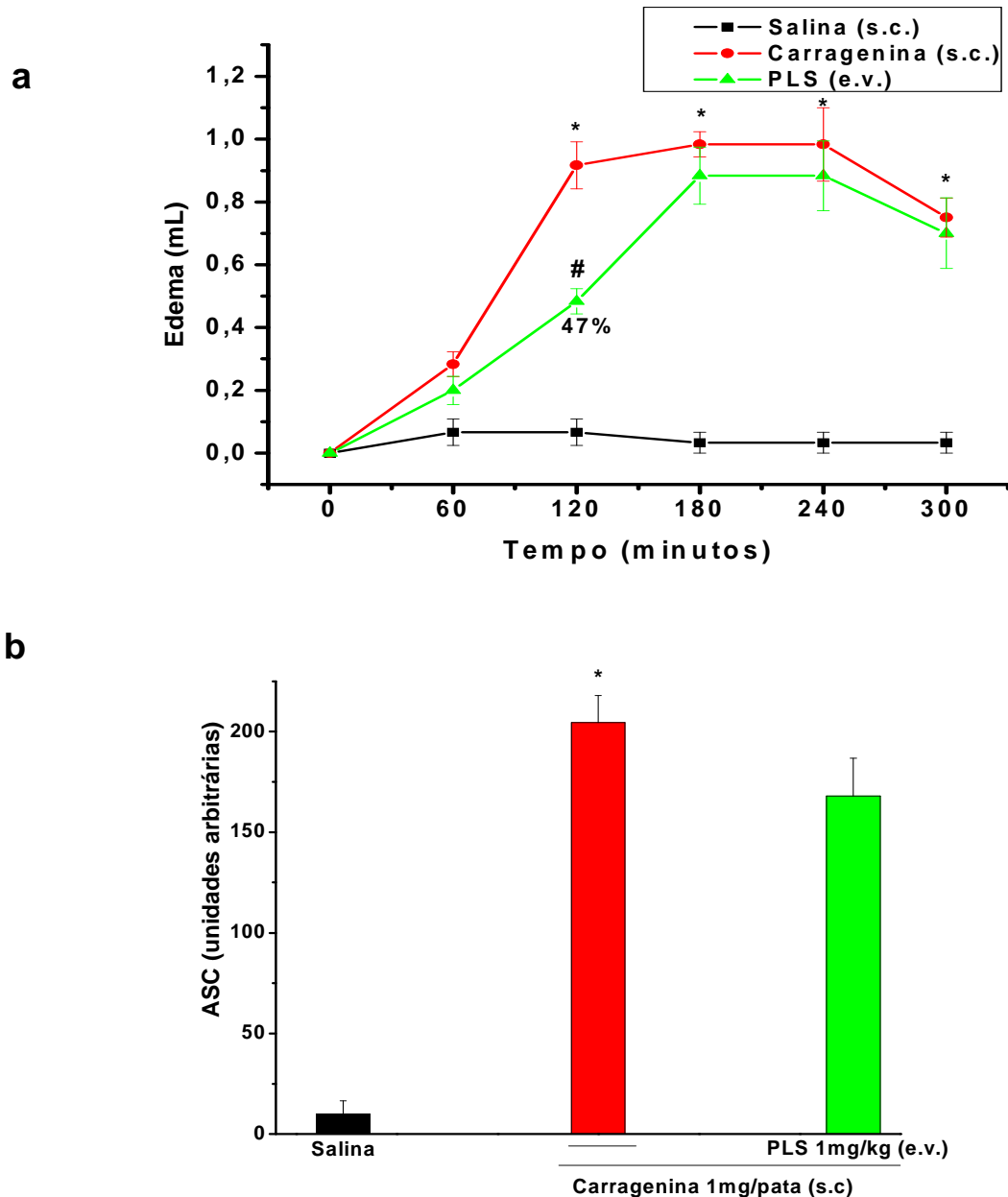


Figura 8. O polissacarídeo sulfatado de *L. variegata* inibe a segunda hora do edema de pata induzido carragenina. O edema foi medido antes (tempo zero) e 30, 60, 120, 180, 240 e 300 min. após a carragenina e calculado como a variação dos volumes (mL) deslocados pelas patas (**Painel A**). As áreas sob a curva (ASC) foram determinadas pelo método do trapézio (**Painel B**). O controle positivo de edema recebeu carragenina (1mg/pata, s.c.) e o controle negativo salina (0,1 mL/100g de massa corporal; s.c.). Média \pm E.P.M.(n=6). * $p < 0,05$ em relação a salina; # $p < 0,05$ em relação a carragenina.

4.3 O polissacarídeo sulfatado de *Lobophora variegata* inibe o curso temporal do edema de pata induzido por zymosan

Baseado na literatura, onde foi visto que fucanas sulfatadas inibem a cascata do sistema complemento *in vitro* (BLONDIN *et al.*, 1994), procurou-se avaliar o efeito do PLS de *L. variegata* sobre o edema de pata induzido por zymosan, uma substância cuja ação pró-inflamatória ocorre via influxo de monócitos e ativação do sistema do complemento (DAMAS; PRUNESCO, 1990). A injeção subcutânea intraplantar (s.c.) de zymosan (1mg/pata) promoveu intenso edema de pata com efeito máximo aos 60 min ($1,59 \pm 0,06\text{mL}$) em relação ao controle negativo ($0,27 \pm 0,067 \text{ mL}$), mantendo-se ainda elevado na 5^ah de seu desenvolvimento. O PLS injetado e.v., 30 min antes da administração de zymosan, nas doses de 0,01; 0,1 e 1mg/kg, teve efeito apenas na última dose, inibindo significativamente o edema a partir de 60 minutos, com maior percentual (em torno de 32%) na 2^a hora ($0,98 \pm 0,06\text{mL}$) em relação ao controle positivo ($1,43 \pm 0,07\text{mL}$) (**Figura 9a**). Nesta dose, observa-se que o curso temporal do edema induzido por zymosan foi inibido em cerca de 27% (Zymosan: $392,17 \pm 25,96$ X PLS: $293,25 \pm 20,84$ ASC) (**Figura 9b**).

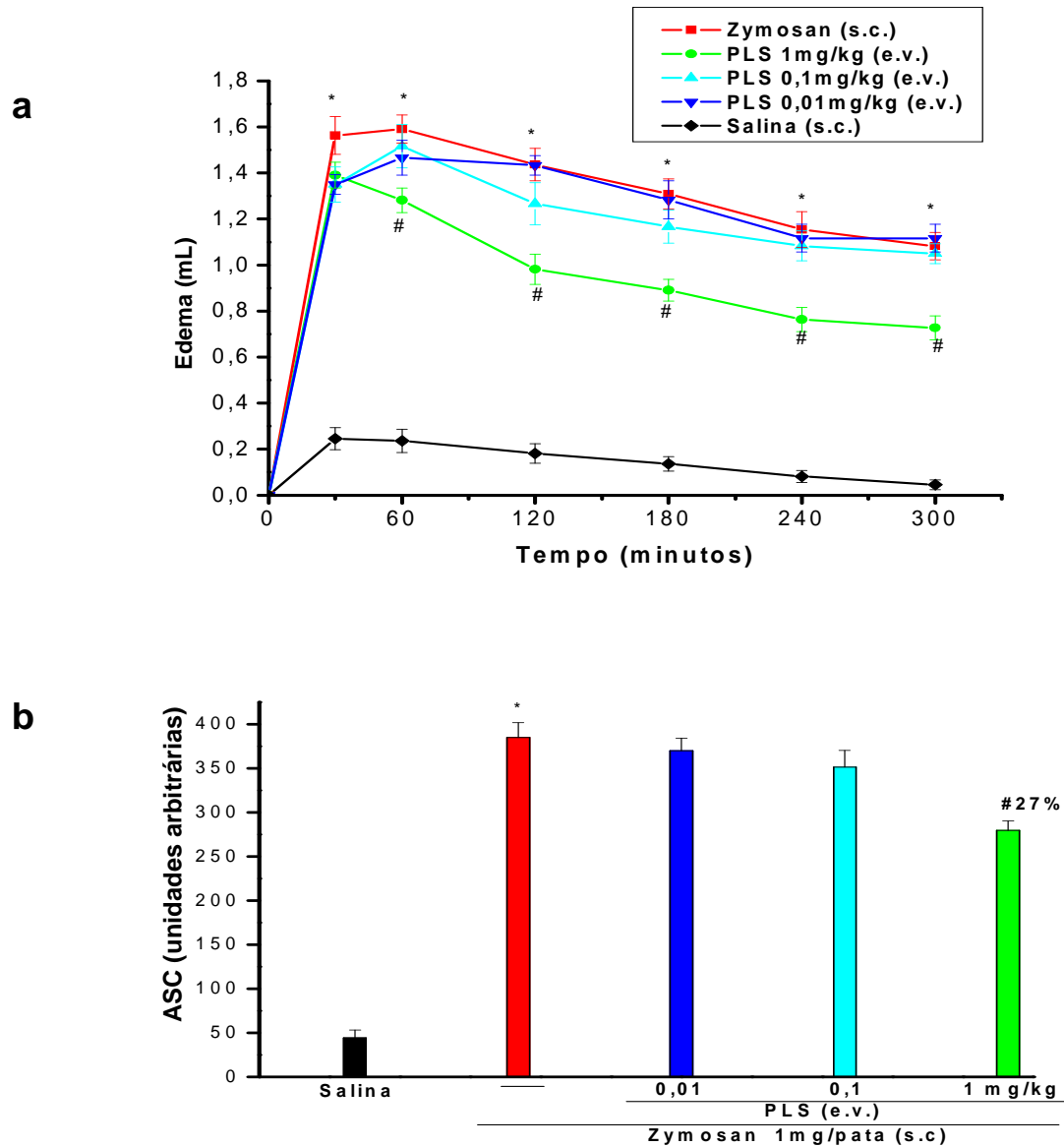


Figura 9. O polissacarídeo sulfatado de *L. variegata* inibe o curso temporal do edema de pata induzido por zymosan. O edema foi medido antes (tempo zero) e 30, 60, 120, 180, 240 e 300 minutos após a injeção de zymosan e expresso como variação dos volumes das patas (mL) entre os vários tempos e o tempo zero (**Painel A**). As áreas sobre a curva (ASC) foram determinadas, utilizando-se o método do trapézio (**Painel B**). O PLS (0,01; 0,1 e 1mg/kg) foi administrado e.v. 30 minutos antes do zymosan. O grupo controle positivo recebeu zymosan (1mg/pata, s.c.) e o controle negativo salina (0,1 mL/100g de massa corporal; s.c.). Média \pm E.P.M. (n= 12). *p<0,05 em relação a salina; # p<0,05 em relação ao zymosan.

4.4 O polissacarídeo sulfatado de *Lobophora variegata* inibe o aumento da permeabilidade vascular induzido por zymosan

Avaliou-se um segundo parâmetro inflamatório no modelo de edema de pata. O efeito do PLS de *L. variegata* foi testado o aumento de permeabilidade vascular nas patas dos animais induzido por zymosan.

A injeção s.c. intraplantar de zymosan (1mg/pata) induziu um edema típico (ver tópico 4.3.) acompanhado de aumento na permeabilidade vascular ($21,53 \pm 0,62$ $\mu\text{g/g}$ de pata) após 2 horas, em relação ao grupo salina ($8,31 \pm 1,69$ $\mu\text{g/g}$). O pré-tratamento (30 minutos) e.v. com o PLS inibiu significativamente este aumento da permeabilidade vascular em cerca de 44% ($11,96 \pm 0,68$ $\mu\text{g/g}$) (**Figura 10**).

Este dado confirma a capacidade antiinflamatória do PLS utilizado através da inibição da quantidade de proteína plasmática extravasada para os tecidos da pata, como indicador indireto de aumento de permeabilidade vascular.

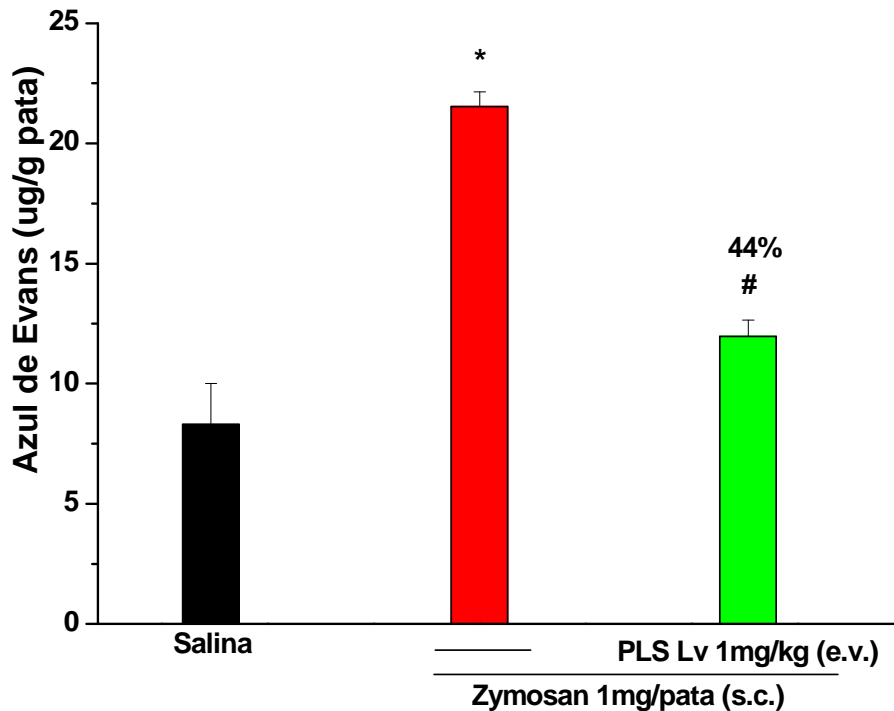


Figura 10. O polissacarídeo sulfatado de *L. variegata* inibe o aumento de permeabilidade vascular induzido por zymosan. Os animais receberam azul de Evans (25 mg/kg; e.v.), 1h antes do sacrifício. As patas foram seccionadas, pesadas e incubadas com 1ml de formamida à 36°C por 72h. A quantificação do azul de Evans ($\mu\text{g/g}$ pata) foi realizada por espectrofotometria (A600 nm). Os animais foram pré-tratados com o PLS (1mg/kg, e.v.), 30 minutos antes do controle positivo zymosan (1mg/pata, s.c.) e 90 min antes do azul de Evans. O controle negativo recebeu salina (0,01 mL/Kg, s.c.). Média \pm E.P.M. (n= 6). * $p < 0,05$ em relação a salina; # $p < 0,05$ em relação ao zymosan.

4.5 O polissacarídeo sulfatado de *Lobophora variegata* inibe a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos induzida por zymosan

Com o intuito de avaliar a capacidade do PLS de *L. variegata* em alterar o principal componente celular da inflamação aguda, utilizou-se o zymosan (1mg/kg; i.p) como estímulo para induzir migração de neutrófilos para a cavidade abdominal de ratos. O número total de células presentes no fluido peritoneal, 4 horas após a injeção do estímulo foi $5,15 \pm 1,21$ cél./ $10^3\mu\text{l}$ comparado ao grupo salina ($1,28 \pm 0,14$ cél./ $10^3\mu\text{l}$). O PLS, administrado 30 minutos antes do zymosan, inibiu a migração destas células em cerca de 61% ($1,99 \pm 0,16$ cél./ $10^3\mu\text{l}$), retornando aos valores do controle negativo (**Figura 11**). A redução do número de leucócitos peritoneais se deveu principalmente à inibição da migração de neutrófilos, visto que o PLS inibiu em 75% ($0,46 \pm 0,12$ leucócitos/ $10^3\mu\text{l}$) o número destas células quando comparado ao grupo zymosan ($4,2 \pm 1,08$ leucócitos/ $10^3\mu\text{l}$).

Uma vez demonstrada a importante atividade inibitória do PLS de *L. variegata* sobre eventos celulares, o próximo passo foi investigar quais os possíveis mediadores inflamatórios estariam sendo inibidos por este através da indução de edema de pata por agentes flogísticos específicos.

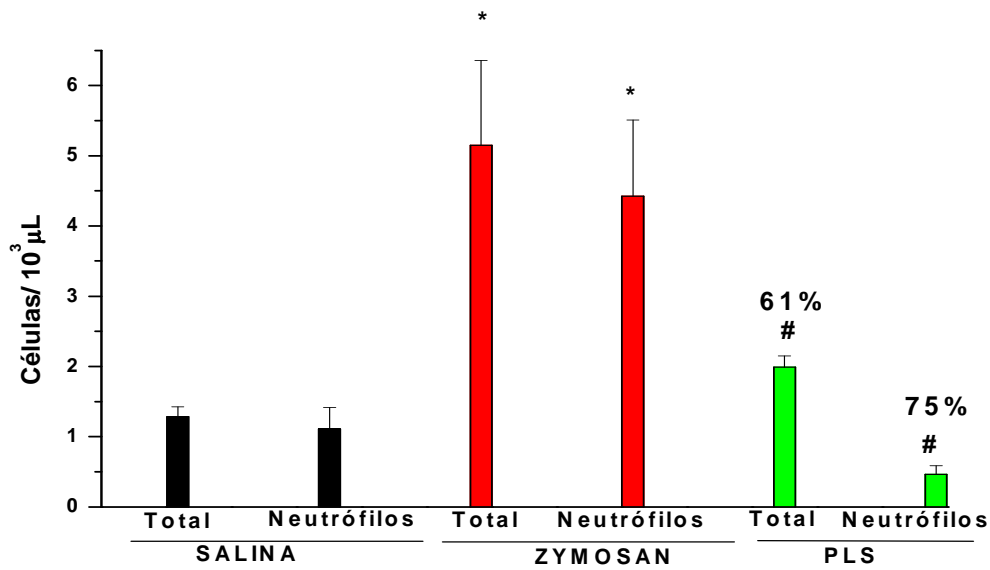


Figura 11. O polissacarídeo sulfatado de *L. variegata* inibe a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos induzida por zymosan. O grupo controle positivo recebeu zymosan (1mg/ml/cavidade; i.p.) e o controle negativo, mesmo volume de salina. O PLS de *L. variegata* (1mg/kg) foi injetado (e.v.), 30 min antes do zymosan. Os animais foram sacrificados 4 horas após a injeção do estímulo para coleta e contagem total e diferencial de leucócitos do fluido peritoneal. * $p < 0,05$ em relação a salina; # $p < 0,05$ em relação ao zymosan.

4.6 O polissacarídeo sulfatado de *Lobophora variegata* inibe o edema de pata induzido por L-arginina a partir da primeira hora de seu desenvolvimento

A injeção de L-arginina (15 μ g/pata; s.c.), utilizada como substrato para geração de NO, promoveu intenso edema de pata, mantido até a 4^ah de seu desenvolvimento, com efeito máximo aos 30 min (1,04 \pm 0,06 mL) em relação ao controle negativo (0,3 \pm 0,04 mL). O tratamento prévio dos animais com o PLS (1mg/kg; e.v.), 30 min antes da L-arginina, inibiu significativamente o edema a partir de 60 min: 60 min (0,52 \pm 0,02 mL) em 43%, 120 min (0,35 \pm 0,05 mL) em 59%, 180 min em 79% (maior percentual) (0,18 \pm 0,04 mL) e 240 min em 65% (0,22 \pm 0,02 mL) com relação ao controle positivo (0,9 \pm 0,01 mL) (0,86 \pm 0,04 mL) (0,88 \pm 0,04 mL) (0,62 \pm 0,08 mL), nos tempos respectivos (**Figura 12a**). O tratamento prévio (1 h antes do estímulo) dos animais com L-NAME (30mg/kg; e.v.), utilizado como controle de inibição da formação de NO, inibiu o edema de pata induzido por L-arginina aos 60 e 120 min, com percentuais semelhantes ao PLS de 44% (0,50 \pm 0,00 mL) e 56% (0,38 \pm 0,08 mL), respectivamente. O máximo efeito inibitório do L-NAME ocorreu aos 180 minutos (0,36 \pm 0,07 mL) em 59%, coincidente com o efeito máximo do PLS (**Figura 12a**). Contudo, após 180 min, o efeito inibitório do L-NAME desapareceu, enquanto aquele do PLS prosseguiu até 240 min. Observa-se que o curso temporal total do edema induzido por L-arginina foi inibido em cerca de 57% pelo PLS enquanto o L-NAME inibiu apenas 31% o curso temporal (**Figura 12b**).

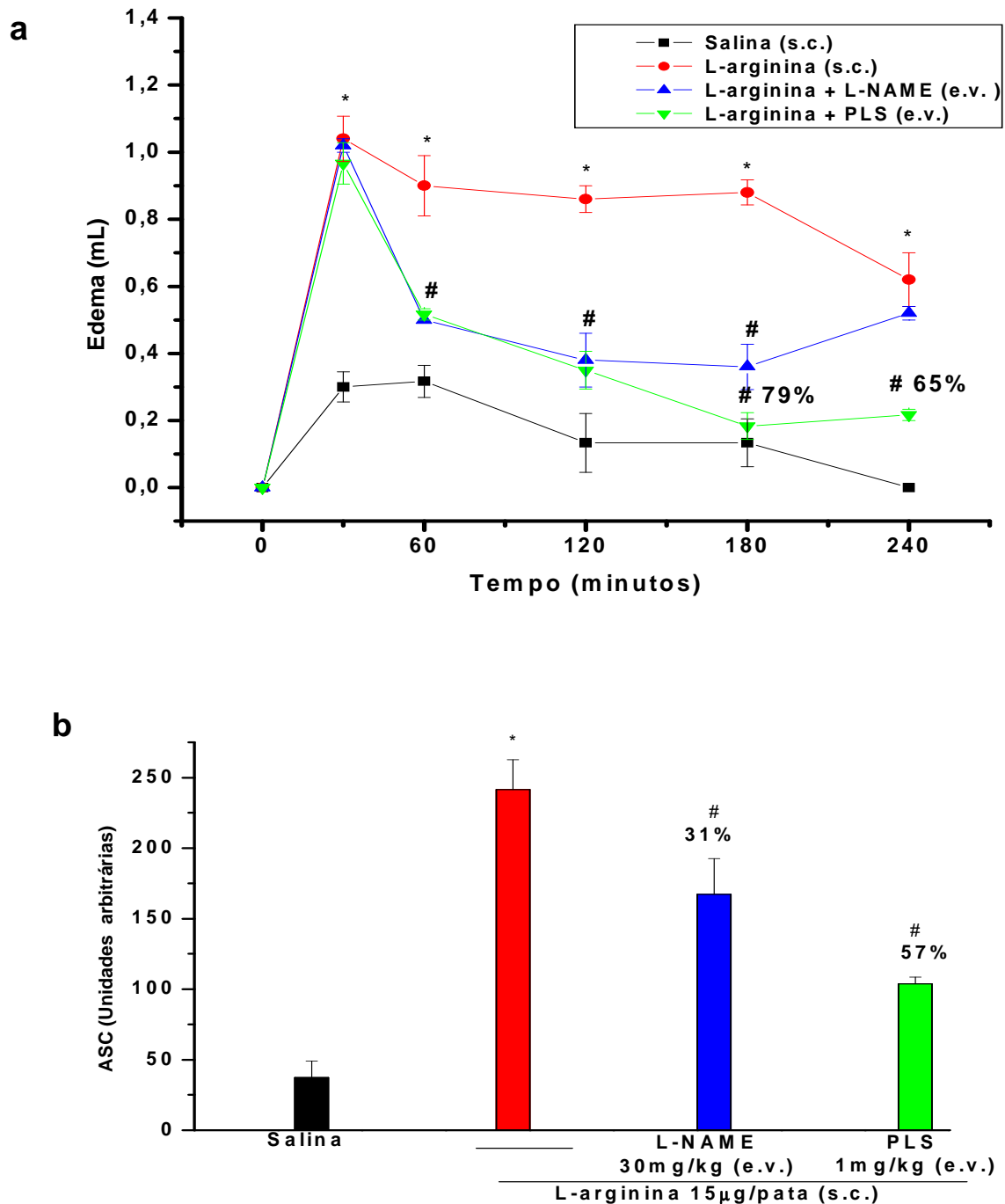


Figura 12. O polissacarídeo sulfatado de *L. variegata* inibe o edema de pata induzido por L-arginina a partir da primeira hora. O edema foi medido antes (tempo zero) e 30, 60 120, 180 e 240 minutos após a injeção de L-arginina e expresso como a variação dos volumes das patas (mL) entre os vários tempos e o tempo zero (Painel A**). O PLS foi administrado (1mg/kg, e.v.) 30 minutos antes da L-arginina (15µg/kg, s.c.- controle positivo); controle de inibição: L-arginina (s.c.) + L-NAME (30 mg/kg; e.v.); controle negativo: salina (0,1 mL/100g de massa corporal) s.c. Média ± E.P.M. (n= 6). As áreas sobre a curva (ASC) foram determinadas, utilizando-se o método do trapézio (**Painel B**) *p<0,05 em relação a salina; # p<0,05 em relação a L-arginina.**

4.7 O polissacarídeo sulfatado de *Lobophora variegata* inibe o edema de pata induzido por fosfolipase A₂ a partir da segunda hora de seu desenvolvimento

O edema de pata induzido por fosfolipase A₂ (30 mg/pata, s.c.), substância que hidrolisa fosfolídeos de membrana e age na cascata do ácido araquidônico liberando prostaglandinas, foi inibido pelo tratamento prévio dos animais com o PLS (1mg/kg; e.v.), 30 min antes ou com um inibidor da síntese de ciclooxigenases (indometacina; 5 mg/kg; s.c.), 1 h antes do estímulo.

A fosfolipase A₂ promoveu intenso edema de pata com efeito máximo aos 30 min ($0,62 \pm 0,03$ mL) em relação ao controle negativo ($0,16 \pm 0,03$ mL), mantendo-se ainda elevado na 5^ah de seu desenvolvimento. O PLS inibiu significativamente o edema nos tempos de: 120 min ($0,35 \pm 0,04$ mL) em 45%, 180 min (maior percentual) em 35% ($0,33 \pm 0,03$ mL), 240 min em 41% ($0,28 \pm 0,03$ mL) e 300 min em 24% ($0,28 \pm 0,03$ mL) com relação ao controle positivo ($0,63 \pm 0,04$ mL), ($0,52 \pm 0,03$ mL), ($0,48 \pm 0,02$ mL) e ($0,37 \pm 0,02$ mL), nos tempos respectivos. A indometacina, potente inibidor não-seletivo da COX, inibiu o edema induzido pela fosfolipase A₂ a partir de 60 min ($0,27 \pm 0,022$ mL) quando comparado ao controle ($0,48 \pm 0,05$ mL). O PLS, de forma semelhante a indometacina, inibiu o edema de pata induzido por fosfolipase A₂ apenas a partir de 120 min. (**Figura 13 a e b**). A indometacina (35%) portanto, apresentou um percentual inibitório maior que o PLS (19%) no edema de pata induzido por fosfolipase A₂, verificado na área sobre a curva ($124 \pm 3,75$ X PLS: $100,25 \pm 6,1$ ASC).

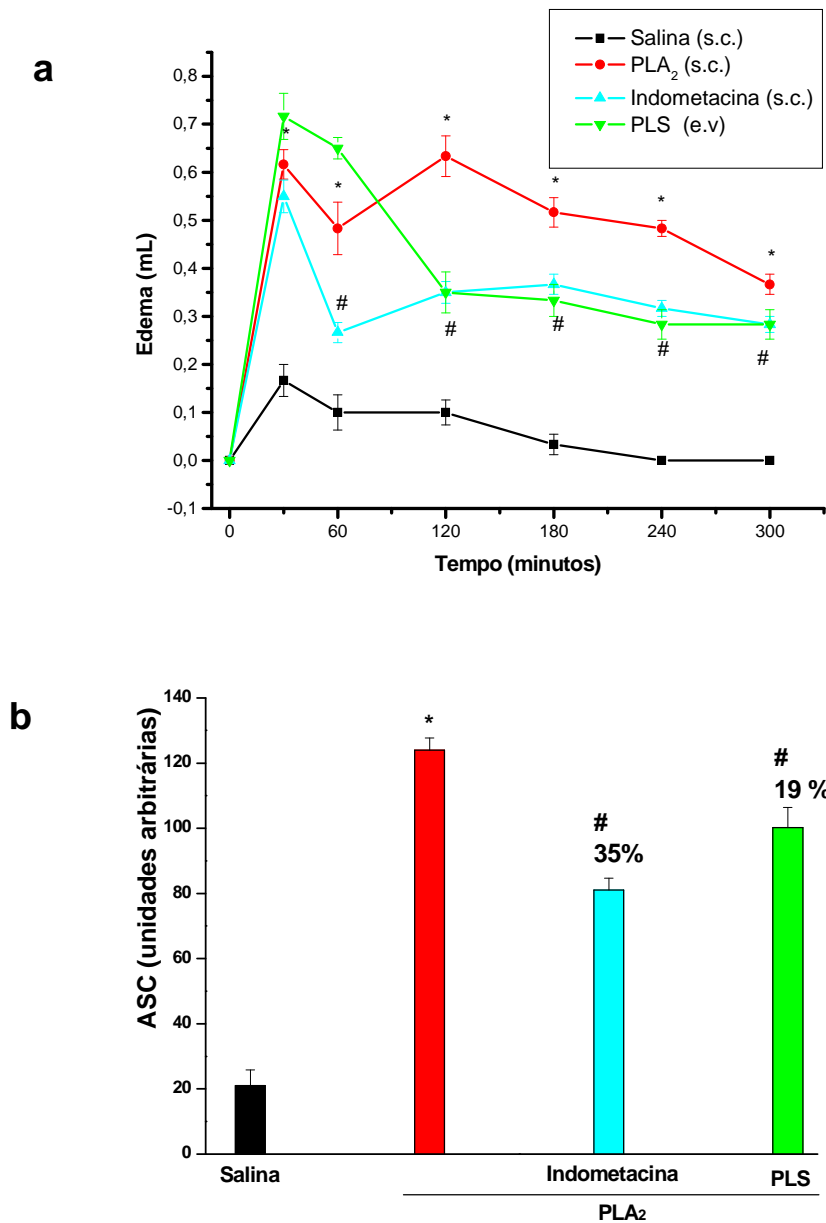


Figura 13. O polissacarídeo sulfatado de *L. variegata* inibe o edema de pata induzido por fosfolipase A₂ a partir da segunda hora. O edema foi medido antes (tempo zero) e 30, 60, 120, 180, 240 e 300 minutos após a injeção de fosfolipase A₂ e expresso como a variação dos volumes das patas (mL) entre os vários tempos e o tempo zero. O PLS foi administrado (1mg/kg, e.v.) 30 minutos antes da fosfolipase A₂ (30 mg/pata; s.c.-controle positivo); controle de injeção: fosfolipase A₂ (s.c.) + indometacina (5 mg/kg; e.v.); controle negativo: salina (0,1 mL/100g de massa corporal) s.c. Média ± E.P.M. (n= 6). *p<0,05 em relação a salina; # p<0,05 em relação a fosfolipase A₂.

4.8 O polissacarídeo sulfatado de *Lobophora variegata* não é edematogênico

Averiguando-se a atividade pró – inflamatória do PLS utilizou-se o próprio PLS como agente edematogênico. O PLS avaliado nos tempos de 30, 60 120, 180, 240 e 300 min e injetado por via s.c. intraplantar na doses de 0,01; 0,1 e 1 mg/Kg e não produziu edema em nenhuma das doses testadas ($69 \pm 9,8$; $60,3 \pm 3,37$ e $60,6 \pm 7,2$ ASC, respectivamente) em relação ao grupo salina ($47,1 \pm 10,1$ ASC) (**Figura 14 a e b**).

A incapacidade do PLS em induzir edema pata, sugestiva de ausência de efeito vasodilatador, foi investigada a seguir *in vitro*, utilizando-se anéis de aorta isolados de ratos.

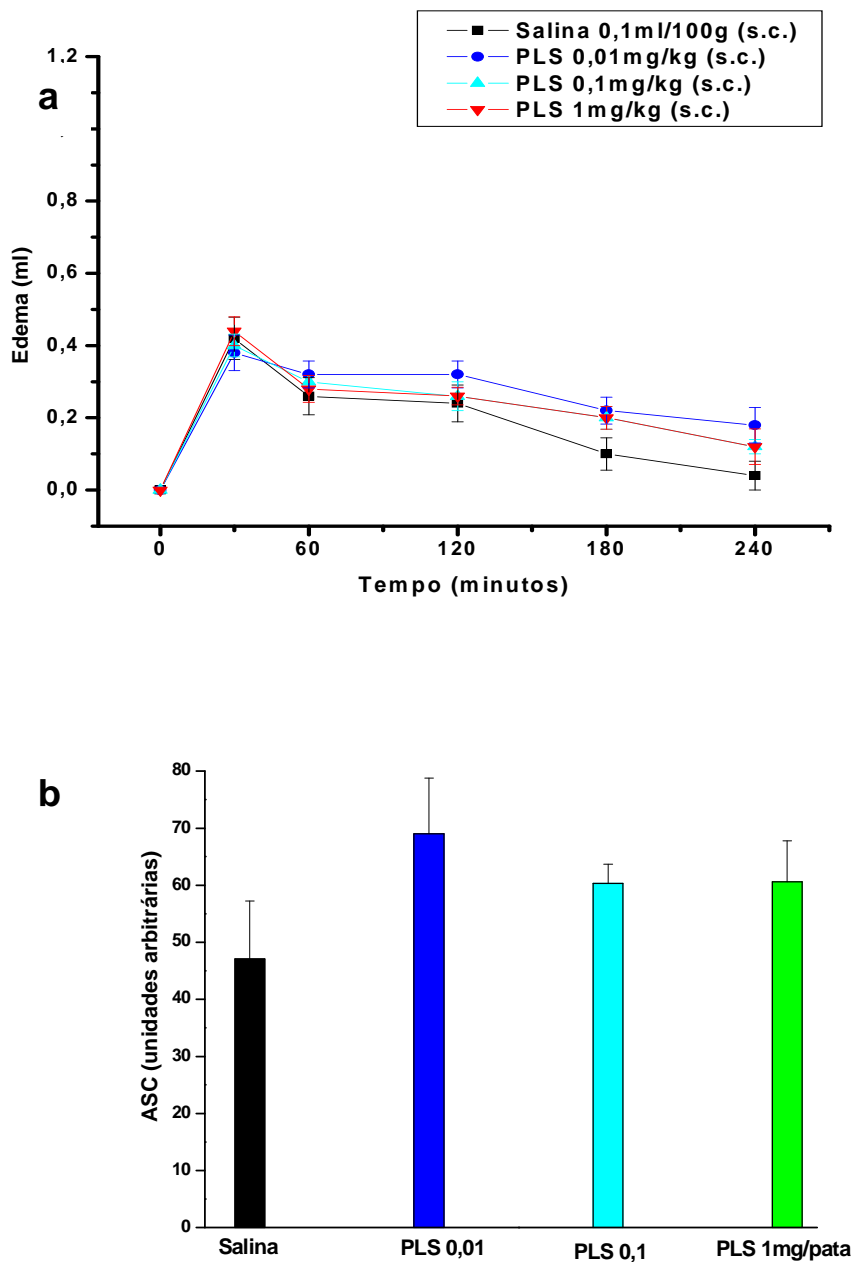


Figura 14. O polissacarídeo sulfatado de *L. variegata* não é edematogênico. O edema foi medido antes (tempo zero) e 30, 60 120, 180 e 240 minutos após a injeção do PLS e expresso como a variação dos volumes das patas (mL) entre os vários tempos e o tempo zero. O PLS foi administrado s.c. 1mg/pata na pata traseira direita dos ratos. O grupo controle negativo recebeu salina (0,01 mL/kg de peso corporal; s.c.) na pata traseira esquerda. Média \pm E.P.M. (n= 6). ASC (unidades arbitrárias)

4.9 O polissacarídeo sulfatado de *Lobophora variegata* inibe as contrações induzidas por fenilefrina apenas em aortas endotelizadas e em concentração elevada

A fenilefrina (Phe; $0,1 \mu\text{M}$) induziu contrações tônicas estáveis em aortas de rato, com amplitudes médias de $0,56 \pm 0,04$ g (**Figura 15a**) e de $0,988 \pm 0,147$ g (**Figura 15b**) na presença e ausência de endotélio, respectivamente. O PLS testado nas concentrações de 1-300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ induziu relaxamento significativo de 32,7% somente na concentração de 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($64,3 \pm 6,0$ g) e em aortas com endotélio ($32,7 \pm 4,78\%$) (**Figura 15d**). É importante ressaltar que o PLS não alterou a resposta contrátil da fenilefrina em aortas desprovidas de endotélio (**Figura 15c**). Observou-se ainda que o PLS não alterou a responsividade do tecido, visto a capacidade de contração por KCl após a lavagem (**Figura 15a e 15b**).

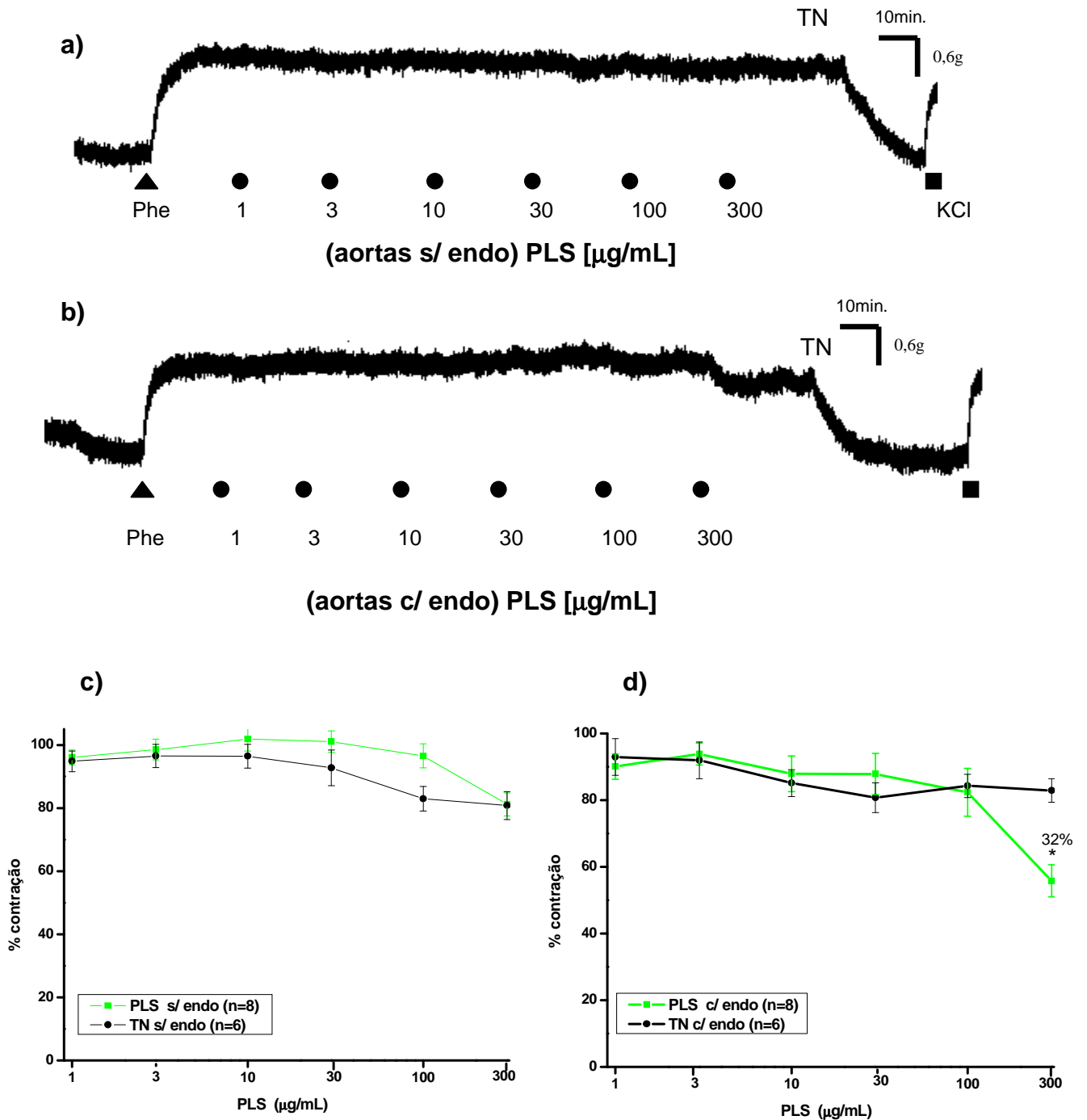


Figura 15. Efeito relaxante do polissacarídeo sulfatado de *L. variegata* em aortas com e sem endotélio contraídas por fenilefrina. Registro típico do relaxamento induzido pelo PLS (●; 1 a 300 $\mu\text{g/mL}$) a) sobre aortas endotelizadas e sem endotélio (n=5); c) Gráfico do efeito do PLS em aortas com e sem endotélio. Média \pm EPM (g); * $p < 0.05$ em relação ao controle (100% de contração). PLS: Polissacarídeo sulfatado de *L. variegata*; Phe (▲; 0,1 μM): fenilefrina; KCl (■ ; 60mM): cloreto de potássio; TN: lavagem com Tyrode.

4.10 O polissacarídeo sulfatado de *Lobophora variegata* não altera o tônus basal de aortas

Com base no baixo efeito relaxante do polissacarídeo sulfatado *L. variegata* sobre aortas contraídas por fenilefrina, procurou-se avaliar sua ação sobre o tônus basal de anéis de aorta em presença ou ausência de endotélio. A adição cumulativa (1 – 300µg/mL) do PLS não alterou o tônus basal (0% de contração) em nenhuma das concentrações utilizadas (**Figura 16 a, b, c, e d**).

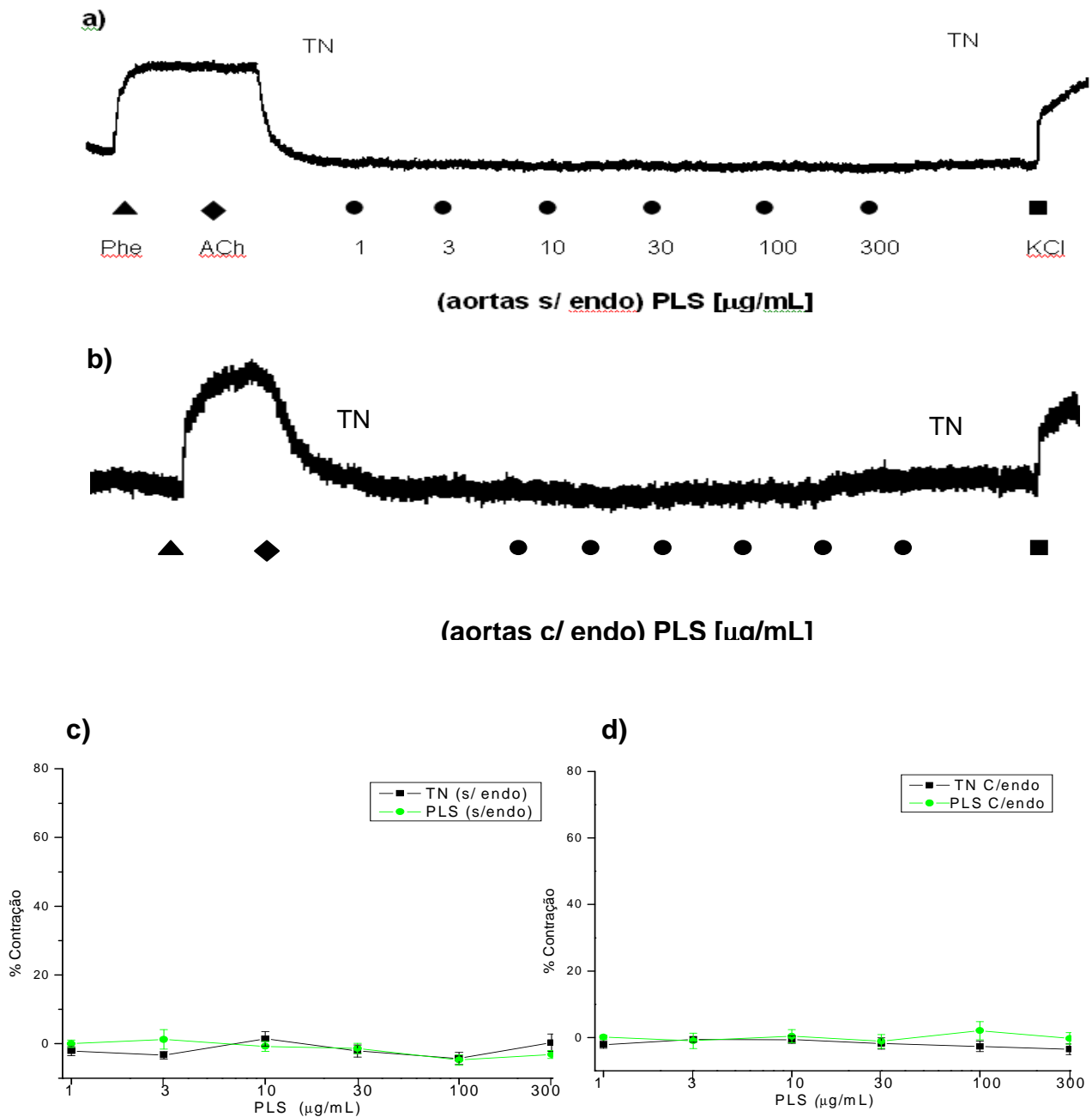


Figura 16. O polissacarídeo sulfatado de *L. variegata* não altera o tônus basal de aortas isoladas. Registro típico do efeito da PLS (●; 1 a 300 $\mu\text{g/mL}$) sobre o tônus basal de aortas a) sem endotélio (s/ endo; n=6); b) com endotélio (c/ endo; n=6); Comparação do efeito do PLS sobre o tônus basal em preparações sem (c) e com endotélio (b) n=6; Média \pm EPM (g). PLS: polissacarídeo sulfatado de *L. variegata*; e Phe (▲; 0,1 μM): fenilefrina; ACh (◆; 1 μM): acetilcolina; KCl (■; 60mM): cloreto de potássio; TN: lavagem com Tyrode.

4.11 Tratamento subcrônico de ratos com o polissacarídeo sulfatado de *Lobophora variegata*

A injeção de PLS injetado em dose única (1mg/kg; e.v.; veia caudal) por 7 dias consecutivos não alterou significativamente o peso corporal dos animais ou dos órgãos avaliados (coração, baço, rim e fígado), quando comparado ao grupo injetado com salina (**Tabela 2**). A avaliação macroscópica demonstrou morfologia normal e ausência de edema em todos os órgãos, tendo o estômago demonstrado mucosas intactas, sem grau de lesão visível. O número de leucócitos circulantes no sangue (leucograma) dos animais tratados com o polissacarídeo também não foi afetado significativamente em relação ao controle (**Tabela 3**). Além disso, a dosagem de uréia e creatinina, utilizadas como parâmetro de avaliação renal, não foram diferentes significativamente do controle. O mesmo ocorreu com as atividades cinéticas das enzimas hepáticas (aspartato amino transferase e alanina amino transferase). Quanto às proteínas plasmáticas albumina e globulina, avaliadas como controle de manutenção de equilíbrio osmótico, não foram diferentes significativamente do controle (**Tabela 4**).

Tabela 2. O tratamento de ratos com o polissacarídeo sulfatado de *Lobophora variegata* não altera o peso corporal dos animais e o peso úmido de seus órgãos.

^bPeso corporal (g) e de órgãos (g/100g peso corporal)	^aTratamento (100µl/100g)	
	SALINA (0,9%)	PLS (1mg/Kg)
Peso corporal antes	^c 160,00 ± 7,7	163,83 ± 6,08
Peso corporal depois	175,00 ± 8,1	178,33 ± 8,16
Fígado	7,25 ± 0,82	5,91 ± 0,32
Rim	0,66 ± 0,08	0,69 ± 0,06
Coração	0,67 ± 0,03	0,56 ± 0,05
Baço	0,53 ± 0,06	0,43 ± 0,05

^a Ratos foram injetados e.v. em dose única diária durante 7 dias;

^b Após o tratamento, os animais foram pesados, sacrificados e seus órgãos removidos e pesados ainda úmidos;

^c Média ± E.P.M. (n=7).

Tabela 3. O tratamento de ratos com o polissacarídeo sulfatado de *L. variegata* não altera o leucograma dos animais.

^bLeucograma (%)	^aTRATAMENTO (100µl/100g)	
	SALINA (0,9%)	PLS (1mg/Kg)
Contagem total	^c 6,22 ± 1,24	7,8 ± 2,0
Neutrófilos	26,47 ± 10,55	37,3 ± 14,0
Eosinófilos	1,48 ± 0,41	1,88 ± 0,87
Basófilos	0,48 ± 0,48	0,42 ± 0,49
Monócitos	0,70 ± 0,42	0,33 ± 0,16
Linfócitos	70,87 ± 10,27	60,03 ± 14,34

^a Ratos foram injetados e.v. em dose única diária durante 7 dias;

^b Após o tratamento, os animais foram sacrificados, e foi coletado sangue para a contagem total e diferencial de leucócitos

^c Média ± E.P.M. (n=7).

Tabela 4. O tratamento de ratos com o polissacarídeo sulfatado de *L. variegata* não altera parâmetros bioquímicos.

^bDosagens	^aTRATAMENTO (100µl/100g)	
	SALINA (0,9%)	PLS (1mg/Kg)
Uréia (mg/dl)	^c 54,55 ± 6,68	62,12 ± 6,47
Creatinina (mg/dl)	0,63 ± 0,07	0,63 ± 0,17
AST (U/L)	146,80 ± 11,60	232,67 ± 82,11
ALT (U/L)	32,00 ± 4,51	30,83 ± 9,11
Proteínas totais (g/dl)	6,94 ± 0,31	6,71 ± 0,30
Albumina (mg/dl)	4,60 ± 0,15	4,18 ± 0,11
Globulina (mg/dl)	2,34 ± 0,26	2,53 ± 0,28

^a Ratos foram injetados e.v. em dose única diária durante 7 dias;

^b Após o tratamento, os animais foram sacrificados, e foram coletadas amostras de sangue para a dosagem de avaliação da função renal e hepática

^c Média ± E.P.M. (n=7).

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que o polissacarídeo sulfatado da alga marinha parda *Lobophora variegata*, apresenta efeito antiinflamatório diferenciado, de acordo com o estímulo inflamatório utilizado nos modelos de edema de pata e peritonite.

A atividade antiinflamatória mais importante do PLS de *L. variegata* foi observada sobre o edema de pata induzido por zymosan, embora este tenha também inibido a fase inicial (30 min) do edema induzido por dextrana, bem como a segunda hora do curso temporal do edema induzido por carragenina.

A dextrana é uma substância que induz edema de característica osmótica acelular e aumento da permeabilidade vascular, com efeito máximo já nos primeiros 30 min de seu desenvolvimento e participação exclusiva de mediadores como histamina, serotonina e bradicinina (BERSTAD 1980; LO *et al.*, 1982; MOODLEY *et al.*, 1982). Por outro lado, a carragenina, caracteriza-se por ser um agente que induz um edema bifásico com liberação temporal de diversos mediadores inflamatórios e grande infiltrado leucocitário (LO *et al.*, 1982). Na primeira fase (0-1 h) ocorre liberação de histamina, bradicinina, serotonina e NO formado pela nNOS. A fase tardia (1-6 h) está correlacionada a uma elevada produção de prostaglandinas, via COX2, e NO, via iNOS (VINEGAR *et al.*, 1969; DIROSA *et al.*, 1971; LIMA, 1999; ALSWAYEH *et al.*, 2000). De acordo com esses achados, o mecanismo pelo qual o polissacarídeo de *L. variegata* exerce seu efeito antiedematogênico parece incluir como alvos de inibição mediadores osmóticos envolvidos no edema elicitado pela dextrana e excluir histamina, serotonina e bradicinina no edema elicitado por carragenina.

Como já foi afirmado, o efeito do PLS de *L. variegata* foi mais efetivo sobre o edema induzido por zymosan, inibindo, a partir da 1ª hora, todo o seu curso temporal de forma significativa, bem como o aumento de permeabilidade vascular provocado por este estímulo. O zymosan é um agente flogístico, componente da parede da levedura de *Saccharomyces cerevisiae*, que produz intensa resposta

inflamatória (LUNDBERG; ARFORS, 1983; TEIXEIRA *et al.*, 1993). Esta resposta é deflagrada através da ativação do sistema do complemento, gerando produtos com atividades quimiotáticas e liberação de superóxidos (SNYDERMAN *et al.*, 1970; FERNANDEZ *et al.*, 1978; LUNDBERG; ARFORS, 1983). O edema de pata elicitado por zymosan se inicia aos 30 minutos, com efeito máximo aos 60 min após sua administração e mostra também um padrão bifásico de liberação de mediadores inflamatórios, com formação de NO (fase inicial) e prostaglandinas (fase tardia).

Efeitos antiinflamatórios de fucanas, polissacarídeos sulfatados encontrados em maior concentração nas algas marinhas pardas, já vêm sendo relatados desde os anos 90 (BOISSON-VIDAL, 1995). Os resultados do presente estudo *in vivo* sobre o efeito antiedematogênico do PLS obtido da alga parda *L. variegata*, reforçam os estudos *in vitro* de Blondin e colaboradores (1994) e de Tissot e DANIEL (2003), no que se refere as ações inibitórias, dose dependente, de fucanas sulfatadas sobre a cascata do sistema do complemento.

Vale ressaltar que o efeito inibitório do PLS sobre o aumento de permeabilidade vascular foi 1,6X maior do que seu efeito sobre o edema induzido por zymosan. Estas diferenças de respostas, possivelmente podem justificar a inibição observada na fase inicial do edema osmótico induzido por dextrana. Além disso, o efeito inibitório do PLS sobre o edema de pata induzido por zymosan, que apresenta como característica a presença de infiltrado celular, sugere sua atuação, não apenas em eventos vasculares como também, em eventos celulares do processo inflamatório.

A literatura relata a ação inibitória (cerca de 100%) do PLS da alga parda *Dictyota menstrualis*, administrado por via endovenosa na dose de 20mg/kg em ratos 30 minutos do agente irritante zymosan, sobre a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal de ratos (ALBUQUERQUE, 2005). Neste trabalho, o PLS de *L. variegata* administrado em uma dose 20X menor seguindo o mesmo protocolo inibiu (cerca de 75%) a migração de neutrófilos induzida por este agente. Estes dados reforçam a literatura com respeito a ação inibitória de polissacarídeos sulfatados de algas pardas sobre a migração de leucócitos induzida por zymosan (LINNEMANN *et al.*, 2000). Além disso, o importante efeito inibitório sobre o recrutamento de

neutrófilos, células caracteristicamente encontradas nas primeiras 24 horas do desenvolvimento do processo inflamatório, sugere que a ação do PLS de *L. variegata* sobre a inflamação celular ocorre na fase aguda deste processo. Zymosan é um potente agente na liberação de radicais livres de oxigênio por macrófagos, células peritoneais residentes em ratos, sendo também mostrado que peróxido de hidrogênio é um grande fator na expressão de P-selectinas (ASSREUY *et al.*, 1997). Outros trabalhos mostram o fucoidan como um potente inibidor da migração de leucócitos através da interação com P e L-selectinas (KLINTMAN *et al.*, 2002). Baseado no fato de que fucanas de alto peso molecular inibem o rolamento de leucócitos induzidos por zymosan via ligação com L- e P-selectinas (WESTON; PARISH, 1991; ARUFFO *et al.*, 1991), pode-se especular que o polissacarídeo de *L. Variegata* possa estar atuando por essa mesma via. Reforçando este fato, foi visto que fucanas sulfatadas inibem adesão de marcadores radioativos e neutrófilos a superfície de artérias coronárias de porcos (CHAVET *et al.*, 1999). Como se sabe que os neutrófilos são as principais células de defesa do organismo, sendo consideradas células efetoras primárias nas em reações inflamatórias agudas induzidas por agentes infecciosos (VECCHIARELLI *et al.*, 2000), percebe-se que o PLS age na inibição da migração principalmente destas células (mais de 70%). Além disso, com o estabelecimento do processo infeccioso um extenso número de neutrófilos é recrutado da corrente sanguínea para o tecido lesado, processo facilitado pelo efeito de mediadores inflamatórios, estes mediadores promovem a dilatação dos vasos e conseqüente aumento da permeabilidade vascular (ANDREWS; SULLIVAN, 2003), como já mostrado este ultimo processo também foi inibido pelo PLS em mais de 40%. Portanto, é visto que o PLS de *Lobophora variegata* inibe tanto os eventos celulares, como também vasculares.

A inflamação é um conjunto complexo de eventos modulados por uma variedade de mediadores de origem celular e plasmática. Portanto, sabe-se que a formação de edema é resultado de um sinergismo entre vários mediadores inflamatórios que induzem aumento de permeabilidade vascular e/ou do fluxo sanguíneo (WILLIAMS; PECK, 1977). Neste estudo, o polissacarídeo sulfatado de *L. variegata* inibiu o edema induzido por dextrana apenas nos primeiros 30 minutos de seu desenvolvimento, com um percentual pequeno (19%) em relação à inibição observada sobre os edemas induzidos por zymosan (32%) e carragenina (47%).

Visto o efeito antiedematogênico do PLS sobre o edema induzido por estes dois últimos agentes ter ocorrido numa fase mais tardia, durante todo o curso temporal do zymosan e na segunda hora de desenvolvimento do edema elicitado por carragenina (com maior ação no tempo de 120 minutos), sugere-se que o mecanismo pelo qual o PLS produz sua atividade anti-edematogênica exclua os mediadores de fase inicial histamina, serotonina e bradicinina no edema de pata induzido por agentes não osmóticos.

Segundo Guhring (2001) a expressão máxima de mRNA da iNOS detectada no edema de pata causado por zymosan é ocasionado após a 3ª hora de sua administração. Dados da literatura mostram que a injeção subplantar de inibidores não seletivos da óxido nítrico – sintase inibem a fase inicial do desenvolvimento do edema induzido por zymosan. Por outro lado, inibidores não seletivos de ciclooxigenases reduzem a fase tardia do edema induzido por este estímulo. Além disso, sabe-se que o zymosan produz efeito edematogênico a partir de 30 minutos, com atividade máxima em 1 hora (CUZZOCREA *et al.*, 1996). O edema de pata induzido por zymosan apresentado neste trabalho seguiu o padrão relatado na literatura e a análise de quais mediadores estariam sendo inibidos pelo PLS de *L. variegata* foi feita através da indução de edema de pata por agentes flogísticos específicos visando estimular a produção de NO e prostaglandinas, usando como controle de inibição o L-NAME e a indometacina, respectivamente. Os dados obtidos corroboram com a literatura e mostraram que o L-NAME (inibidor não seletivo da NO sintase) (MONCADA *et al.*, 1991) inibiu a fase inicial do edema induzido por L-arginina, utilizada como substrato para a geração de NO. Foi evidenciado que o PLS apresentou um potencial de inibição semelhante ao L-NAME até 120min, apresentando, no entanto, maior percentual inibitório após este período. Isto sugere que o PLS, além de interferir com a via da NO sintase, pode estar bloqueando a via das ciclooxigenases a partir de 120 min do curso temporal do edema induzido por L-arginina. Também foi demonstrado que a indometacina (inibidor não seletivo de ciclooxigenase) inibiu o curso temporal do edema de pata elicitado pela fosfolipase A₂ a partir da primeira hora de seu desenvolvimento. A fosfolipase A₂ cataliza a hidrólise do ácido araquidônico a partir dos fosfolípidos de membrana por duas vias metabólicas, a via das ciclooxigenases e das lipoxigenases formando os mediadores inflamatórios prostaglandinas,

tromboxanos e leucotrienos (KINI; EVANS, 1989). Demonstrou-se que o efeito inibitório do PLS sobre o edema induzido pela fosfolipase A₂, seguiu o mesmo padrão de inibição daquele mostrado pela indometacina a partir da segunda hora de desenvolvimento, sugerindo, realmente, a ação inibitória do PLS na formação de prostaglandinas.

Tem sido descrito que as fosfolipases induzem aumento de permeabilidade microvascular e do fluxo sanguíneo na pata de ratos e camundongos causando edema (LANDUCCI *et al.*, 1998; ZULIANI *et al.*, 2004). A formação de edema pode estar também fortemente associada a ativação de mastócitos (CIRINO *et al.*, 1989; LANDUCCI *et al.*, 1998), que expressam e liberam fosfolipases do tipo II que têm a função de modular a degranulação destas células (ZULIANI *et al.*, 2004). Recentemente foi relatado que fucoidans possuem ação sobre a elevação dos níveis de óxido nítrico produzidos em macrófagos residentes via ativação de quinases dependentes de p-38 NF-κB. Apesar de ainda não ter sido elucidado, o fucoidan pode afetar a formação de NO em macrófagos estimulados por lipolissacarídeo, através da inibição da expressão de LPS mediado pela enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) via bloqueio da ativação de AP-1. Ademais, experimentos *in vitro* demonstraram que o fucoidan estimula a expressão da iNOS e inibem a produção de NO induzido por LPS em macrófagos residentes (NAKAMURA *et al.*, 2006). Isso reforça as evidências da literatura afirmando a possível interação entre as vias biossintéticas do NO e PG. (MOLLACE *et al.*, 2005; SALVEMINI *et al.*, 1996)

Por outro lado, o PLS de *L. variegata* não apresentou atividade pró-inflamatória, não estimulando, portanto, a formação de edema de pata em ratos. De acordo com estes resultados, a avaliação *in vitro* do efeito do PLS sobre as contrações induzidas por fenilefrina em anéis de aorta de ratos, também não evidenciaram uma grande ação vasodilatadora. Sabe-se que células endoteliais vasculares são responsáveis pela produção de fatores contracturantes (endotelina e angiotensina II) (MOMBOULI; VANHOUTTE, 1999; ANDERSON, 1999) e relaxantes (óxido nítrico, prostaciclina e fator hiperpolarizante derivado do endotélio) que agem na manutenção da homeostasia vascular (FELETOU; VANHOUTT, 1988; MONCADA *et al.*, 1991; SHIMOKAWA, 1999). Efeitos relaxantes que ocorrem com dependência do endotélio são mostrados em aortas de ratos por nosso grupo

através do uso de lectinas de algas marinhas e plantas leguminosas (LIMA *et al.*, 2004; GADELHA *et al.*, 2005). Contudo, de acordo com os nossos achados, esses estudos são escassos na literatura quando relacionados a polissacarídeos sulfatados. Apesar do PLS de *Lobophora variegata* não ter induzido edema de pata, e conseqüentemente, não apresentar efeito no aumento do fluxo sanguínea, procuramos confirmar esse efeito através de um modelo de dilatação vascular *in vitro*, utilizando anéis de aorta de ratos. O PLS apresentou efeito relaxante somente na dose de 300µg/mL em anéis de aorta contraídos com fenilefrina. Estes dados podem ser correlacionados aos experimentos *in vivo* onde foi visto que o PLS além de inibir prostaglandinas inibe NO que é um fator derivado do endotélio. Isto sugere que estas ações *in vitro* podem estar correlacionadas ao papel dos fatores derivados do endotélio.

A identificação do exato mecanismo de ação do PLS de *L. variegata* carece de maiores investigações. No entanto, estudos indicam que as atividades biológicas destes compostos estão relacionadas com as interações entre carboidratos e proteínas, e estas são fatores determinantes para a função biológica e fisiológica destes compostos (WILLIAMS; DAVIES, 2001). É possível que moléculas de polissacarídeos sulfatados possuam suas atividades biológicas por dois mecanismos. Um é a interação com células e a outra é a interação com fatores do crescimento/ citocinas que regulam proteoglicanos (SATO *et al.*, 2008). O efeito biológico de fucanas tem sido dependente do grau de sulfatação e do tamanho da molécula do polissacarídeo (ALBUQUERQUE, 2005). Estudos com fucanas de algas demonstraram que suas estruturas são muito complexas e variam de espécie para espécie e às vezes em diferentes partes da mesma planta ou mesmo de acordo com o método de purificação (FARIAS, 1993; DIETRICH *et al.*, 1985; ALVES, 2000; CHEVOLOT *et al.*, 2001 apud ALBUQUERQUE, 2005). Esta complexidade está relacionada a muitas possibilidades de ligações entre diferentes monossacarídeos e de distribuição dos grupos sulfato.

É importante ressaltar que o tratamento endovenoso dos animais com, o PLS não causou toxicidade *in vivo* (peso corporal, órgão, função renal e hepática, etc.) e *in vitro*, visto que o PLS não alterou a responsividade do endotélio das aortas, quando contraídas com KCl. O número de leucócitos circulantes no sangue

(leucograma) dos animais tratados com o polissacarídeo também não foi afetado sugerindo que este carboidrato não promoveu aglutinação de leucócitos ou efeitos secundários nos tecidos linfóides, mantendo preservado o número de células de defesa. Na avaliação da função renal, foi visto que as dosagem de uréia e creatinina não foram alteradas, assim como as atividades cinéticas das enzimas hepáticas (aspartato amino transferase e alanina amino transferase) sugerindo o funcionamento normal do rim e fígado, respectivamente. O equilíbrio osmótico, visto através das alterações plasmáticas de albumina e globulina, também não foi alterado sugerindo que o PLS apresenta uma excelente tolerância pelos animais, uma vez que o tratamento agudo não provocou alteração em nenhum dos parâmetros descritos.

Estes resultados sugerem que este polissacarídeo sulfatado da alga parda *Lobophora variegata* pode abrir o campo das indústrias farmacêuticas a novas substâncias com grandes propriedades antiinflamatória. Além disso, a ausência de efeito anticoagulante, sugere uma importante ação imunomoduladora. Deste modo a ação desses compostos sempre vem acompanhada de novas perspectivas de descobertas de um novo fármaco ou de um novo composto a ser utilizado pelas indústrias, tais como, química, farmacêutica ou alimentícia.

Por fim, os resultados do presente trabalho mostram o potencial farmacológico do PLS de *L.variegata* como ferramenta para o estudo da inflamação e aplicação biotecnológica. Em conclusão, através deste estudo estendem-se ainda mais a lista de atividades biológicas de polissacarídeos sulfatados de algas marinhas, principalmente em ações *in vivo* na inflamação que ainda são raras.

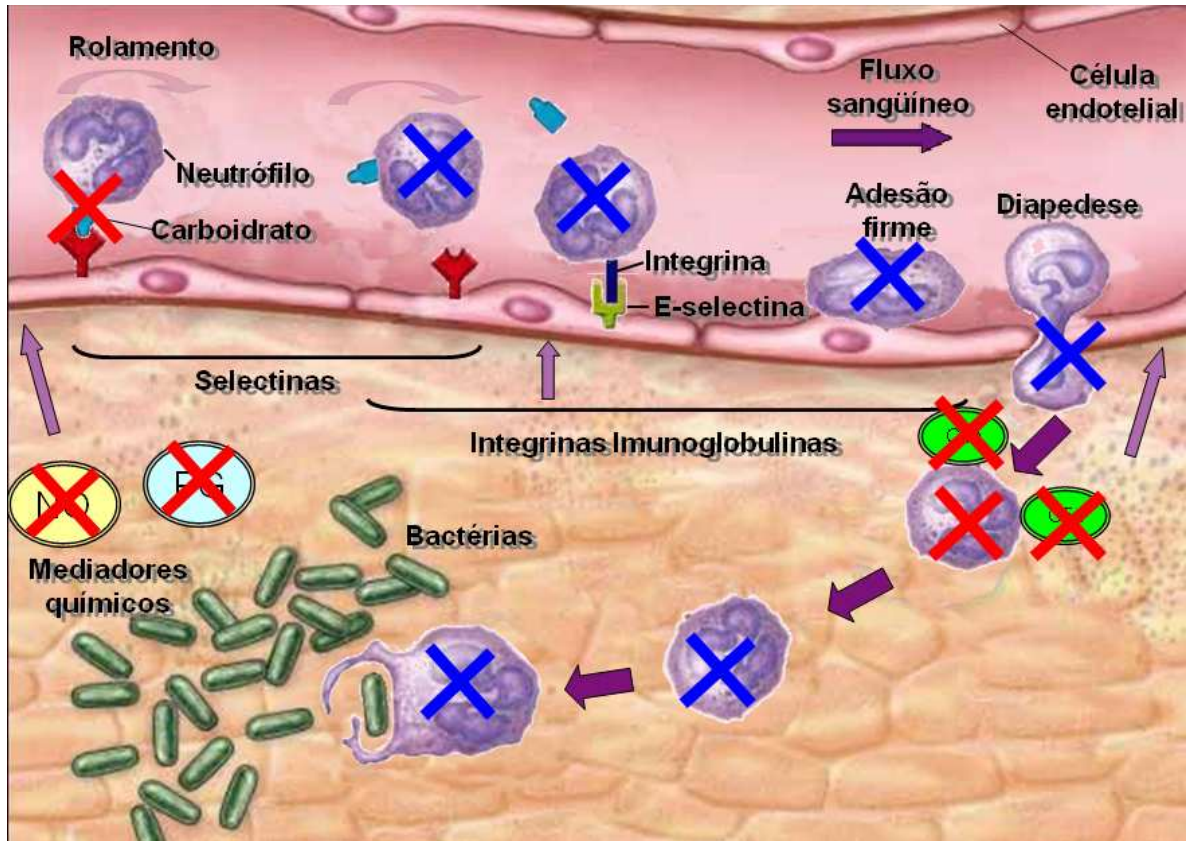


Figura 17 – MECANISMO DE AÇÃO DO PLS. Possível mecanismo de ação do polissacarídeo sulfadado da alga *lobophora variegata*, mostrando a inibição dos eventos vasculares (Oxído Nítrico-NO e Prostaglandinas-PG) e celulares (interação do neutrófilo aos carboidratos de membrana).

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÕES

- O polissacarídeo sulfatado da alga parda *Lobophora variegata* apresentou atividade anti-inflamatória sobre modelos de inflamação *in vivo* (modelo de edema de pata e peritonite).

- O PLS, injetado endovenosamente, inibiu os edemas de pata induzidos por dextrana, carragenina, zymosan, L-arginina e fosfolipase A₂.

- O efeito antiedematogênico do PLS parece ocorrer através da inibição das enzimas óxido nítrico sintase e ciclooxigenase.

- A ausência no efeito edematogênico do PLS foi correlacionada com sua baixa ação sobre o relaxamento encontrado em anéis de aorta endotelizados na contratilidade.

- O PLS agiu nos eventos vasculares e celulares do processo inflamatório agudo ao inibir o aumento da permeabilidade vascular e a migração de neutrófilos induzidas por zymosan.

- O PLS de *L. variegata* não apresentou toxicidade, não tendo provocado aglutinação de leucócitos, edema, alteração no número de células de defesa e da função renal ou hepática.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, I. R. L. **Purificação e caracterização parcial de uma fucana C de *Dictyota menstrualis* e estudo do seu efeito antiinflamatório e nociceptivo.** Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2005.

ALENCAR, D. B. **Extração, purificação e atividade anticoagulante de polissacarídeos sulfatados da alga marinha parda *Lobophora variegata*.** Monografia de Graduação - Universidade Federal do Ceará, 2007.

AL-SWAYEH, O. A.; CLIFFORD, R. H.; DEL SOLDATO, P.; MOORE, P. K. A. Comparison of the antiinflammatory and antinociceptive activity of nitroaspirin and aspirin. **Br J Pharmacol**, v. 129, p. 343-350, 2000.

ANDERSON, L. O.; BARROWCLIFFE, T. W.; HOLMER, E.; JOHNSON, E. A.; SIMS, G. F. C. Anticoagulant properties of heparin fractionated by affinity chromatography on matrix-bound antithrombin-3 and by gel-filtration. **Thromb Res**, v. 9, p. 575-580, 1976.

ANDREWS, T.; SULLIVAN, K. E. Infections in patients with inherited defects in phagocytic function. **Clin Microbiol Rev**, v.16, n. 4, p.597-621, 2003.

AQUINO, R. S.; LANDEIRA - FERNANDEZ, A. M.; VALENTE, A. P.; ANDRADES, L. R.; MOURÃO, P. A. S. Occurrence of sulfated galactans in marine angiosperms: evolutionary implications. **Glycobiology**, v. 15, n.1, p. 11-20, 2005.

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

ARUFFO, A.; KOLANUS, W.; WALZS, G.; FEDMAN, P.; SEED, B. CD26/P-selectin recognition of myeloid and tumor cell sulfatides. **Cell**, v. 67, p. 35-39, 1991.

ASSREUY, A.M.; ALENCAR, N.M.; CAVADA, B.S.; ROCHA-FILHO, D.R.; FEITOSA, R.F.; CUNHA, F.Q.; CALVETE, J.J.; RIBEIRO, R.A. Porcine spermadhesin PSP-I/PSP-II stimulates macrophages to release a neutrophil chemotactic substance: modulation by mast cells. **Biol Reprod**, v. 68, n. 5, p. 1836-41, 2003.

ASSREUY, A.M.S.; CALVETE, J.J.; ALENCAR, N.M.; CAVADA, B.S.; ROCHA-FILHO, D.R.; MELO, S.C.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A. Spermadhesin PSP-I/PSP-

II heterodimer and its isolated subunits induced neutrophil migration into the peritoneal cavity of rats. **Biol Reprod**, v. 67, n. 6, p. 1796-803, 2002.

ASSREUY, A. M. S.; GOMES, D. M.; SILVA, M. S. J. da; TORRES, V. M.; SIQUEIRA, R. C. L.; PIRES, A. de F.; CRIDDLE, D. N.; ALENCAR, N. M. N. de; CAVADA, B. S.; SAMPAIO, A. H.; FARIAS, W. R. L. Biological Effects of a Sulfated-Polysaccharide Isolated from the Marine Red Algae *Champia feldmannii*. **Biol Pharm Bull**, v. 31, n. 4, p. 691-695, 2008.

ASSREUY, A. M. S.; SHIBUYA, MD; MARTINS, GJ; SOUZA DE MLP; CAVADA, BS; MOREIRA, RA; OLIVEIRA, JA; RA, RIBEIRO; FLORES, CA. Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. *Mediators of Inflammation*, Inglaterra, v. 6, p. 201-210, 1997.

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

BERSTAD, J. Dextran-induced release of serotonin from isolated rat peritoneal mast cells. **Acta Pharmacol Toxicol.**, v. 47, n. 3, p. 213-6, 1980.

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

BEVILACQUA, M. P.; NELSON, R. M.; MANNORI, G. Endothelial-leukocyte adhesion molecules in human disease. **An Rev of Medicine**, v. 45, p. 361-378, 1994.

BILAN, M. I.; GRACHEV, A. A.; USTUZHANINA, N. E.; SHASHKOV, A. S.; NIFANTIEV, N. E.; USOV, A. I. A highly regular fraction of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus distichus* L. **Carbohydr Res**, v. 339, p. 511-517, 2004.

BLONDIN, C.; FISHER, E.; BOISSON-VIDAL, C.; KAZATCHKINE, M.; JOZEFONVICZ, J. Inhibition of complement activation by natural sulfated polysaccharides (fucans) from brown seaweed. **Mol Immunol**, v. 31, p. 247-253, 1994.

BOISSON-VIDAL, C.; HAROUN, F. ; ELLOUALI, M.; BLONDIN, C.; FISCHER, A. M.; AGOSTINI, A.; JOZEFONVICZ, J. Biological activities of polysaccharides from marine algae. **Drugs of the Future**, v. 20, n. 4, p. 1237-1249, 1995.

BOURGOUGNON, N.; LAHAYNE, M.; CHERMANN, J. C.; KORNPORST, J. M. Composition and antiviral activities of a sulfated polysaccharide from *Schizymeria dubyi* (rhodophyta, gigartinales). **Biorg Med Chem Letters**, v. 3, p. 1141-1146, 1993.

BROID, D. H. Inflammatory cells: Structure and Function. In: STITES, D. D.; TERR, A. I. (Eds.), **Basic and Clinical Immunology**, Appleton and Lange. London: Printice-Hall International Inc., 1991. p. 141-183.

CHAVET, P.; BIENVENU, J. G.; THEORET, J. F.; LATOUR, J. G.; MERHI, Y. Inhibition of platelet-neutrophil interactions by fucoidan reduces adhesion and vasoconstriction after acute arterial injury by angioplasty in pigs. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 34, p. 597-603, 1999.

CIRINO G., PEERS S.H., FLOWER R.J., BROWNING J.L., PEPINSKY R.B., Human recombinant lipocortin 1 has acute local anti-inflammatory properties in the rat paw edema test, **P. Natl. Acad. Sci.**, 86, 3428-3432 (1989).

COOMBE, R. D.; PARISH, C. R.; RAMSHAW, I. A.; SNOWEDN, J. M. Analysis of inhibition of tumor metastasis by sulfated polysaccharides. **Int J Cancer**, v. 39, p. 39-82, 1987.

CUMASHI, A.; USHAKOVA, N. A.; PREOBRAZHENSKAYA, M. E.; D'INCECCO, A.; PICCOLI, A.; TOTANI, L.; TINARI, N.; MOROZEVICH, G. E.; BERMAN, A. E.; BILAN, M. I. *et al.* Consorzio Interuniversitario Nazionale per la Bio-Oncologia, Italy. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. **Glycobiology**, v. 17, p. 541-552, 2007.

CUZZOCREA, S.; ZINGARELLI, B.; CALAPAI, G.; NAVA, F.; CAPUTI, A. Zymosan-activated plasma induces paw oedema by nitric oxide and prostaglandin production. **Life Sciences**, v. 60, n. 3, p. 215-220, 1996.

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

DAMONTE, E.; NEYTS, J.; PUJOL, C. A.; SNOECK, R.; ANDREI, G.; IKEDA, S.; WITVROUW, M.; REYMEN, D.; HAINES, H.; MATULEWICZ, M. C. *et al.* Antiviral activity of a sulfated polysaccharide from red seaweed *Nothogenia fastigata*. **Biochem Pharmacol**, v. 47, p. 2187-2192, 1994.

DAVIDSON, J. M. Wound repair. In.: GALLIN, J. I.; GOLDSTEIN, I. M.; SNYDERMAN, R. **Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates**. New York: Raven Press Ltd., 1992. p. 809-817.

DAY, J. G.; BENGSON, E. E.; FLECK, R. A. In vitro culture and conservation of microalga: applications for aquaculture, biotechnology and environmental research. **In Vitro Cell Dev Biol Plant**, v. 35, p. 127-136, 1999.

DEALEY, C. **Cuidando de feridas: um guia para as enfermeiras**. 2 ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2001.

DIETRICH, C. P.; PAIVA, J. F.; MORAES, C. T.; TAKAHASHI, H. K.; PORCINATTON, M. A.; NADER, H. B. Isolation and characterization of a heparin with high anticoagulant from *Anolmalocardia brasiliensis*. **Biochem Acta**, v. 843, p. 1-7, 1985.

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

DUARTE, M. E. R.; CARDOSO, M. A.; NOSEDA, M. D.; CERESO, A. S. Structural studies on fucoidans from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum*. **Carbohydr Res**, v. 333, p. 281-293, 2001.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal Chem**, v. 28, p. 350-356, 1956.

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

FARIAS, W. R. L.; NAZARETH, R. A.; MOURAO, P. A. S. Dual effects of sulfated D-galactans from the red algae *Botryocladia occidentalis* preventing thrombosis and inducing platelet aggregation. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 86, n. 6, p. 1540-1546, 2001.

FARIAS, W. R. L.; VALENTE, A. P.; PEREIRA, M. S.; MOURÃO, P. A. S. Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans. **J Biol Chem**, v. 275, n. 38, p. 29299-29307, 2000.

FÉLÉTOU, M.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. **Br J Pharmacol**, v. 93, n. 3, p. 515-524, 1988.

FERNANDEZ, H. H.; HENSON, P.; OTANI, A.; HUGLI, T. E. Chemotactic response to human C3a and C5a anaphylatoxins. I. Evaluation of C3a and C5a leukotaxis in vitro and under stimulated in vivo conditions. **J Immunol**, v. 120, n. 1, p. 109-115, 1978.

FERREIRA, L. G.; NOSEDA, M. D.; DUARTE, M. E. R. Sulfated Xyloglucuronofucans from *Pocockiella variegata*: Chemical Structure. In.: XXXV Reunião Anual da SBBQ, 2006, Águas de Lindóia. **XXXV Reunião Anual da SBBQ**, 2006.

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

FURCHGOTT, R. T.; ZAWADZKI, Z. V. The obligatory role of the endothelial cells in relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373-376, 1980.

GARCIA-LEME, J. & WILHELM, D.L. The effects of adrenalectomy and corticosterone on vascular permeability responses in the skin of the rat. **British Journal of Pathology**, v. 56, n. 5, p. 402-407, 1975.

GLYNN, L. E. Regeneration and repair. In.: VANE, J. R., FERREIRA, S. H. **Handbook of Experimental Pharmacology**. Springer-Verlag, 1978. p. 206-230.

GRAUFFEL, V.; KLOAREG, B.; MABEAU, S.; DURAND, P.; JOZEFONVICZ, J.. New natural polysaccharides with potent antithrombic activity: fucans from brown algae. **Biomaterials**, v. 10, p. 363-368, 1989.

GÜHRING, H.; TEGEDER, I.; LÖTSCH, J.; PAHL, A.; WERNER, U.; REEH, P. W.; REHSE, K; BRUNE, K.; GEISLINGER G. Role of nitric oxide in zymosan induced paw inflammation and thermal hyperalgesia. **Inflamm Res.**, v. 50, p. 83–88, 2001.

HAROUN-BOUHEDJA, F.; MOSTAFA, E.; SINQUIN, C.; BOISSON-VIDAL, C. Relation between sulfate groups and biological activities of fucans. **Thromb Res** v. 100, p. 453-459, 2000.

ISAAC, L.; ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PROBER, J. S. **Imunologia**. Imunologia celular & molecular, 3. ed, Rio de Janeiro : Revinter, 2000. 544p.

JOLY, A. B. **Flora marinha do litoral norte do estado de São Paulo e regiões circunvizinhas**. São Paulo. 1965. p. 406.

KATZ, L. B.; THEOBALD, H. M.; BOOKSTAFF, R. C.; PETERSON, R. E. Characterization of the enhanced paw edema response to carrageen and dextran in 2,3,7,9-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-treated rats. **Pharmacol and Exp Ther**, v. 230, p. 670-677, 1984.

KILLING, H. Zur biochemie der meersalgen. **S Physiol Chem**, v. 83, p. 171-187, 1913.

KINI, R. M.; EVANS, H. J. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A₂. **Toxicon**, Oxford, v. 27, n. 6, p. 613-35, 1989.

KLINTMAN D, SCHRAMM R, MENGER MD, THORLACIUS H. Leukocyte recruitment in hepatic injury: selectin-mediated leukocyte rolling is a prerequisite for CD18-dependent firm adhesion. **J. Hepatol**. 2002 Jan;36(1):53-9.

LANDUCCI, E. C. T.; ANTUNES, E.; DONATO, J. L.; FARO, R.; HYSLOP, S.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; CIRINO, G.; DE NUCCI, G. Inhibition of carrageenin - induced rat paw oedema by crotapotin, a polypeptide complexed with phospholipase A₂. **Br J Pharmacol**, v. 114, p. 578-583, 1995.

LANDUCCI, E. C. T.; TOYAMAB, M.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; CIRINO, G.; ANTUNES, E.; NUCCI, G. E. Effect of crotapotin and heparin on the rat paw edema induced by different secretory phospholipases A₂. **Toxicon**, v. 38, p.199-208, 2000.

LEHNINGER, A.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Carboidratos. In: **Princípios de Bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Savier, 2002. p. 225-250.

LEITE, L. Structure of a new fucanas from the algae *Spatoglossum Schoederi*. **Plant Sci**, v. 132, p. 215-228, 1998.

LIMA, K. V. B. **Estudo da atividade antiinflamatória do extrato hidroalcoólico de *Cissampelos sympodialis* Eich (Menispermaceae) em diferentes modelos experimentais**. Dissertação de Mestrado – Faculdade da Paraíba, 1999.

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

LINDEMANN, G.; REINHART, K.; PARADE, W.; PHILIPP, A.; PFISER, W.; STRAUBE, E.; KARSAI, W. The effects inhibiting leucocyte migration with fucoidin in rat peritonitis model. **Intensive Care Med**. v. 26, p. 1540-1546, 2000.

LINS, K. O.; BEZERRA, D. P.; ALVES, A. P.; ALENCAR, N. M.; LIMA, M. W.; TORRES, V. M.; FARIAS, W. R.; PESSOA, C. M. M. O.; COSTA-LOTUFO, L.V. Antitumor properties of a sulfated polysaccharide from the red seaweed *Champia feldmannii* (Diaz-Pifferer). **J Appl Toxicol**, v. 29, n. 1, p. 20-26, 2009.

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

LUNDBERG, C.; ARFORS, K. E. Polymorphonuclear leukocyte accumulation in inflammatory dermal sites as measured by ⁵¹Cr-labeled cells and myeloperoxidase. **Inflammation**, v. 2, p. 247-255, 1983.

MATEO, A. O.; ARTIÑANO, M. A. A. Effect of high extracellular Ca²⁺ levels in spontaneously hypertensive rat aorta. **Eur J Pharmacol**, v. 432, p. 177-185, 2001.

MATSUI, M. S.; MUIZUDDIN N.; ARAD, S.; MARENUS K. Sulfated polysaccharides from red microalgae have antiinflammatory properties in vitro and in vivo. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 104, n. 1, p. 13-22, 2003.

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

McCAFREY, T. A.; FALCONE, D. J.; BORTH, W.; BRAYTON, C. F.; WEKSLER, B. B. Fucoidan is a non-anticoagulant inhibitor of intimal hyperplasia. **Biochem and Biophysical Res Communications**, v.184, p. 773-781, 1992.

McEVER, R. P. Leukocyte interactions mediated by selectins. **Thromb Haemost**, v. 66, p. 80-87, 1991.

MOLLACE V, MUSCOLI C, MASINI E, CUZZOCREA S, SALVEMINI D. Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors. **Pharmacol Rev.** Jun;57(2):217-52, 2005.

MOMBOULI, J. V.; VANHOUTTE, P. M. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. **J Mol Cell Cardiol**, v. 31, n. 1, p. 61-74, 1999.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev**, v. 43, p. 109-142, 1991.

MOODLEY, I.; MONGAN, J. L.; FOREMAN, J. C. Histamine release induced by dextran: the nature of the dextran receptor. **Eur J Pharmacol**, v. 10, n. 83, p. 69-81, 1982.

MOURÃO P. A. S.; ASSREUY A. M. S.. Trehalose as a Possible Precursor of the Sulfated L-Galactan in the Ascidian Tunic. **The journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 7, p. 3132-3140, 1995.

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

MOURÃO, P. A. S. Estrutura versus atividade biológica de polissacarídeos sulfatados. In.: XXVI Reunião Anual sobre Evolução, Sistemática e Ecologia Micromolecular, 2004, Niterói. **XXVI Reunião Anual sobre Evolução, Sistemática e Ecologia Micromolecular**, 2004.

MULLOY, B.; MOURÃO, P. A. S.; GRAY, E. Structure/function studies of anticoagulant sulphated polysaccharides using NMR. **J Biotechnol**, v. 77, p. 123-135, 2000.

MULLOY, B.; RIBEIRO, A. C.; ALVES, A. P.; VIEIRA, R. P.; MOURÃO, P. A. S. Sulfated fucans from echinoderms have a regular tetrasaccharides repeating unit defined by a specific patterns of sulfation at the O-2 and O-4 positions. **J Biol Chem**, v. 269, p. 22113-22123, 1994.

NADER, H. B.; PINHAL, M. A. S.; BAÚ, E. C.; CASTRO, R. A. B.; MEDEIROS, G. F.; CHAVANTE, S. F.; LEITE, E. L; TRINDADE, E. S.; SHINJO, S. K.; ROCHA, H. A. O.; TERSARIOL, I. L. S.; MENDES, A.; DIETRICH, C. P. Development of new heparin-like compounds and other antithrombotic drugs and their interaction with vascular endothelial cells. **Braz J Med Biol Res**, v. 34, p. 699-709, 2001.

NAKAMURA, T.; SUZUKI, H.; WADA, Y.; KODAMA, T.; DOI T.; Fucoisan induces nitric-oxide production via p38 mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB-dependent signaling pathways through macrophage scavenger receptors. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 343, p.286-294, 2006.

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

NEEDHAM, L; HELLEWELL, P. G; WILLIAMS, T. J; GORDON, J. L. Endothelial functional responses and increased vascular permeability induced by polycations. **Lab Invest**, v. 58, p. 538-548, 1988.

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

OLIVEIRA, E. C. Macroalgas marinhas da costa brasileira – estado do conhecimento, usos e conservação. In.: ARAÚJO *et al.* **Biodiversidade, Conservação e Uso Sustentável da Flora Brasileira**. Pernambuco: UFRPE, Brasil/Imprensa Universitária, 2002. p. 122-126.

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

PALMER, R. M. J.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v. 327, p. 524-526, 1987.

PATANKAR, M. S.; OEHNINGER, S.; BARNETT, T. WILLIAMS, R. L.; CLARK, G. F. A revised structure for fucoidan may explain some of its biological activities. **J Biol Chem**, v. 268, p. 21770-21770, 1993.

PERCIVAL, E. G. V.; MCDOWELL, R. H. **Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides**. London: Academic Press, 1967. p. 219.

PEREIRA, F. E. L.; BOGLIOLO, L. Inflamações In: _____. **Patologia**. 2. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p. 112-148.

PEREIRA, M. G.; BENEVIDES N. M; MELO, M. R.; VALENTE, A. P.; MELO, F. R; MOURÃO, P. A. Structure and anticoagulant activity of a sulfated galactan from the red alga, *Gelidium crinale*. Is there a specific structural requirement for the anticoagulant action? **Carbohydr Res**, v. 340, p. 2015–2023, 2005.

PEREIRA, M.S.; MELO F.R., MOURÃO P.A. Is there a correlation between structure and anticoagulant action of sulfated galactans and sulfated fucans? *Glycobiology*, v. 12 p. 573–580, 2002

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

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

POMIN, V. H.; MOURÃO, P. A. S. Structure, biology, evolution, and medical importance of sulfated fucans and galactans. **Glycobiology**, v. 18, n. 12, p. 1016–1027, 2008.

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

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

RIBEIRO, R. A.; FLORES, C. A.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. IL-8 cause *in vivo* neutrophil migration by a cell dependent mechanism. **Immunol**, v. 73, p. 472-477, 1991.

RIBEIRO, R. A.; SOUZA-FILHO, M. V. P.; SOUZA, M. H. L. P.; OLIVEIRA, S. H. P.; COSTA, C. H. S.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. P. Role of resident mast cells and macrophages in the neutrophil migration induced by LTB₄, fMLP and C5a. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 112, p. 27-35, 1996.

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

ROCHA, H. A. O.; FARIAS, E. H. C.; BEZERRA, L. C. L. M.; ALBUQUERQUE, I. R. L.; MEDEIROS, V. P.; QUEIROZ, K. C. S.; LEITE, E. L. Polissacarídeos sulfatados de algas marinhas com atividade anticoagulante. **Infarma**, v. 16, p. 1-2, 2004.

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

SALVEMINI D, WANG ZQ, WYATT PS, BOURDON DM, MARINO MH, MANNING PT, CURRIE MG. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. **Br J Pharmacol**. Jun;118(4):829-38, 1996.

SATO, T.; YAKAMOTO, C.; FUJIWARA, Y.; KAJI, T. Biological activities of exogenous polysaccharides via controlling endogenous proteoglycan metabolism in vascular endothelial cells. **Journal of the pharmaceutical society of japan**, v. 128, n. 5, p. 717-723, 2008.

SEDGWICK, D.; WILLOUGHBY, D. A. Initiation of inflammatory response and its prevention. In.: BONTA, I. L., BRAY, M. A.; PARNHAM, M. J. **Handbook of Inflammation Elsevier**, v. 5, p. 25-47, 1985.

SHIMOKAWA, H. Primary endothelial dysfunction: Atherosclerosis. **J Mol Cell Cardiol**, v. 31, n. 1, p. 23-37, 1999.

SNYDERMAN, R.; PHILLIPS, J.; MERGENHAGEN, S. E. Polymorphonuclear Leukocyte Chemotactic Activity in Rabbit Serum and Guinea Pig Serum Treated with Immune Complexes: Evidence for C5a as the Major Chemotactic Factor. **Infect Immun**, v. 1, n. 6, p. 521-525, 1970.

SOEDA, S.; ISHIDA, S.; HONDA, O.; SHIMENO, H.; NAGAMATSU, A. Aminated fucoidan promotes the invasion of 3 LL cells through reconstituted basement membrane: Its possible mechanism of action. **Cancer Lett**, v. 85, p. 133-138, 1994.

SOUZA, G. E. P.; FERREIRA, S. H. Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. **Agents Actions**, v. 17, p. 1-5, 1985.

SUGAWARA, I.; ITOH, W.; KIMURA, S.; MORI, S.; SHIMADA, K.; Further characterization of sulfated homopolysaccharide as anti-HIV agents. **Experientia**, v. 45, p. 996-998, 1989.

SZNALDMAN, M. Bioorganic Chemistry Carbohydrates. In: HECHT, S. M. **Bioorganic Chemistry**. Oxford: Oxford University Press, 1999. p. 1-56.

TEIXEIRA, M. M.; WILLIAMS, J.;HELLEWELL, P. G. E-type prostaglandins enhance local oedema formation and neutrophil accumulation but suppress eosinophil accumulation in guinea-pig skin. **Br J Pharmacol**, v. 110, p. 416-422, 1993.

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

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

TORTORA, G. F.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. p. 827.

TRENTO, F.; CATTANEO, F.; PESCADOR, R.; PORTA, R.; FERRO, L. Antithrombin Activity of an Algal Polysaccharide. **Trombosis Research**, v. 102, p. 457-456, 2001.

VAN DEN HOEK, C.; MANN, D. G.; JANHS, H. M. **Algae, an introductions to phycology**. Cambridge: University Press, 1989, p. 627.

VANE, J. R. The endothelium: maestro of the blood circulation. In: Croonian Lecture. **Phil Trans. R. Soc. Lon. B**, v. 348, p. 225-246, 1994.

VECCHIARELLI, A.; MONARI, C.; PALAZZETTI, B.; BISTONI, F.; CASADEVALL, A. Dysregulation in IL-12 secretion by neutrophils from HIV-infected patients. **Clin Exp Immunol**, v. 121, n. 2, p.311-319, 2000.

VIEIRA, L. A. P., FREITAS, A. L. P., FEITOSA, J. P. A.; SILVA, D. C.; VIANA, G. S. B. The alga *Bryothamnion seaforthii* contains carbohydrates with antinociceptive activity. **Braz J Med Biol Res**, v. 37, n. 7, p. 1071-1079, 2004.

VIEIRA, R. P.; MULLOY, B.; MOURÃO P. A. S. Structure of a fucose-branched chondroitin sulfate from sea cucumber. Evidence for the presence of 3-O-sulfo-b-D-glucuronil residues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 13530-13536, 1991.

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

WEITZ, J. New anticoagulant strategies. Current status and future potential. **Drugs**, v. 48, n. 4, p. 485-497, 1994.

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

WILLIAMS, S. J.; DAVIES, G. J. Protein-carbohydrate interactions: learning lessons from nature. **Trends in Biotechnology**, v. 19, n. 9, p. 356-362, 2001.

WILLIAMS, T. J.; PECK, M. J. Role of prostaglandin-mediated vasodilatation in inflammation. **Nature**, v. 270, p. 530-532, 1977.

WITVROUW, M.; ESTE, J. A.; MATEU, M. Q.; REYMEN, D.; ANDREI, G.; SNOECK, R.; IKEDA, S.; PAUWELS, R.; BIANCHINI, N. V.; DESMYTER, J.; CLEREHUGH, E. Activity of sulphated polysaccharide extracted from the red seaweed *Agardhiella tenera* against human immunodeficiency virus and other enveloped viruses. **Antiviral Chem Chemother**, v. 5, p. 297-303, 1994.

YANG, J. W.; YOON, S. Y.; OH, S. Y.; KIM, S. K.; KANG, K. W. Bifunctional effects of fucoidan on the expression of inducible nitric oxide synthase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 346, p. 345-350, 2006.

YOON, S.; PEREIRA, M. S.; PAVÃO, M. S. G.; HWANG, J.; PYUNG, Y.; MOURÃO, P. A. S. The medicinal plant *Porana Volubilis* contains polysaccharides with anticoagulant activity mediated by heparin cofactor II. **Thromb Res**, v. 106, p. 51-58, 2002.

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

ZHANG, Q.; LI, N.; ZHOU, G.; LU, X.; XU, Z.; LI, Z. In vivo antioxidant activity of polysaccharide fraction from *Porphyra haitanensis* (Rhodophyta) in aging mice. **Pharmacol Res**, v. 48, n. 2, p. 151-155, 2003.

ZHENG, X. F.; KWAN, C. Y.; DANIEL, E. E. Role of intracellular Ca^{2+} in EDRF release in rat aorta. **J Vasc Res**, v. 31, n. 1, p. 18-24, 1994.

Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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