



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

ALMINO AFONSO DE OLIVEIRA PAIVA

**AVALIAÇÃO DE UMA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA DA ALGA
Lobophora variegata (Lamouroux) EM MODELO DE ARTRITE
INDUZIDA EM RATOS POR ZYMOSAN**

**NATAL
2010**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

ALMINO AFONSO DE OLIVEIRA PAIVA

**AVALIAÇÃO DE UMA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA DA ALGA
Lobophora variegata (Lamouroux) EM MODELO DE ARTRITE
INDUZIDA EM RATOS POR ZYMOSAN**

Dissertação apresentada ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientador (a): Prof. Dr. Edda Lisboa Leite

**NATAL
2010**

Divisão de Serviços Técnicos

Catálogo da Publicação na Fonte. UFRN / Biblioteca
Central Zila Mamede

Paiva, Almino Afonso de Oliveira.

Avaliação de uma fração polissacarídica da Alga *Lobophora variegata (Lamouroux)* em modelo de artrite induzida em ratos por Zymosan / Almino Afonso de Oliveira Paiva. – Natal, RN, 2010.

100 f. il.

Orientador: Edda Lisboa Leite.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

1. Inflamação das articulações – Dissertação. 2. Heterofucanas - Dissertação. 3. Influxo celular - Dissertação. 4. Fator de necrose tumoral alfa - Dissertação. I. Leite, Edda Lisboa II. Título.

RN/UF/BCZM

CDU 616.72-002(043.3)

ALMINO AFONSO DE OLIVEIRA PAIVA

**AVALIAÇÃO DE UMA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA DA ALGA
Lobophora variegata (Lamouroux) EM MODELO DE ARTRITE
INDUZIDA EM RATOS POR ZYMOBAN**

Dissertação apresentada ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientador (a): Prof. Dr. Edda Lisboa Leite

Aprovado em: 13/09/2010

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Edda Lisboa Leite
Departamento de Bioquímica - UFRN
Orientadora

Prof^a Dr^a Maria Goretti Freire de Carvalho
Departamento de Patologia e Histologia -- UNP
1º Examinador

Prof^a Dr^a Selma Maria Bezerra Jerônimo
Departamento de Bioquímica – UFRN
2º Examinador

À Prof.^a Dr.^a Edda Lisboa Leite,
por provocar o surgimento de
novos conhecimentos, minha
gradidão.

Dedico este trabalho aos meus pais (Carlos Magno e Jeiza Dias) e irmãos (Magno e Juliana), à Maria Clara (minha filha) e à minha esposa Roberta. Vocês são razão em minhas metas.

Aos meus avós;

Maternos: **José Michico**, homen de fibra e sabiedade.

Eloísa (*in memoriam*), mãe e avó de amor e carinho incomparáveis.

Paternos: **Francisco Nascimento** (*in memoriam*), homem sábio e preciso e, em especial, a

Francisca das Chagas (*in memoriam*), mãe e avó de afeto e consciência apreciáveis.

À **Iaponira Leite Dantas** (*in memoriam*), tia-avó de ensinamentos únicos.

“Quanto ao caminho certo, o correto, o
único caminho, não existe.”

Friedrich Wilhelm Nietzsche

Agradecimentos

À Deus, pela oportunidade da vida e das realizações.

À Prof^a. Edda, pela oportunidade de fazer parte de sua equipe.

Às pessoas sem as quais não seria possível o início e/ou término da trajetória como mestrando do Departamento de Bioquímica: meus pais, Carlos Magno de Souza Paiva e Jeiza Dias de Oliveira Paiva; aos meus irmãos, Carlos Magno de S. P. Filho e Juliana Cardinalle de O. Paiva.

Aos amigos formados no decorrer desse tempo: Allisson, Marília, Celina, Joedyson, Thuane, Monique, Adriane, Leonardo, Luiza, Juliana, Kahena, Thiago e Hugo e aos amigos de outros laboratórios: Cleisivan, Carol, Norberto, Leonardo, João, Cris, Raniere e muitos outros. Obrigado pelo incentivo. À Maria Emilia e à Magno Veras pela solicitude. Obrigado!

Aos Professores (as): Selma Jerônimo, Sueli Ferreira, João Felipe, João Paulo, Luciana Guimarães, Hugo Rocha, Maurício Sales (*in memoriam*), Renata Mendonça e Elaine Gavioli, pelas colaborações teóricas e materias.

Aos funcionários do Departamento: Creusa, Jonas, Ângela, Ana Katarina, Eliene, Marcos, Rogério, Sr. Itamar e Margarita, pela realização de detalhes imprescindíveis.

A todos que direta ou indiretamente, consciente ou inconscientemente colaboraram para a realização deste trabalho, meu muito obrigado!

RESUMO

Fucanas da alga *Lobophora variegata* são conhecidas por suas estruturas químicas e propriedades biológicas. Nesse estudo, analisou-se a ação de fucanas de *L. variegata* e suas frações purificadas com acetona na artrite induzida por Zymosan. Após fracionamento diferencial com acetona, 6 frações foram obtidas e nomeadas F0.3, F0.5, F0.8, F1, F1.5 e F2. Os resultados mostraram que a fração F1 apresentou alto rendimento (51,9%) e foi escolhida para estudos da atividade antioxidante e artrite induzida. A ressonância magnética nuclear (RMN) de ^{13}C mostrou sinais a 103,3 e 15,78 ppm que são atribuídos às ligações $\beta 1 \rightarrow 3$ da galactose e metil do C6 da fucose, respectivamente. O infravermelho (IV) mostrou absorbância a 1238 e 850 cm^{-1} que são atribuídas ao sulfato. A fração F1 apresentou atividades antioxidantes *in vitro*. Para análise de parâmetros inflamatórios a fração polissacarídica escolhida foi administrada em diferentes doses (25, 50 e 75 mg/kg i.p., por peso corporal), assim como diclofenaco de sódio (5 mg/kg i.p.) e L-NAME (25 mg/kg i.p.) em grupos de animais (n=6). Depois de 6 h, foram realizadas análises de influxo celular e níveis de nitrito. Em experimento de cinco dias, foram efetuadas análises de edema e TNF- α sérico. Análises histopatológicas foram realizadas para confirmação de resultados. A fração F1 (25, 50 e 75 mg/kg i.p.) reduziu o influxo celular (52,1 – 96,7%) e os níveis óxido nítrico (27,2 – 39%) em relação ao grupo controle. A redução do edema (63,4 - 100%) e TNF- α sérico ($p < 0,001$) foram observadas quando administrado o polissacarídeo F1 na dosagem (50 mg/kg) Esses resultados sugerem que essas heterofucanas de *Lobophora variegata* possuem além da atividade antioxidante, potencial atividade anti-inflamatória na artrite induzida por zymosan.

Palavras – chave: Inflamação Articular; Heterofucanas; influxo celular; TNF- α .

ABSTRACT

Fucans seaweed *Lobophora variegata* structures are known for their chemical and biological properties. In this study, we analyzed, the action of fucans *L. variegata* and the fractions purified with acetone in Zymosan-induced arthritis. After differential fractionation with acetone, six fractions were obtained and named F0.3, F0.5, F0.8, F1, F1.5 and F2. The results showed that the fraction F1 showed high yield (51.9%) and was chosen for studies of antioxidant activity and induced arthritis. Nuclear magnetic resonance (NMR) of ^{13}C showed signals at 103.3 and 15.78 ppm that are assigned to links $\beta 1 \rightarrow 3$ galactose and of the C6 methyl fucose, respectively. The infrared (IR) showed absorbance at 1238 and 850 cm^{-1} which are attributed to sulfate. The fraction F1 showed antioxidant activities in vitro. For analysis of inflammatory parameters chosen the polysaccharide was administered in different doses (25, 50 and 75 mg / kg ip, per body weight) and diclofenac sodium (5 mg / kg ip) and L-NAME (25 mg / kg ip) in groups of animals (n = 6). After 6 h, were analyzed for cellular influx and levels of nitrite. In experiment five days, were made analysis of swelling and serum TNF- α . Histopathological analysis were performed for confirmation of results. The fraction F1 (25, 50 and 75 mg / kg ip) reduced the cellular influx (52.1 to 96.7%) and nitric oxide levels (27.2 - 39%) compared to control group. The reduction of edema (63.4 - 100%) and serum TNF- α (p <0.001) were observed when the polysaccharide F1 administered at a dose (50 mg / kg) These results suggest that these heterofucanas of *Lobophora variegata* have besides the activity antioxidant and potential anti-inflammatory activity in arthritis induced by zymosan.

Keywords: Articular Inflammation; Heterofucanas; cellular influx, TNF- α .

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (superior central), alvos dessas espécies reativas (superior à direita), relação das ROS com a ativação do NF- κ B e transcrição de citocinas pró-inflamatórias (inferior à direita) em processo inflamatório artrítico.....	30
FIGURA 2 -	Representação do Zymosan	32
FIGURA 3 -	Ilustrações de articulação normal (A) e inflamada (B). Modificada de www.ufrgs.br/ligadereumatologia	33
FIGURA 4 -	Representação do açúcar α -L-fucose.....	36
FIGURA 5 -	Estruturas propostas para fucoidans de <i>Fucus vesiculosus</i> , (A) Modelo de CONHIE; PERCIVAL, 1950. (B) Modelo proposto por PATANKAR <i>et al.</i> , 1993.....	38
FIGURA 6 -	Estrutura de heterofucana obtida da alga marrom <i>Spatoglossum schröderi</i> (Adaptado de Leite <i>et al.</i> , 1998).....	39
FIGURA 7 -	Alga marinha <i>Lobophora variegata</i>	43
FIGURA 8 -	Esquema de extração e fracionamento de polissacarídeos sulfatados da alga <i>Lobophora variegata</i> .	46
FIGURA 9 -	Rendimento das frações polissacarídicas de <i>L. variegata</i> após precipitação em diferentes volumes de acetona.....	58
FIGURA 10 -	Eletroforese em tampão diaminepropano acetato de frações polissacarídicas obtidas por precipitação com acetona.....	60
FIGURA 11 -	Espectro de Infravermelho de componentes da fração 1 de <i>L. variegata</i>	61
FIGURA 12 -	Espectro de H^1 da RMN de Fração 1 de <i>L. variegata</i>	62
FIGURA 13 -	Espectro de C^{13} da RMN de Fração 1 de <i>L. variegata</i>	63
FIGURA 14 -	Espectro bidimensional de H^1 -- C^{13} da Fração 1 de <i>L. variegata</i>	64
FIGURA 15 -	Atividade Antioxidante Total.....	65
FIGURA 16 -	Ensaio do Poder redutor.....	66

FIGURA 17 -	Curva de atividade antioxidante de <i>L. variegata</i> em sistema gerador de radicais superóxido com diferentes concentrações da Fração 1 polissacarídica	67
FIGURA 18 -	Atividade inibitória da formação de radicais hidroxil com emprego de F1 em diferentes concentrações.....	68
FIGURA 19 -	Ensaio de avaliação de atividade citotóxica da Fração 1 (0,5 e 1 mg/mL) de <i>Lobophora variegata</i>	68
FIGURA 20 -	Infiltrado celular presente no lavado articular de ratos após a indução da artrite por zymosan.....	70
FIGURA 21 -	Níveis de nitrito presente no lavado articular de ratos após a indução da artrite por zymosan.....	71
FIGURA 22 -	Avaliação de edema de joelho de ratos Wistar.....	73
FIGURA 23 -	TNF- α sérico expresso em unidades de absorbância vs dias de tratamento.....	75
FIGURA 24 -	Análises histopatológicas de membranas sinoviais de grupos experimentais. (H&E. Aumento de x 400).....	77
FIGURA 25 -	Análises histopatológicas de membranas sinoviais de grupos experimentais.. (Imunohistoquímica: detecção de TNF- α . Aumento de x 400).....	79

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 -	Mediadores de processos inflamatórios e seus efeitos no organismo.....	24
QUADRO 2 -	Lista das vias de transdução de sinais redox-sensíveis...	29
QUADRO 3 -	Valores de escores para cada parâmetro utilizado na análise histopatológica das sinóvias.....	56

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Rendimento e percentuais de proteínas, açúcares e sulfato nas frações obtidas de <i>L. variegata</i> por meio de precipitação diferencial com acetona.....	59
TABELA 2 -	Relação molar de açúcares encontrados na fração F1.	61
TABELA 3 -	Número de escores para parâmetros inflamatórios	78
TABELA 4 -	Número de escores imunohistoquímico para detecção de TNF- α	80

LISTA DE ABREVIATURAS / SIGLAS

AINE	Antiinflamatório não esteróide;
AP 1	Proteína Ativadora 1
AR	Artrite Reumatóide;
AZy	Artrite induzida por zymosan;
BSA	Albumina sérica bovina
CAMs	Moléculas de adesão celular;
COX 1 e 2	Ciclooxigenase 1 e 2;
CS	Condroitim sulfato;
DAB	Diaminobenzidina
DS	Dermatam sulfato;
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio;
EROs	Espécies reativas de oxigênio;
ERNs	Espécies reativas do nitrogênio
GPx	Glutaciona peroxidase;
Grd	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona reduzida;
GSSG	Glutaciona oxidada;
H&E	Hematoxilina e eosina;
HLA-DR4	Antígeno leucocitário humano DR4;
HS	Heparan sulfato;
I κ B	Inibidor Kappa B
i.a.	intraarticular
i.p.	intraperitoneal
ICAM 1	Molécula de adesão intercelular;

IFN- γ	Interferon Gama;
IL	Interleucina;
IL-1	Interleucina 1;
IL-2	Interleucina-2;
IL-6	Interleucina 6;
IL-8	Interleucina 8;
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida;
Kg	quilograma;
LPS	Lipopolissacarídeos
mg	miligrama
MHC	complexo de histocompatibilidade principal
mL	mililitro;
mM	milimolar;
Mo	Molibdênio;
MTT	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bomide)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma reduzida;
NF κ B	Fator transcricional Kappa B;
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO ·	Radical óxido nítrico;
NO ₂	Nitrito;
NO ₃	Nitrato;
NOS	Óxido nítrico sintase;
O ²⁻	Radical ânion superóxido
ONOO-	Ânion peroxinitrito;
PBS	tampão fosfato de sódio
PDA	1,3 diaminopropano acetato;

PGE 2	Prostaglandinas E 2;
PMNs	Polimorfonucleares;
ppm	Partes por milhão
RNM	Ressonância Nuclear Magnética
rpm	rotações por minuto
Sle ^x	Sialil Lewis x;
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico;
TCA	Ácido tricloroacético
TLR2	Receptor toll-like 2
TMB	Tetrametolbenzidina
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa;
VCAM	Molécula de adesão celular e vascular;
Zy	Zymosan;
δ	Deslocamento químico
μ L	microlitro;
•OH	Radical hidroxil;

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
1.1.	Inflamação.....	22
1.1.1.	Células na Inflamação.....	23
1.1.2.	Mediadores Químicos do Processo Inflamatório.....	23
1.1.2.1.	Citocinas.....	24
1.1.2.2.	Moléculas de Adesão.....	25
1.1.2.3.	Espécies reativas do Oxigênio (ROS).....	26
1.2.	Radicais livres e estresse oxidativo no processo inflamatório: A sinalização redox na resposta inflamatória da Artrite.....	27
1.3.	Modelo artrítico de inflamação experimental: Indução por Zymosan.....	31
1.4.	Compostos que interferem no processo inflamatório.....	35
1.5.	Compostos naturais extraídos de algas marinhas.....	36
1.5.1.	Estrutura de Fucanas de algas.....	37
1.5.2.	Atividade de compostos fucosilados.....	40
2	OBJETIVOS	42
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1.	Alga Marinha <i>Lobophora variegata</i>	43
3.2.	Outros Materiais.....	43
3.2.1.	Aparelhos.....	44
3.3.	Obtenção de Polissacarídeos Sulfatados da Alga Parda <i>L. variegata</i>	45
3.4.	Identificação, quantificação e caracterização de Componentes Moleculares.....	47
3.4.1.	Açúcares totais.....	47
3.4.2.	Proteínas.....	47

3.4.3.	Sulfato.....	47
3.4.4.	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	47
3.4.5	Eletroforese em gel de agarose.....	48
3.4.6.	Espectroscopia de Infravermelho.....	48
3.4.7.	Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	48
3.4.7.1.	Técnica de RMN Monodimensional: RMN de ¹³ C.....	48
3.4.7.2.	Técnica de RMN Bidimensional: HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence).....	49
3.5.	Atividades Antioxidantes.....	49
3.5.1.	Ensaio da Atividade Antioxidante Total.....	49
3.5.2.	Ensaio de Poder Redutor.....	49
3.5.3.	Ensaio de Remoção do Radical Superóxido.....	50
3.5.4.	Ensaio de Remoção do Radical Hidroxil.....	50
3.6.	Avaliação Citotóxica da Fração F1.....	51
3.6.1	Isolamento das células mononucleares do sangue periférico.....	51
3.6.2.	Tratamento das células com a fração F1.....	52
3.7	Análise dos parâmetros inflamatórios no modelo de artrite induzida por zymosan.....	52
3.7.1.	Animais.....	52
3.7.2.	Indução da Artrite por Zymosan.....	53
3.7.3.	Coleta do Exudato e Membrana Sinoviais.....	53
3.7.4.	Análise do Influxo Celular.....	54
3.7.5.	Avaliação dos Teores de Nitrito do Lavado Articular.....	54
3.7.6.	Análise de Edema.....	54
3.7.7.	Determinação de TNF α sérico.....	55
3.7.8.	Análise Histopatológica das Sinóvias.....	55
3.7.9.	Imunohistoquímica para detecção de TNF- α	56
3.7.10.	Análises Estatísticas.....	57
4	RESULTADOS	58

4.1.	Rendimento e Análises Químicas	58
4.2.	Identificação dos componentes moleculares da fração F1.....	60
4.3.	Espectroscopia de Infravermelho da fração F1	61
4.4.	Ressonância Magnética Nuclear da fração F1	62
4.4.1.	Espectro de RNM de H ¹	62
4.4.2.	Espectro de RNM de C ¹³	63
4.4.3.	Espectro bidimensional de RNM de H ¹ -- C ¹³	64
4.5.	Atividades Antioxidantes.....	64
4.5.1.	Atividade Antioxidante Total.....	65
4.5.2.	Poder Redutor.....	65
4.5.3.	Remoção do Radical Superóxido.....	67
4.5.4.	Remoção do Radical Hidroxil.....	67
4.6.	Avaliação da atividade citotóxica da Fração F1.....	68
4.7.	Ensaio com Animais.....	69
4.7.1	Análise do influxo leucocitário no lavado articular de ratos 6 h após injeção intrarticular de zymosan (Zy).....	69
4.7.2.	Efeito de F1, Diclofenaco de sódio e L-NAME sobre o influxo de leucócitos no lavado articular de ratos submetidos à indução da artrite por Zy.....	69
4.7.3.	Efeito do zymosan na formação de nitrito/nitrato no lavado articular de ratos submetidos à indução da artrite por Zy.....	71
4.7.4.	Efeito do pós-tratamento com F1, Diclofenaco de sódio e L-NAME sobre a produção de nitrito/nitrato no lavado articular de ratos submetidos a indução da artrite por Zy.....	71
4.7.5.	Análise do edema articular.....	72
4.7.6.	Avaliação de TNF- α sérico por método de ELISA.....	74
4.7.7.	Histopatologia das sinóvias.....	76
4.7.8.	Coloração por Hematoxilina e Eosina (H&E).....	76
4.7.9.	Imunohistoquímica para TNF- α	78
5	DISCUSSÃO	81

6	CONCLUSÕES.....	85
	REFERÊNCIAS.....	86
	ANEXOS.....	99

1. INTRODUÇÃO

1.1. Inflamação

A inflamação é considerada uma reação de defesa do organismo, um mecanismo de defesa natural, uma vez que este processo serve para destruir o agente causador da injúria (MAJNO, 1961a). Quando agredido, o organismo lança mão de complexas reações denominadas conjuntamente de inflamação. Essas reações foram mantidas durante o processo evolutivo e, em organismos superiores, apresenta características fundamentais, levando ao acúmulo de fluidos e células no tecido conjuntivo, ou interstício. É classificada em duas formas: aguda e crônica. A forma aguda é de curta duração (minutos, horas ou poucos dias) e sua principal característica é a exudação do fluido ou proteínas do plasma para o interstício, o que provoca edema e migração leucocitária (MAJNO, 1961b; JAMES *et al*, 2007). A forma crônica é de longa duração e pode ser precedida pela forma aguda, estando associada à presença de linfócitos, macrófagos, proliferação de vasos sanguíneos, fibrose e necrose tecidual (DRAY, 1995). São muitas as causas que podem dar origem ao processo inflamatório e classificam-se em endógenas ou exógenas. As primeiras seriam derivadas de degenerações ou necroses tissulares e de alterações na resposta imunológica, por imunocomplexos ou reações autoimune. Já as exógenas podem ser atribuídas a agentes físicos, químicos e/ou biológicos. Independente da causa, uma das principais características do processo inflamatório é a saída de líquidos e de células do sangue para o interstício (PEREIRA; BOGLIOLO, 2004).

Para que o processo inflamatório se desenvolva é necessária a participação de componentes do sangue, como proteínas e células, dos vasos sanguíneos e de constituintes extracelulares do tecido conjuntivo (CONTRAN *et al*, 2005).

1.1.1. Células na inflamação

Das células altamente responsivas a estímulos inflamatórios destacam-se os granulócitos circulantes do sangue periférico. Dentre essas células, os neutrófilos, também chamados de polimorfonucleares (PMN), constituem a população celular primária da defesa aguda contra vários tipos de agentes patogênicos, acumulando-se rapidamente no sítio de lesão. Sua participação é multifuncional no processo de inflamação e envolvem resposta apropriada por meio de locomoção, reconhecimento seletivo do agente agressor, fagocitose do agente e sua posterior destruição. Possuem a habilidade de secretar substâncias capazes de retardar a disseminação da infecção e, quando necessário, recrutam outras células leucocitárias para o foco inflamatório (CASSATELA, 1995). As células endoteliais são ativadas e passam a expressar moléculas de adesão celular (CAM) para promoverem a aderência dos leucócitos circulantes, que após aumento da permeabilidade vascular resulta na migração leucocitária para o sítio de injúria.

A infiltração de leucócitos no tecido agredido se dá inicialmente pela aderência ao endotélio, seguida pelo processo de migração para o tecido lesado (diapedese). Este processo é regulado, em parte, por moléculas de adesão pertencentes à família das selectinas, que conferem maior estabilidade no rolamento dos leucócitos (TEDDER *et al*, 1995).

1.1.2. Mediadores Químicos do Processo Inflamatório

O início e a condução do processo inflamatório ocorrem graças a mediadores de origem plasmática ou celular, liberados a partir de células locais e migratórias (GALLIN; GOLDSTEIN; SNYDERMAN, 1982). Os mediadores inflamatórios são substâncias químicas presentes em altas concentrações no foco inflamatório que modulam os processos fisiológicos vasculares e leucocitários (ver Quadro 1).

Quadro 1: Mediadores de processos inflamatórios e seus efeitos no organismo

Mediadores	Função Físio-Patológica
Aminas vasoativas	Vasodilatação
Sistema complemento	Aumento da permeabilidade vascular, quimiotaxia, opsonização
Cininas	Aumento da permeabilidade vascular
Citocinas	Recrutamento celular, citotoxicidade mediada por células
Moléculas de adesão	Recrutamento celular em sítios de injúria
Espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio	Sinalização intracelular, estresse oxidativo, vasodilatação

Fonte: Adaptado de FANG *et al* (1997) e GOMAA *et a*, (2009).

1.1.2.1. Citocinas

Dentre os mediadores do processo inflamatório, as citocinas representam um tipo especial de mediadores que podem ser produzidos pelas células do tecido afetado e por células circulantes, e atraem linfócitos e fagócitos (LUSTER, 1998). As citocinas são peptídeos produzidos por células do sistema imunológico como os macrófagos, linfócitos, células epiteliais e do tecido conjuntivo (SAMA *et al*, 2004). São substâncias químicas circulantes no plasma e importantes mediadoras de resposta celular, desencadeadas pelo estímulo inflamatório agudo. Dentre elas destacam-se a interleucina 1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), assim como o fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) (CASSATELA, 1995; SPRINGER, 1994/1995). Suas ações são vasodilatação e reações de fase aguda, ou seja, alterações sistêmicas de inflamação como febre, sudorese, anorexia, perda de peso e leucocitose. Os mecanismos de liberação de citocinas estão relacionados com a interação entre receptores, dentre eles o receptor *Toll* e alguns componentes dos patógenos como: lipopolissacarídeos (LPS), peptidoglicanos e mananas. As quimiocinas são citocinas especialmente

importantes na resposta inflamatória. Elas exercem um papel chave fazendo com que as células brancas unam-se à superfície interna da parede do vaso, migrando da superfície interna do vaso para o tecido havendo uma quimioatração para o local da infecção (XANTHOULEA *et al*, 2004; SAMA *et al*, 2004).

1.1.2.2. Moléculas de Adesão

Estas moléculas estão presentes na superfície das membranas e são responsáveis por interações celulares (LEY; TEDDER, 1995). Esses autores explicaram ainda que a ação coordenada das moléculas de adesão seria necessária para uma efetiva e estável rolagem dos leucócitos sobre a parede vascular, uma vez que durante uma lesão local macrófagos teciduais liberam citocinas inflamatórias como IL-1 β e TNF- α , as quais ativam células endoteliais que passam a expressar moléculas de adesão chamadas de selectinas, servindo como receptoras para selectina leucocitária (expressão normal em leucócitos). Khan *et al* (2003), classificaram as selectinas de acordo com os tecidos onde elas são encontradas, em L-, P- e E-selectinas. Estas são encontradas, respectivamente, nos leucócitos, endotélio e/ou plaquetas (grânulos) e a expressão de E-selectina é induzida após algumas horas de ativação das células endoteliais por IL-1 β e TNF- α (MCEVER & CUMMINGS, 1997). Os membros da família das selectinas apresentam uma estrutura modular comum, caracterizada pela presença de 3 (três) domínios extracelulares: uma unidade repetida – similar à proteínas regulatórias do sistema complemento; um domínio amino terminal ligante de carboidrato (tipo lectina) dependente de cálcio e um domínio do tipo fator de crescimento epidérmico (EGF) (NORMAN *et al*, 1998). Algumas selectinas têm certo domínio intracelular, podendo transduzir sinais regulatórios que afetam a função das integrinas e a produção de citocinas (ROSEN & BERTOZZI, 1994).

Assim, a ligação de selectinas endoteliais e leucocitárias promove adesão e rolamento sobre o endotélio vascular. A interação das selectinas aos seus ligantes resulta em um declínio na velocidade dos leucócitos, onde as integrinas promovem a firme ligação dos neutrófilos ao endotélio (MCEVER &

CUMMINGS, 1997). Então, células endoteliais ativadas expressam ICAM-1, que funciona como receptor de Integrina β_2 (leucocitária) que, após interação com ICAM-1, funcionam como estimuladores da transmigração dos leucócitos pelo endotélio (diapedese) ao foco de injúria. A não expressão de ICAM-1 e L-selectina demonstrou uma redução significativa do rolamento de leucócitos, afetando conseqüentemente sua entrada no local da inflamação (LEHMANN *et al*, 2003), eliminando efetivamente a resposta inflamatória crônica nos animais deficientes em L-selectina e ICAM-1 (SHIMADA *et al*, 2003).

1.1.2.3. Espécies reativas do oxigênio (ERO) e do nitrogênio (ERN)

As EROs são produzidas normalmente por processos fisiológicos de forma enzimática ou não. A ativação de neutrófilos no processo inflamatório por radicais livres como o superóxido (PETRONE *et al*, 1980) tem sido bastante estudada. O ânion superóxido é normalmente o primeiro radical gerado por reações oxido-redutoras (LIU; OOI; CHANG, 1997), posteriormente produzindo derivados radicais, como radical hidroxil ($\bullet\text{OH}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que provocam danos celulares em componentes lipídicos, proteínas e no DNA (HSU; CHAN; CHANG, 2007).

O NO atua no processo de ativação de fator de transcrição relacionado à expressão de citocinas, causando mudança na permeabilidade vascular do tecido inflamado, além de potencializar a ação de IL-1 e TNF- α pelos leucócitos (RALTSON *et al*, 1997). Constitui uma das menores e mais simples moléculas biossintetizadas e apresentam um elétron desemparelhado, atuando como radical livre (MORRIS & BILLAR, 1994; BECKMAN & KOPPENOL, 1996). Sintetizado a partir da oxidação do aminoácido L-arginina, que é convertido a L-citrulina, catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). A NOS apresenta três isoformas agrupadas em duas categorias: a NOS constitutiva (c-NOS) – dependente de íons cálcio (Ca^{2+}) e de calmodulina (envolvida da sinalização celular) e a NOS induzível (i-NOS) – produzida por macrófagos e outras células ativadas por citocinas (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991).

O óxido nítrico medeia vários fenômenos como: vaso-relaxamento dependente do endotélio, citotoxicidade mediada por macrófagos, inibição da

ativação, adesão e agregação plaquetária, regulação da expressão genética basal, entre outras (CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002). Seu papel no processo inflamatório é um dos aspectos mais estudados na fisiologia nos últimos anos. Estudos mostram um importante papel do NO como agente anti-inflamatório, entretanto, muitos outros demonstram a participação desta molécula como indutora de disfunções teciduais e da ativação de células inflamatórias (MAGITA *et al*, 2001; NAGY *et al*, 2007). O NO apresenta envolvimento na resposta do processo inflamatório devido ao seu poder vasodilatador o que possibilita o aumento da permeabilidade vascular e o edema através de mudanças no fluxo sanguíneo local e do aumento na produção de prostaglandinas (substâncias pró-inflamatórias) por aumento na expressão de ciclooxigenases (COX) (HEBEDA, 2008). A concentração de NO determina se esta substância é benéfica ou tóxica, visto que pequenas quantidades desta molécula são necessárias para hemostasia, já grandes quantidades, como aquelas produzidas na ativação da i-NOS, são citotóxicas (KIECHELE; MALINSKI, 1993). Entretanto, a produção de grande quantidade de NO pode ser importante na defesa contra invasores celulares, tumores e ainda em lesões vasculares com perda endotelial (GABOURY *et al*, 1993; KUO; SCHOROEDER, 1995; PAYNE; KUBES, 1993; YAN *et al*, 1996).

1.2. Radicais livres e estresse oxidativo no processo inflamatório: a sinalização redox na resposta inflamatória da Artrite.

Os radicais livres são produzidos por diferentes processos metabólicos por meio de reações de oxido-redução. Dentre estes, o superóxido produzido em grandes quantidades durante ativação máxima de células do sistema imune se destaca devido a sua posterior conversão a peróxido de hidrogênio, espontaneamente ou via catálise pela enzima superóxido dismutase (SOD), podendo posteriormente, na presença de íons ferro (Fe^{+2}) ou outros metais de transição, originar radicais hidroxil ($\text{HO}\cdot$). Petrone *et al* (1980) sugeriu que a atividade de radicais livres, como o superóxido, no processo de amplificação do estresse oxidativo apresenta papel crucial em eventos inflamatórios devido a sua capacidade em ativar células do sistema imune, como macrófagos e

neutrófilos. Dessa forma, o estresse oxidativo tende a agravar o quadro inflamatório por aumentar o dano tecidual (HALLIWEL, 1992). O superóxido unindo-se com o óxido nítrico pode ainda formar o radical peroxinitrito (ONOO^\cdot) que é altamente reativo e pode alterar o balanço redox do sistema glutathiona reduzida/glutathiona oxidada no sentido do estresse oxidativo, por depletar grupamentos $-\text{SH}$ de componentes fundamentais de sistemas antioxidantes naturais como a glutathiona reduzida (BARRY, 2007).

A descoberta de espécies reativas do oxigênio (EROs) como mensageiros intracelulares deu subsídio a definição mais atual de estresse oxidativo como “um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes, levando a um desarranjo de sinalização e do controle redox e/ou a um dano molecular” (JONES, 2006). Devido a esse conhecimento alguns EROs tem sido atribuídos ora como reguladores ora como aceleradores de processos metabólicos em doenças auto-imunes (AVALOS; CHUNG; OESER, 2007).

Existe uma estreita relação entre o estresse oxidativo e as doenças auto-imunes (SURH, 2005). Algumas células do sistema imune, como macrófagos, monócitos, neutrófilos e eosinófilos (FERREIRA & MATSUBARA, 1997), quando ativadas por lipopolissacarídeo (LPS), lipoproteínas e citocinas produzem grande quantidade de radicais superóxido, relacionado à atividade aumentada da enzima NADPH oxidase (HITCHON; EL-GABALAWY, 2004; BITENCOURT, 2007). Na sinovite reumatóide há uma resposta das células ao processo inflamatório com aumento na produção de mediadores como citocinas e EROs (FILIPPIN *et al*, 2008). Na figura 1 observa-se vias de sinalização redox relacionadas à patogênese da artrite reumatóide. A conseqüente produção de mais radicais superóxido, formando peroxinitrito, leva ao estímulo de vias de sinalização que culminam na ativação do fator de transcrição $\text{NF-}\kappa\text{B}$, o qual promove a transcrição de moléculas responsáveis pela mediação do processo inflamatório, como citocinas ($\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$), cicloxigenase e óxido nítrico sintase induzível (iNOS). A concentração EROs é fator determinante na regulação de funções celulares como: proliferação celular, biossíntese de hormônios, quimiotaxia e explosão oxidativa. A existência de componentes moleculares responsáveis pelo equilíbrio redox

celular, como o sistema da glutathiona, representa importância central na sinalização de vias inflamatórias (OKTYABRSKY; SMINORVA, 2007). O Quadro 2 apresenta uma lista das vias de transdução de sinais sensíveis ao estado redox celular.

Quadro 2: Lista das vias de transdução de sinais redox-sensíveis

Alvos redox-sensitivos	Funções
Fatores de transcrição:	
NF- κ B	Adesão celular, síntese de NO, produção de citocinas, resposta à patógenos
AP-1	Proliferação celular, adesão celular, resistência a multidrogas.
Antioxidantes:	
Glutathiona peróxidase	Detoxificação de peróxidos dependente de glutathiona.
Mn-Superóxido dismutase	Dismutação do ânion radical superóxido nas mitocôndrias.
Citocinas	
TNF	Atividade de necrose tumoral, produção de ROS, morte celular programada etc.
IL-1, -2, -8	Proliferação de células, diferenciação de células T, morte celular programada, inflamação etc.
Genes relacionados ao crescimento celular	
p21	Ciclo celular, morte celular programada, sinalização via Ras/Proteína G.
Ras	Proliferação celular mediada por superóxido.

Abreviaturas: AP, proteína ativadora; NF- κ B, fator de transcrição nuclear κ B; NO, óxido nítrico; IL, interleucina; TNF, fator de necrose; p21, gene p21; Ras, gene Ras. Modificado de SEM *et al* (1998) e GOMAA *et al* (2009).

O aumento na concentração de glutatona oxidada promove aumento da afinidade entre o NF- κ B ativado e seu sítio no DNA. (ver Figura 1). Droge *et al* (1994) descobriram que parece existir um nível intermediário ideal de glutatona oxidada (GSSG) intracelular necessária para a ativação de NF- κ B eficaz, onde o estresse oxidativo atuaria como importante mediador dessa ativação (FILIPPIN *et al*, 2008).

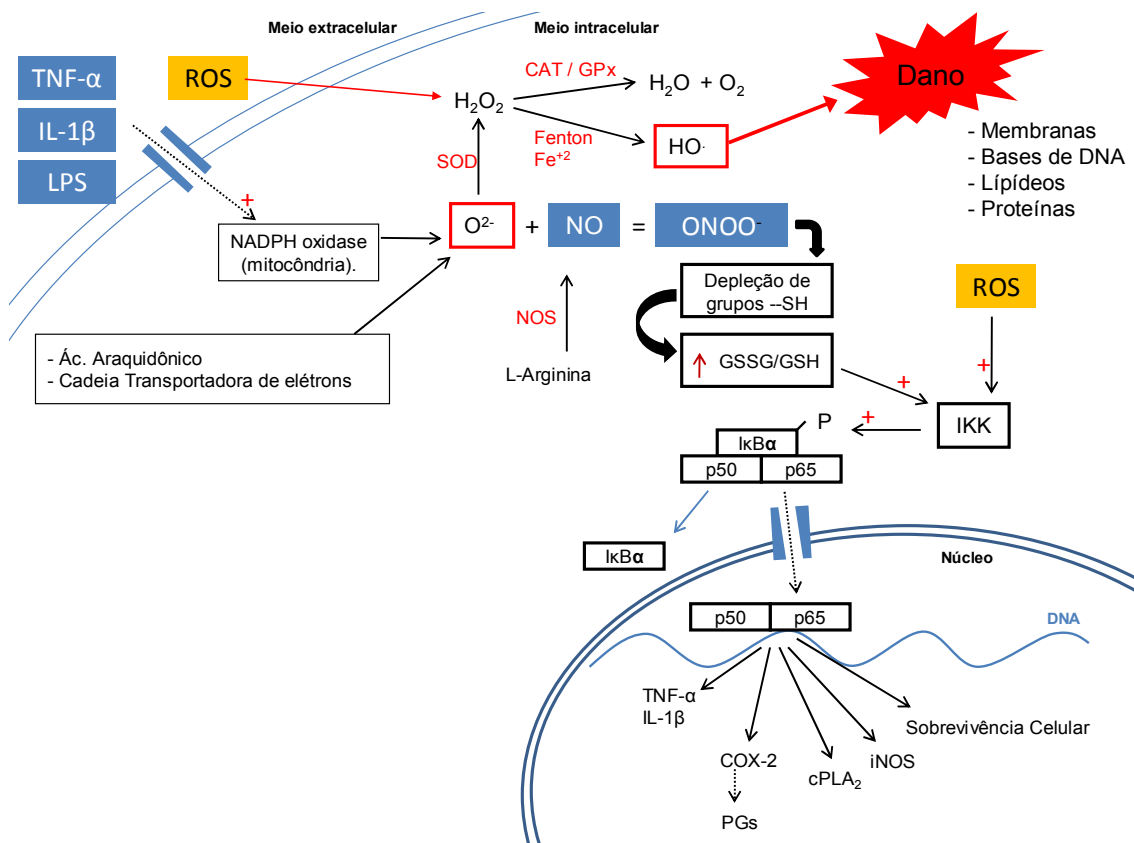


Figura 1: Formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (superior central), alvos dessas espécies reativas (superior à direita), relação das ROS com a ativação do NF- κ B e transcrição de citocinas pró-inflamatórias (inferior à direita) em processo inflamatório artrítico. O $_2^{\cdot-}$ = radical ânion superóxido; H $_2$ O $_2$ = peróxido de hidrogênio; HO \cdot = radical hidroxil; SOD = enzima superóxido dismutase; CAT = enzima catalase; GPx = enzima glutatona peroxidase; NO = óxido nítrico; NOS = enzima óxido nítrico sintase; ONOO $^-$ = peroxinitrito; -SH = grupamento sulfidrílica; GSSG/GSH = relação glutatona oxidada/glutatona reduzida; IKK = inibidor kappa quinase; I κ B α = Inibidor kappa B alfa; p50 e p65 = subunidades protéicas do fator nuclear kappa B (NF- κ B); cPLA $_2$ = fosfolipase A $_2$ citosólica; COX-2 = enzima cicloxigenase 2; iNOS = enzima óxido nítrico sintase induzível; LPS = lipopolissacarídeo; TNF- α = fator de necrose tumoral alfa; IL-1 β = interleucina 1 beta. (Adaptado de Filippin *et al*, 2008).

1.3. Modelo artrítico de inflamação experimental: indução por Zymosan

A injeção de zymosan (Zy) na cavidade articular de ratos produz uma sinovite severa e erosiva (KEYSTONE *et al*, 1989) que induz uma resposta imune *in vivo* por ativação de macrófagos e outras células mononucleares, apresentando propriedades flogísticas semelhantes a AR, como edema, infiltrado celular sinovial, destruição cartilaginosa e óssea e perda motora (DERBÒCIO *et al*, 2005).

O zymosan (Zy) é um polissacarídeo derivado da parede celular do fungo *Saccharomyces cerevisiae*, tendo a β -glucana como principal componente estrutural, unidas por ligações $\beta 1 \rightarrow 3$ (Figura 2). A β -glucana é caracterizada pelas suas propriedades imunoestimulatórias, bem como é amplamente utilizada para estudar o efeito de leucócitos no processo inflamatório *in vivo* (BROWN; GORDON, 2001). O zymosan é reconhecido por macrófagos a partir do receptor delectina 1, esses receptores são expressos predominantemente em células do tipo monócitos, macrófagos, neutrófilos, células dentríticas e uma menor população de células T do baço (WILLMENT, 2003). Após o reconhecimento do zymosan por macrófagos, este polissacarídeo interage com o receptor “like toll” (TLR2), presente na superfície das células. Subseqüentemente ocorre ativação do fator NF- κ B, produção de citocinas inflamatórias, bem como a expressão de moléculas co-estimulatórias (TAYLON *et al.*, 2002). A fase aguda da artrite induzida por Zy (AZy) é caracterizada por aumento da permeabilidade vascular, edema e influxo celular inflamatório para a cavidade articular. Posteriormente, observa-se progressiva sinovite, com infiltrado celular e ativação dos fibroblastos, assemelhando-se à sinovite reumatóide crônica (*pannus* reumatóide) (GEGOUT *et al.*, 1994; ROCHA *et al.*, 2003). Assim, alguns parâmetros patológicos semelhantes à artrite reumatóide (AR) são evidenciados nesse modelo de AZy.

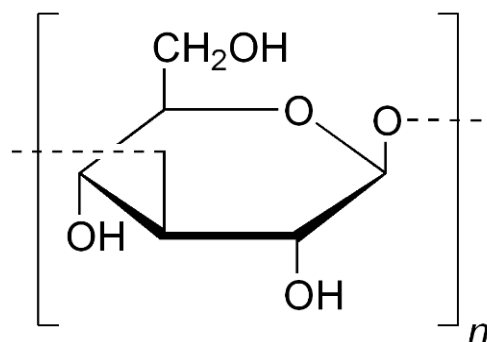


Figura 2: Representação do Zymosan

AR é uma doença de etiologia auto-imune, sistêmica, caracterizada por sinovite crônica, erosiva, que acomete o tecido conjuntivo com alterações predominantes nas articulações e nas estruturas periarticulares. A maioria dos pacientes apresenta o auto-anticorpo fator reumatóide, uma imunoglobulina tipo M, reagente (KINNE et al, 2000; ALTINDAG *et al*, 2007). O diagnóstico precoce e o início imediato do tratamento são fundamentais para o controle da atividade da doença e para prevenir incapacidade funcional e lesão articular irreversível (ALBERS *et al*, 2001). Os objetivos principais do tratamento são: prevenir ou controlar a lesão articular, prevenir a perda de função e diminuir a dor, tentando maximizar a qualidade de vida destes pacientes. A remissão completa, apesar de ser o objetivo final do tratamento, raramente é alcançada. Têm prevalência de aproximadamente 0,46% na população brasileira e 1% na população mundial. Segundo Rebelatto e Morelli (2004), acomete aproximadamente 1 a 2% da população mundial quando está em fase produtiva e importante de sua vida. Aumenta para 4,5% nas pessoas na faixa etária dos 55 aos 75 anos e afeta ambos os sexos, mas tem predomínio sobre as mulheres na proporção de 3 mulheres para cada 1 homem (SENNA *et al*, 2004; LEE & WEINBLATT, 2001).

É uma doença inflamatória progressiva, portanto de caráter crônico e deformante da membrana sinovial, que fica edemaciada e hiperplásica; este tecido inflamado é denominado de *pannus reumatóide* que progressivamente penetra e destrói a cartilagem e o osso subcondral (Figura 3) (FELDMAN; MAINI, 1999; CHIARELLO *et al*, 2005). Compromete principalmente as articulações do punho, metacarpofalangianas e interfalângicas proximais e

manifesta-se com dor inflamatória e inchaço em grandes e pequenas articulações, associados a rigidez. Acredita-se que esteja relacionada a fatores genéticos e exógenos (SCHWARTZ,1993). Um gene associado com artrite reumatóide foi identificado a partir dos genes polimórficos do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), verificou-se que aproximadamente 70% dos pacientes brancos com AR clássica expressam o antígeno leucocitário humano DR4 (HLA-DR4) (CRILLY *et al.*, 1999).

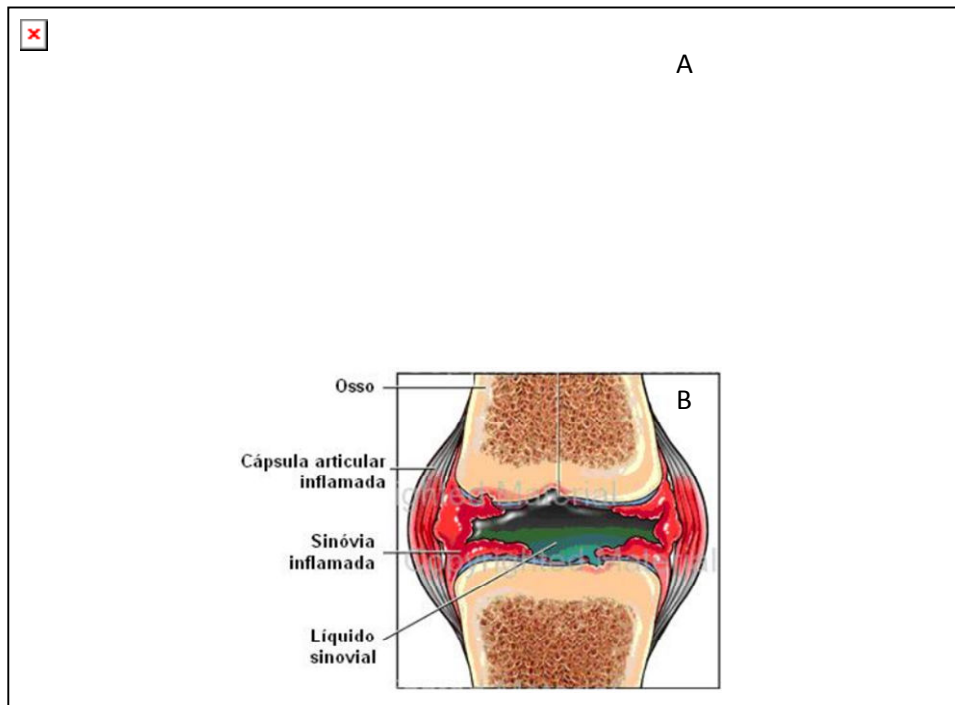


Figura 3: Ilustrações de articulação normal (A) e inflamada (B). Modificada de www.ufrgs.br/ligadereumatologia.

As articulações sinoviais apresentam uma cavidade articular que permite grande mobilidade, esta cavidade contém o líquido sinovial, rico em ácido hialurônico, que facilita o deslizamento das superfícies articulares e proporciona nutrição para a cartilagem hialina articular. O limite da cavidade articular é formado pela membrana sinovial, esta membrana é pregueada e a superfície interna da mesma é revestida por células cubóides ou sinoviócitos (SODEN *et al.*, 1989). A membrana sinovial normal possui uma espessura de 1 a 4 camadas de células, dispondo de uma rica vascularização. Os sinoviócitos do tipo A (semelhantes a macrófagos) e os do tipo B (semelhantes a fibroblastos), constituem as células da membrana sinovial. Os macrófagos sinoviais são menos abundantes do que os fibroblastos sinoviais. Estes

sinoviócitos sintetizam o ácido hialurônico, componente importante do tecido conjuntivo e do líquido sinovial (TARNER *et al.*, 2005).

Harris (1993) acredita que a AR seja desencadeada pelos linfócitos T CD4⁺, os quais reconhecem um antígeno artritogênico na membrana sinovial. As células T CD4⁺ ativadas estimulam monócitos, macrófagos, fibroblastos sinoviais e células B. Na sinovite reumatóide, assim como em outras artrites, várias citocinas são produzidas: IL-1, IL-6, TNF- α , IL-2, IL-8 e IFN- γ . As citocinas proinflamatórias cruciais para o desenvolvimento da AR incluem a IL-1 β e o TNF- α , as quais são encontradas em elevadas concentrações no soro e no fluido sinovial de pacientes com artrite reumatóide ativa. As células T CD4⁺ também estimulam as células B a produzirem o fator reumatóide (CHIKANZA; KINGSLEY; PANAYI, 1995).

Pap *et al* (2000) descreveram que no processo de sinovite, os fibroblastos sinoviais também participam ativamente aumentando a atividade de fatores transcricionais, como o NF- κ B, que estão envolvidos na regulação da expressão de moléculas de adesão vascular (VCAM-1), citocinas e metaloproteinases. Além disso, os neutrófilos participam da destruição da cartilagem, liberando espécies reativas do oxigênio e enzimas proteolíticas. A presença do infiltrado leucocitário na sinóvia é uma característica constante na maioria dos pacientes com AR, sendo o infiltrado celular difuso, sem organização estrutural (HARRIS, 1990).

Na tentativa de esclarecer a etiologia da AR, pesquisas sugerem fatores genéticos, alterações na resposta imunológica, envolvendo dano tecidual, fatores ambientais, infecções e o estresse oxidativo (OZKAN *et al*, 2007; CHIARELLO *et al*, 2005). Descobertas demonstram que as espécies reativas do oxigênio podem atuar como segundos mensageiros de vias específicas na sinalização celular de pacientes com AR (FORMAN; FUKUTO; TORRES, 2004; ROSA *et al*, 2004).

Devido as similaridade nas características patológicas, a AZy é amplamente usada como modelo de artrite para avaliação do efeito de drogas e compostos naturais com características antiinflamatórias (KANNAN *et al*,

2005; CARDOSO *et al*, 2009). Assim, esse foi o modelo de escolha para realização dos experimentos deste trabalho.

1.4. Compostos que interferem no processo inflamatório

Os antiinflamatórios são substâncias utilizadas para minimizar as conseqüências do processo inflamatório. Antiinflamatórios não esteróidais (AINEs) são as drogas de primeira escolha no tratamento antiinflamatório. Têm capacidade de promover uma rápida supressão dos sintomas inflamatórios, tais como a dor e a rigidez matinal. Estes fármacos não influenciam o curso da doença, sendo incapazes de deter a progressão das alterações patológicas e promover a remissão da doença. Medicamentos mais recentes, também conhecidos como medicamentos de segunda geração, como: metotrexato, sais de ouro, azatioprina, ciclofosfamida e ciclosporina, a princípio são capazes de debelar a inflamação, retardar o desenvolvimento de alterações radiológicas, induzir a remissão da doença e preservar a capacidade funcional, conseqüentemente influenciando o curso clínico a longo prazo (AFELTRA, 2001).

Drogas de última geração idealizadas contra elementos essenciais na instalação e progressão de inflamações agudas têm sido produzidas, como: o infliximab e o etanercept, que são bloqueadoras do TNF- α e a anakinra que é um antagonista da IL-1 (MORELAND, 1999). O infliximab foi aprovado para a terapêutica da AR, entretando seu custo elevado e administração por via parenteral limitam sua utilização de forma mais ampla (FURST *et al.*, 2000). A maior limitação do uso dos AINEs para tratamentos de doenças inflamatórias crônicas é a ocorrência de reações adversas, como afecções do trato gastrointestinal e/ou renal (MONTEIRO *et al.*, 2008). Estas restrições e efeitos secundários indesejáveis relacionados a estes fármacos fazem com que as pesquisas sejam direcionadas no sentido de que se descubram outros medicamentos para o tratamento dessa patologia. Compostos de origem natural, extraídos de diversas fontes, também tem sido empregados como agentes antiinflamatórios. Foi demonstrada a supressão direta ou indireta da geração de metabólitos ativos de oxigênio induzida após estímulo com anti-

TNF- α nas células sinoviais e em polimorfonucleares na artrite reumatóide (SUNG *et al*, 2000). Agentes biológicos como antagonista do TNF- α demonstraram ser eficazes no controle da inflamação e na progressão da AR, os quais parecem não atuar diretamente sobre a produção de radicais do oxigênio, mas levando a inibição da quimiotaxia e ativamento de neutrófilos para o tecido sinovial, com conseqüente redução da geração de radicais livres (DEN BROEDER *et al*, 2003).

1.5. Compostos naturais extraídos de algas marinhas

Dentre as mais ricas fontes de novos compostos bioativos conhecidos destacam-se as algas marinhas devido ao seu grande potencial para a produção de metabólitos secundários (FAULKNER, 2002; BLUNT *et al*, 2006; CANTILLO-CIAU *et al*, 2010). Das três principais divisões de algas marinhas: Phaeophyta (algas marrons), Chlorophyta (algas verdes) e Rhodophyta (algas vermelhas) (RORRER; CHENEY, 2004), as algas Phaeophyta se destacam devido à presença de laminaranas (polissacarídeos neutros) como moléculas de reserva e pigmentos como clorofila a, clorofila c e xantofilas, sendo a fucoxantina o pigmento responsável pela cor marrom. Possuem em suas paredes celulares polissacarídeos aniônicos ricos em grupos carboxilas denominados de ácidos algínicos e na matriz extracelular as fucanas, polissacarídeos sulfatados, os quais possuem a α -L-fucose (Figura 4) como açúcar mais representativo (KLOAREG & QUATRANO, 1987), cujas cadeias, a depender da espécie, podem ser compostas, além da fucose, por galactose, xilose, manose e ácido glucorônico,

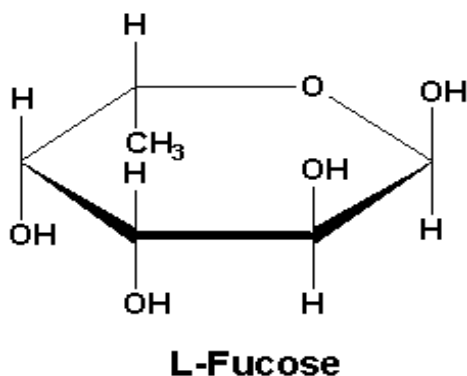


Figura 4: Representação do açúcar α -L-fucose

A α -L-fucose é uma desoxi-hexose na qual a hidroxila do carbono 6 (C-6) é substituída por um hidrogênio. Este açúcar não é encontrado livre na natureza como a ramnose e galactose, sendo isômeros destes, com exceção do C-6, e é encontrada ligada a outras unidades monossacarídicas formando polímeros. Em mamíferos a α -L-fucose está presente em glicoconjugados apresentando importante papel nas reações imunológicas, nos processos envolvendo a adesão de leucócitos a células endoteliais mediados por selectinas e em numerosos eventos ontogênicos, incluindo eventos relacionados à família do receptor *Notch* (MOLONEY, 2000). Alterações na produção de oligossacarídeos fucosilados foram observadas em vários processos patológicos, incluindo câncer e aterosclerose. Em humanos, a deficiência de fucose pode ser caracterizada pela falta de adesão leucocitária tipo 2, conhecida como desordem congênita de reações de glicosilação, devido a uma mutação no gene que codifica a enzima fucosiltransferase envolvida na formação da porção carboidrato do ligante E-selectina. Esta mutação resulta na ausência de um ligante de carboidrato dos neutrófilos, conhecido como sialil-Lewis X, necessário para ligação da E-selectina e talvez a P-selectina nas células endoteliais ativadas por citocinas. A fucosilação de glicanas pela fucosiltransferase requer o substrato guanosina difosfato-fucose (GDP-fucose). Duas vias, operantes em células de mamíferos, foram propostas para a biossíntese desse substrato – o esclarecimento dessas vias não são contempladas nesse trabalho, o *caminho do novo* (GDP-manose-dependente) e o caminho de salvamento (fucose-dependente-livre) (BECKER & LOWE, 2003).

1.5.1. Estrutura de polissacarídeos fucosilados de algas

A estrutura dos polissacarídeos varia entre as diferentes espécies de algas, tanto no tipo de açúcar constituinte, quanto na posição da ligação glicosídica e sítio de sulfatação (MOURÃO *et al*, 1996). Homofucanas são polissacarídeos constituídos principalmente por L-fucose unidas por ligações do tipo α -(1 \rightarrow 3), com ramificações em C2 ou C4 e com o grupo sulfato podendo esta presente no carbono 2 e/ou 4. Patankar *et al* (1993) estudando polissacarídeos da alga *Fucus vesiculosus* verificou que o fucoidan extraído

apresentava cadeia central constituída por fucose unidas por ligações do tipo α -(1 \rightarrow 3) e sulfato no carbono 4 da fucose e ligações do tipo α -(1 \rightarrow 2), correspondentes as ramificações (Figura 6), as quais ocorriam a cada dois ou três resíduos de fucose, apresentando alto grau de ramificações. Neste modelo, a fucose é o açúcar terminal, e não a fucose-4-sulfato (CONCHIE & PERCIVAL, 1950). Um polímero constituído de unidades hexassacarídicas repetidas (cinco resíduos de α -L-fucopirranose ligadas α -(1 \rightarrow 3) com fucose ramificada em C2, apresentando sulfatação em C2 e C4, com o C2 podendo apresentar-se acetilado foi identificado na alga *Chorda filum* (CHIZHOV *et al*, 1999). Nagaoka *et al* (1999) isolou uma homofucana da alga marron *Cladosiphon okamuranus* apresentando cadeia central com resíduos de fucose unidas por ligações α -(1 \rightarrow 3), várias ramificações em C2 e, em algumas ramificações as fucoses poderiam estar ligadas ao ácido α -D-glucurônico. Uma fucoidana de *Fucus evanescences* foi caracterizada como apresentando cadeia central de α -L-fucopirranose com ligações alternadas α -(1 \rightarrow 3) e α -(1 \rightarrow 4), apresentando sulfatação no C2, podendo ainda estar sulfatado no C4 (BILAN *et al*, 2002). Outros açúcares, em baixas quantidades, podem ser encontrados em estruturas de homofucanas (CARDOSO *et al*, 2009).

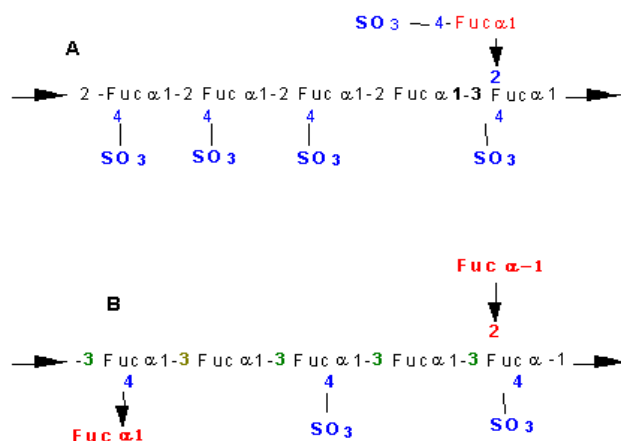


Figura 5: Estruturas propostas para fucoidanos de *Fucus vesiculosus*, (A) Modelo de CONCHIE; PERCIVAL, 1950. (B) Modelo proposto por PATANKAR *et al.*, 1993.

Heterofucanas de algas são moléculas extremamente heterogêneas e ramificadas possuindo como principal característica a α -L-fucose sulfatadas nos carbonos 2, 3 e/ou 4, ligada a monossacarídeos como: xilose, galactose, glicose, manose, ácidos urônicos e outros (MORY & NISIZAWA, 1982; LEITE

et al, 1998; DUARTE *et al*, 2001; ROCHA, 2002). Em algumas moléculas, pode-se encontrar o grupo acetil (CHIZHOV *et al*, 1999; BILAN *et al*, 2002). Polissacarídeos sulfatados, fucosilados e ramificados também foram identificados em equinodermos (MOURÃO *et al*, 1996).

Leite *et al* (1998) ao estudar as propriedades de polissacarídeos da alga marrom *Spatoglossum schröderi* demonstrou a estrutura de uma heterofucana isolada da fração, de três frações (A,B e C) observadas na mobilidade eletroforética, de mais alto peso molecular obtido (Fucana A: 21 KDa) formada por ácido glucurônico compondo a cadeia central unidos por ligações β -(1 \rightarrow 3) com substituições em C4 por trissacarídeos de α -L-Fucose, com este último açúcar apresentando grupos sulfato no C4 e dissacarídeos de xilose, unidas por ligações β -(1 \rightarrow 4) no C2, denominada de xilofucoglucuronana. Na Figura 5 pode-se observar a representação dessa fucana.

Medeiros *et al* (2008) ao estudar polissacarídeos sulfatados da alga *Lobophora variegata* isolou um heteropolissacarídeo composto de fucose, galactose e sulfato, o qual apresentou razão molar de 1:3:2, identificando também a presença do grupamento sulfato e carbono anomérico correspondente a β -D-galactose em ensaios espectroscópicos de infravermelho (IV) e ressonância magnética nuclear (RMN), respectivamente. Marques (2007) estudando a alga marrom *Padina gymnospora* identificou uma fração polissacarídica composta de fucose, xilose, galactose e glicose, apresentando razão molar de 1:0,4:0,3:0,2, com absorções na região do IV típicas de grupamentos sulfato na posição axial, correspondentes ao sulfato ligado no carbono 4 e sinais na RNM correspondentes a α -L-Fucose.

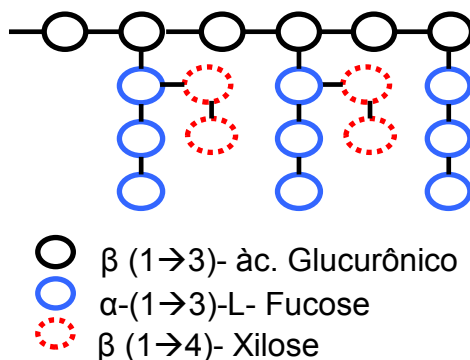


Figura 6: Estrutura de heterofucana obtida da alga marrom *Spatoglossum schröderi* (Adaptado de Leite *et al*, 1998).

1.5.2. Atividades farmacêuticas de compostos fucosilados

Muitas são as referências que demonstram a atividade de polissacarídeos fucosilados sulfatados, sejam em experimentos utilizando modelos animais ou experimentos utilizando de reações químicas produtoras de radicais livres, mimetizando alterações biológicas *in vivo* ou estresse oxidativo *in vitro*, respectivamente. Várias atividades biológicas têm sido atribuídas a compostos fucosilados, dentre elas destacam-se: atividade anticoagulante (NISHINO *et al*, 1991;1999;2000; NARDELLA *et al*, 1996), antitrombótica (MOURÃO & PEREIRA, 1996), antiinflamatória (LASKY *et al*, 1995; MEDEIROS *et al*, 2008) e antioxidante (SOUZA *et al*, 2007; WANG *et al*, 2008; YE *et al*, 2008).

A atividade farmacológica de fucanas tem sido relacionada à carga, ao grau de ramificação e a disposição espacial dos grupamentos sulfato presentes no polímero (QUEIROZ *et al*, 2008), o que seriam necessários para respostas específicas do sistema imunológico (TOKUNAKA *et al*, 2000). Sun *et al* (2009) relataram que o componente monossacarídico, assim como tamanho molecular, estrutura e conformação estão relacionados à atividade antioxidante dos polissacarídeos. A capacidade de polissacarídeos fucosilados e sulfatados de algas marinhas em reduzir componentes moleculares e remover radicais livres como ânion superóxido e o radical hidroxil em sistemas *in vitro* tem demonstrado relevância na atividade desses compostos naturais (ZUBIA; ROBLETO; FREILE-PELEGRIN, 2007; SOUZA *et al*, 2007; WANG *et al*, 2008; YE *et al*, 2008).

Cardoso *et al* (2009) analisando as propriedades antiinflamatórias de fucoidan de *Fucus vesiculosos* demonstraram a capacidade desse composto em diminuir o influxo celular e os níveis de óxido nítrico em articulações de ratos submetidos a inflamação artrítica por zymosan. Medeiros *et al* (2008) ao analisar o efeito de galactofucanas sulfatadas da alga *Lobophora variegata* em modelo de peritonite induzida por tioglicolato de sódio e edema de orelha induzido por óleo cróton em camundongos, identificaram diminuição do influxo celular peritoneal e diminuição do edema de orelha.

Como o uso de antiinflamatórios, como AINEs, metotrexato e infliximab, por longos períodos podem causar depressão do sistema imunológico, as atividades *in vitro* e *in vivo* relacionadas a polissacarídeos de algas marinhas, dentre elas as algas marrons, assim como a biodisponibilidade dessas fontes de compostos farmacologicamente ativos levaram a elaboração deste trabalho e, com o intuito de conhecer mais a respeito de polissacarídeos sulfatados da alga marrom *Lobophora variegata* alguns objetivos foram propostos.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Caracterizar quimicamente uma fração (F1) de polissacarídeos sulfatados da alga *Lobophora variegata* e avaliar sua atividade frente a sistemas *in vitro* produtores de radicais livres e em modelo de inflamação articular induzido por zymosan em ratos *Wistar*.

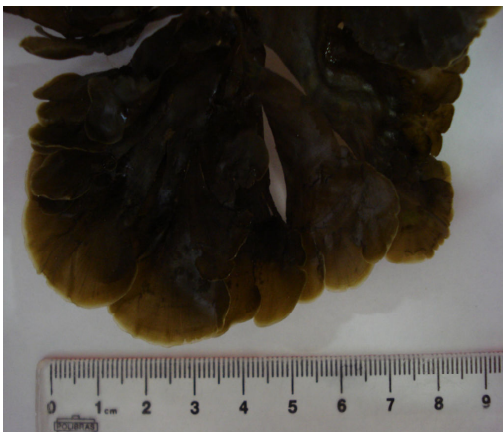
Objetivos específicos:

- Caracterizar uma fração de polissacarídeos sulfatados da alga *L. variegata*, utilizando de métodos químicos e espectroscópicos.
- Avaliar a atividade antioxidante pela análise do potencial redutor e remoção de espécies reativas do oxigênio (EROs) por meio da utilização de sistemas *in vitro*.
- Avaliar a citotoxicidade dos polissacarídeos sulfatados da fração F1.
- Verificar a ação dos polissacarídeos sulfatados (F1) frente aos seguintes parâmetros inflamatórios: celularidade, edema, produção de mediadores inflamatórios (óxido nítrico (NO) e TNF- α), histopatologia (H&E) e imunohistoquímica (TNF- α), na administração do polissacarídeo sulfatado (F1), diclofenaco de sódio e L-NAME.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Alga Marinha *Lobophora variegata*

A alga *Lobophora variegata* (Lamouroux) (Figura 7) Womersley & Oliveira foi coletada em Búzios, litoral do Rio Grande do Norte e identificada pela Dr^a. Eliane M. Soriano (Departamento de Oceanografia e Limnologia, UFRN). Após sucessivas lavagens em água corrente para remoção de areia, epífitas, inclusões calcárias e sais, então, foi colocada para secar em estufa aerada a 45 °C.



Classificação taxonômica:

Divisão: Phaeophyta

Classe: Phaeophyceae

Ordem: Dictyotales

Família: Dictyotaceae

Gênero: *Lobophora*

Espécie: *Lobophora variegata*

Figura 7: Alga marinha *Lobophora variegata*

3.2. Outros Materiais

- Ácido acético, acetona, etanol, cloreto de sódio e citrato de sódio (Reagen Quimibrás Indústrias Químicas S.A., Rio de Janeiro, RJ, Brasil);

- RPMI (Cultilab, Campinas SP);

- MTT (Invitrogen);

- Ácido sulfúrico (Merck, Darmstadt, Alemanha);

- Anti-TNF- α (Kits da Santacruz biotecnologia, USA);
- Coomassie brilliant blue R 250 (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA);
- Bacto-gelatin (Difco Laboratories);
- Nitrato redutase de *Aspergillus Níger*, Nitroblue tetrazolium, NADPH, Ácido 2-tiobarbitúrico 98%, Ácido ascórbico 99%, zymosan, NG-nitro-L-arginine methyl Ester, N-(1-Naphthyl)-ethylene-diamine-dihydrochloride, Sulfanilamide (99%) e (L-NAME) (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA);
- Hidrato de Cloral (10 mg/mL), Cloridrato de Xilazina a 2% e Cloridrato de ketamina 5% (Köning do Brasil, Ltda);
- Agarose (Bio Rad Laboratories, Richmond, CA, USA) ;
- Diclofenaco Sódico (Neoquímica, Com. E Ind. Ltda, Anápolis, GO);
- Ração (Labina, Indústria de Rações do Brasil Ltda, São Loureço da Mata/ PE);
- Seriga de insulina tkl (TKL IMP. E EXP. de Produtos Médicos Hospitalares, Curitiba/PR);
- Agulhas BD Precision Glide (Becton Dickinson Indústrias Cirúrgicas Ltda, Curitiba/PR).

3.2.1. Aparelhos

Além dos aparelhos usuais de laboratório podemos destacar:

- Agitador orbital mod. 255-B da FANEM Ltda. (São Paulo, SP, Brasil);
- Banhos e estufas de temperatura constante (FANEM Ltda, São Paulo, SP, Brasil);

- Bombas peristálticas Microperpex S mod. 2232 da LKB (Bromma, Suécia) e Econo Pump mod. EP-1 (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA);
- Centrífuga refrigerada RC 2-B (Ivan Sorvall Inc., Norwalk, CO, EUA);
- Centrífuga refrigerada CR 21 (Hitachi Koki Co. Ltd., Tóquio, Japão);
- Espectrofotômetros Varian - Series 634 (Varian Techtron PPTY Ltd., Springvale, Vico, Austrália) e Hitachi U-2000 (Tóquio, Japão);
- Espectrômetro de infravermelho modelo FT1 6PC (Perkin Elmer, EUA);
- Evaporador rotatório Evapo-Mix (Buchler Instruments, Fort Lee, NJ, EUA);
- Medidor de pH, Orion Research model 701 (Digital Lonalyzer, Cambridge, MA, EUA);
- Fontes de corrente contínua e regulável (Técnica Permatron Ltda., São Paulo, SP, Brasil);
- Paquímetro digital ABS escala 0-150 mm (Lotus, REF: 5571);
- Leitora de microplacas TP Reader (Hexasystems, EUA);
- Micrótomo (American Optical ®, EUA).

3.3. Obtenção de Polissacarídeos Sulfatados da Alga Parda *L. variegata*

A alga foi coletada por Medeiros *et al* (2008) em 2007 e processada como se segue: após seca e pulverizada foi tratada quatro vezes, com dois volumes de acetona para despigmentação e delipidação do material. A acetona foi decantada, e o resíduo colocado para secar sob aeração, aferindo-se o peso seco do material, que se convencionou chamar de pó cetônico.

Ao pó cetônico foi adicionado dois volumes de NaCl 0,15M, sendo o pH ajustado para 8,0 com NaOH. A este material adicionou-se a enzima proteolítica Maxatase (15 mg por grama de pó cetônico), incubando-se a 60 °C “*overnight*”. Em seguida a suspensão foi centrifugada a 10.000 xg por 20 minutos (MEDEIROS *et al*, 2008). O precipitado foi desprezado e o sobrenadante, denominado de Fração Total (FT).

A Fração Total (40 g) foi fracionada pela adição de volumes crescentes de acetona (0,3v, 0,5v, 0,8v, 1,0v, 1,5v e 2,0v), entre cada adição a suspensão polissacarídica foi centrifugada e o precipitado coletado, obtendo-se seis frações (Figura 8).

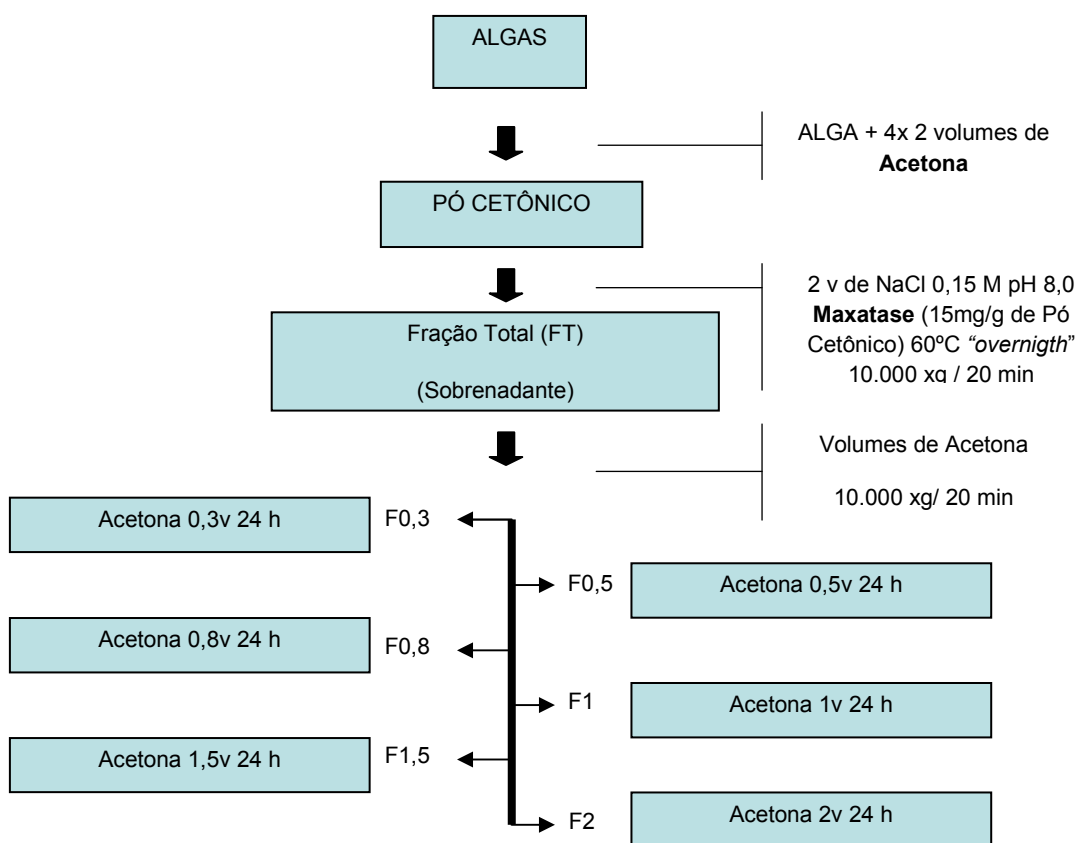


Figura 8: Esquema de extração e fracionamento de polissacarídeos sulfatados da alga *Lobophora variegata*.

As frações obtidas foram pesadas para realização do cálculo do rendimento. A fração de melhor rendimento e que apresentou quantidades significantes de açúcares e sulfato e pouca contaminação protéica foi utilizada

em todos os ensaios realizados e visou-se ao conhecimento do poder reacional *in vitro* e *in vivo* dos polissacarídeos sulfatados presentes em tal fração (F1).

3.4. Identificação, quantificação e caracterização de Componentes Moleculares

3.4.1. Açúcares totais

Açúcares totais foram determinados pelo método do fenol/ácido sulfúrico de acordo com Dubois e colaboradores (1956), empregando-se como padrão L-galactose, sendo as leituras realizadas a 490 nm.

3.4.2. Proteínas

O conteúdo de proteína foi determinado com o reagente Coomassie Blue segundo o método de Bradford (1976), o qual se baseia na ligação do corante Coomassie Brilliant Blue G-250 com moléculas de proteínas da amostra (SPECTOR, 1978) formando um complexo de cor azul. A leitura foi realizada a 595nm.

3.4.3. Sulfato

O teor de sulfato total foi determinado após hidrólise ácida (HCl 6 N, 6 h, 100°C) por turbidimetria pelo método da gelatina-bário (DODGSON & PRICE, 1962). O sulfato de sódio (1 mg/mL) foi utilizado para obtenção de uma curva padrão sendo submetido às mesmas condições da amostra em estudo.

3.4.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Os polímeros foram hidrolisados (HCL 2 N, 100 °C, 2 h) e a composição monossacarídica foi determinada utilizando-se um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de índice de refração, usou-se uma coluna LiChroCART® 250-4. Os açúcares glicose, galactose, arabinose, fucose, manose, ramnose e xilose foram utilizados como padrões de análise.

3.4.5. Eletroforese em gel de agarose

Aliquotas das frações (5 µg) foram aplicadas no gel de agarose 0.6% preparado com 0.05 M do tampão 1.3 diaminopropano acetato, pH 9.0 e submetidas a eletroforese a 10 V/cm por 60 minutos.. Os compostos foram fixados ao gel com 0.01% de N-cetyl-N-N-N-trimetilamonio brometo por 4 horas. O gel foi seco e corado com azul de toluidina 0,1%. Uma mistura padrão contendo condroitim sulfato (CS), dermatan sulfato (DS) e heparam sulfato (HS) foi usada para análise do perfil eletroforético.

3.4.6. Espectroscopia de Infravermelho

O Espectro de Infravermelho (FT-IR) foi realizado com um espectrômetro FT-IR modelo MB 104: ABB Bomem, Tokyo, Japão entre 4000 a 400 cm^{-1} . A amostra (5 mg) foi misturada com pastilhas de KBr (brometo de potássio) para análise.

3.4.7. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos em espectroscopia da marca BRUKER, modelo DRX 400, serie Avance. Empregaram-se tubos de 5 mm com as amostras dissolvidas em água deuterada (D_2O) a 99,75%, sendo as análises realizadas a temperatura de 60 °C. No anexo 1 está presente um quadro com deslocamentos químicos para os diferentes carbonos e hidrogênios de açúcares.

3.4.7.1. Técnica de RMN Monodimensional: RMN de ^{13}C

Os espectros de RMN de ^{13}C foram obtidos na frequência base de 100,61 MHz, com intervalo de aquisição de sinal de 0,6 segundos, sendo feitas, em media, de 30.000 – 70.000 aquisições, utilizando-se um intervalo de 0,1 segundo entre os pulsos. Os espectros de ^1H também foram obtidos e relacionados ao do ^{13}C .

3.4.7.2. Técnica de RMN Bidimensional: HMQC (*Heteronuclear Multiple Quantum Coherence*)

Esta técnica heteronuclear permite determinar quais átomos de hidrogênio estão ligados à quais átomos de carbono. No espectro é observada a correlação dos deslocamentos químicos de prótons e carbonos que dividem uma mesma ligação.

3.5. Atividades Antioxidantes

Para obtenção de dados que indicassem a capacidade de F1 em prevenir ou bloquear a transferência de elétrons de compostos redutores para substratos oxidantes foram realizados os seguintes ensaios:

3.5.1. Ensaio da Atividade Antioxidante Total

A atividade antioxidante total da fração F1 (n=3) foi realizada utilizando-se 1 mL de solução reagente, contendo molibdato de amônio (4 mM), ácido sulfúrico (600 mM) e fosfato de sódio (28 mM) e 0,1 mL da solução de amostra, à diferentes concentrações (0,039, 0,156, 0,312, 0,625, 1,25, 2,5, 5 e 10 mg/mL), em tubos de hemólise, em seguida foram fechados e incubados a 95 °C por 90 min. Após resfriamento a temperatura ambiente as atividades foram monitoradas espectrofotometricamente pela formação Mo^{+5} a partir de Mo^{+6} , formando Fosfomolibdênio que apresenta absorvância máxima em 695 nm (PRIETO *et al*,1999). Concentrações de ácido ascórbico (0,0125, 0,025, 0,05, 0,075, 0,1 e 0,25 mg/mL) foram usadas para obtenção de uma curva padrão. O resultado da atividade antioxidante total da fração F1 foi exposto como equivalentes em miligrama de ácido ascórbico.

3.5.2. Ensaio de Poder Redutor

O poder redutor da fração F1 (n=3) foi determinado pelo método de Yen e Chen (1995) com modificações (Yuan *et al.*,2005). Alíquotas de 1 mL, com diferentes concentrações de F1 (0,156, 0,312, 0,625, 1,25, 2,5 e 5 mg/mL), foram misturadas com 2,5 mL tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 6,6, e 2,5 mL de ferricianeto de potássio 1% (w/v). A mistura foi incubada a 50 °C por 20 min. Em seguida 2,5 mL de ácido tricloroacético 10% (w/v) foi adicionado à mistura, que foi então centrifugada a 1485 xg por 10 min. O sobrenadante (2,5 mL) foi

diluído com 2,5 mL de água destilada e acrescentou-se 0,5 mL de cloreto férrico (FeCl_3) 0,1% (w/v). Nesta reação, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ foi reduzida pela amostra, e $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ foi formado, que por sua vez reagiu com Fe^{+3} (do FeCl_3) dando origem ao azul da prússia, que apresenta absorvância máxima a 700 nm. Concentrações de ácido ascórbico (0,015, 0,031, 0,062, 0,125 e 0,25 mg/mL) foram usadas para obtenção de uma curva padrão. O resultado do poder redutora da fração F1 foi exposto como equivalentes em miligrama de ácido ascórbico.

3.5.3. Ensaio de Remoção do Radical Superóxido

Os radicais superóxidos (ZHOU & ZHENG, 1991; LIU et al, 1997) foram gerados (n=3) em 3 mL de tris-HCl (16mM, pH 8,0), contendo 78 μM de NADH, 50 μM de Nitroblue Tetrazolium (NBT), 10 μM de Fenazina Metasulfato e concentrações variadas de polissacarídeos (0,039, 0,078, 0,156, 0,625, 1,25, 2,5 e 4 mg/mL). A reação foi detectada por monitoramento da absorvância à 560 nm. O branco não possui NADH, sendo substituído pelo tris-HCl (ZHANG et al, 2003).

Inferimos a Taxa de Remoção (TR) de radicais superóxido, de acorde com LIU et al (1997), utilizando a seguinte equação,

$$\text{TR (\%)} = 1 - \frac{A_a}{A_c} \times 100$$

onde, A_a é a média das absorvâncias obtidas em leituras de concentração de amostra específica, A_c é a média das absorvâncias obtidas em leituras de meios de reação controle.

3.5.4. Ensaio de Remoção do Radical Hidroxil

O método colorimétrico da deoxirribose foi empregado (n=3) para determinar a atividade removedora de radicais hidroxil ($\bullet\text{OH}$). Foram usados: 200 μL de $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-KOH}$ (100 mM), 200 μL de deoxirribose (15 mM), 200 μL de FeCl_3 (500 mM), 100 μL de EDTA (1mM), 100 μL de ácido ascórbico (1 mM), 100 μL H_2O_2 (10mM) e 100 μL de amostra (0,025, 0,05, 0,1, 0,2, 0,25, 0,5, 1 e 2 mg/mL). A mistura foi incubada a 37°C por 1h. Após o período de incubação

foi adicionado 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 1% seguido da adição de 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 2,8%. A solução foi aquecida em banho-maria a 80°C por 20 min, desenvolvendo coloração rosa, característica da ligação do malondialdeído, produto de oxidação da deoxirribose com TBA. A determinação da absorbância foi realizada com comprimento de onda de 532 nm.

A Taxa de Remoção (TR) de radicais hidroxilas foi determinada pela seguinte fórmula:

$$TR (\%) = 1 - \frac{Aa}{Ac} \times 100$$

onde, Aa é a média das absorbâncias das leituras das concentrações da amostra e Ac é a média das absorbâncias das leituras do controle.

3.6. Avaliação Citotóxica da Fração F1

3.6.1. Isolamento das células mononucleares do sangue periférico

O sangue venoso humano (de doador voluntário do Departamento de Bioquímica, UFRN) foi coletado em presença de heparina e processado após a coleta. O sangue foi diluído com o mesmo volume de solução salina estéril, e então a ele foi adicionado *Phycoll isopaque* (HISTOPAQUE-1077) na proporção de 3 mL para cada 5 mL de sangue heparinizado. Essa mistura foi posteriormente submetida à centrifugação a 1450 xg por 30 minutos à temperatura de 25 °C. As células mononucleares do sangue periférico são aspiradas cuidadosamente e transferidas para um novo tubo, sendo as demais porções descartadas. É adicionado às células 20 mL do meio RPMI a 4 °C, essa suspensão foi centrifugada a 1400-1600 xg por 15 min a 4 °C, sendo esse procedimento repetido por duas vezes. Posteriormente, retirou-se o sobrenadante e adicionou-se ao precipitado 2 mL de RPMI. Uma alíquota de 10 µL dessa suspensão foi misturada a 40 µL de solução de Turck, possibilitando a visualização ao microscópio das células que foram contadas em câmara de Neubauer. Após a contagem das células uma alíquota da suspensão foi

retirada e a concentração foi ajustada com RPMI, de modo que a solução final possua 1×10^6 células/mL.

3.6.2. Tratamento das células com a fração F1

As células foram plaqueadas ($n=3$) em placas de 96 poços, contendo 1×10^6 células/mL/poço. Foi adicionado 100 μ L/poço da suspensão celular. As concentrações da fração F1 foram preparadas a partir de soluções estoques estéreis, sendo diluídas de forma seriada em meio RPMI-1640, obtendo-se o volume final de 100 μ L em cada poço, desta forma as concentrações finais foram de 0,5 e 1 mg/mL. As placas foram mantidas em atmosfera úmida a 5% de CO₂ na temperatura de 37 °C durante 24 horas. Após as 24 horas foi adicionado o corante MTT (10 μ L de MTT para cada 100 μ L de meio), devidamente dissolvido em tampão PBS a 5 mg/mL por 4 horas. As células vivas têm a propriedade de converter o MTT em um composto de coloração azul, denominado de formazan. Decorridas 4 horas para reação, foi adicionado isopropanol em cada poço, com o objetivo de solubilizar os cristais de formazan. As leituras foram realizadas em leitor de ELISA a 540nm (MOSMANN, 1983). A citotoxicidade foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Citotoxicidade (\%)} = \frac{\text{Absorbância do grupo experimental}}{\text{Absorbância do grupo controle}} \times 100$$

3.7. Análise dos parâmetros inflamatórios no modelo de artrite induzida por zymosan

3.7.1. Animais

Ratos Wistar de 3-4 meses (190-240 g) foram mantidos em gaiolas sob iluminação controlada (ciclo de 12 h luz/12 h escuro) a 22-23 °C, e foi fornecido alimento e água *ad libitum*. Cada grupo experimental incluiu 5 animais, nestes foram induzidos a inflamação articular (com exceção do grupo controle negativo), mimetizando a artrite reumatóide. Este trabalho obteve parecer Ético favorável, assim, foram tomadas todas as medidas de proteção para a indução

da artrite por zymosan. Todos os esforços foram empregados para minimizar o sofrimento dos animais e limitar o seu número necessário às investigações.

3.7.2. Indução da Artrite por Zymosan

A inflamação foi induzida com zymosan, o qual foi administrado na articulação do joelho direito de cada animal, efetuada após os animais terem sido anestesiados com 1 ml de cloridrato de xilasina (5 mg/kg) e cloridrato ketamina (10 mg/kg). O grupo controle negativo recebeu intra-articularmente 50 µL de solução salina a 0.9%, os demais grupos receberam 50 µL de zymosan a 20 µg/µL diluídos em salina 0,9% (ROCHA *et al.*, 2003). Depois de 1 hora de indução foi administrado intraperitonealmente (i.p.) salina a 0,9% nos controles negativos e positivos e F1 nas dosagens de 25, 50 e 75 mg/kg, diclofenaco de sódio na dose de 5 mg/kg, e L-NAME na dose de 25 mg/kg nos diferentes grupos.

Num primeiro experimento, após 6 horas da indução da artrite, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral 400 mg/kg i.p. e exsanguinados (para evitar a sufusão hemorrágica intra-articular). O líquido sinovial foi então coletado para análise do influxo celular e quantificação de óxido nítrico. Em um segundo experimento foi administrado i.p. a fração F1 nas diferentes dosagens (25, 50 e 75 mg/kg), diclofenaco de sódio 5 mg/kg e L-NAME 25 mg/kg, 1, 24, 48 e 72 horas depois da indução e com 96 horas (5° dia) os animais foram anestesiados com hidrato de cloral 400 mg/kg i.p., exsanguinados. Em todos os dias o edema foi mensurado e após os animais serem eutanasiados, a membrana sinovial foi retirada para análise histopatológica.

3.7.3. Coleta do Exudato e Membrana Sinoviais

No experimento de 6 horas as articulações foram lavadas duas vezes com 0,2 mL de salina com 10 mM de EDTA, e o exudato sinovial foi coletado para determinação do influxo celular em Câmara de Neubauer. Alíquotas foram centrifugadas ($1000 \times g \cdot 10 \text{ min}^{-1}$) (BEZERRA *et al.*, 2004) e o sobrenadante foi usado para determinar os teores de Nitrito/Nitrato. No experimento de 5 dias a membrana sinovial foi cirurgicamente excisada,

embebida em parafina e processada rotineiramente para coloração com hematoxilina e eosina (HE) e marcação imunohistoquímica para detecção de TNF- α .

3.7.4. Análise do Influxo Celular

O lavado articular foi obtido por aspiração da articulação usando fosfato de sódio como tampão (0.15 M e pH 7.4) e EDTA (0,01M). A contagem do número total de células foi feita em câmara de Neubauer utilizando 20 μ L do lavado diluídos em 400 μ L da solução de Turk.

3.7.5. Avaliação dos Teores de Nitrito do lavado articular

Após centrifugação do lavado articular à 1000 $\times g$. 10 min^{-1} , o sobrenadante foi usado para avaliação da produção de nitrito e nitrato, indicadores da síntese de NO, como previamente descrito (CUZZOCREA et al., 1998). Primeiramente, o nitrato do exudato foi reduzido a nitrito pela incubação com a enzima nitrato redutase (670 um/ml), na presença de NADPH (160 μM) à temperatura ambiente por 3 horas. Após esse tempo, a concentração de nitrito foi medida com o reagente de Griess, pela adição de 100 μ L desse reagente para 100 μ L da amostra. A densidade ótica à 540 nm foi medida usando-se um leitor de ELISA. As concentrações de nitrito foram calculadas comparando-se a densidade ótica das amostras com soluções padrão de nitrito de sódio preparado em solução salina (GRANGER *et al*, 1996).

3.7.6. Análise de Edema

A análise da espessura do joelho foi realizada com paquímetro. O primeiro mensuramento foi realizado imediatamente antes da indução da artrite, o segundo foi realizado imediatamente antes da administração de salina (controles) e dos compostos de tratamento (fração F1, diclofena de sódio e L-NAME). A avaliação do edema foi mensurada sempre a altura da patela, durante os 5 dias de experimento.

3.7.7. Determinação de TNF α sérico

Para a determinação de TNF- α sérico foi utilizado 0,1 ml de soro dos animais. Para isso, um Kit DB Pharmingen OptEIA baseado na identificação indireta do TNF- α por método de ELISA. Em placa de 96 poços foi adicionado em cada poço 100 μ L do anticorpo de captura. Incubada por “overnight” à 4°C. Aspirada, lavada 3 vezes com tampão de lavagem (PBS com 0,05% de Tween-20) e bloqueada com 200 μ L do diluente de ensaio (PBS com 10% de soro fetal bovino), incubada por 1 hora a temperatura ambiente. Aspirada e lavada 3 vezes. Foi adicionado 100 μ L da amostra ou substância padrão em cada poço, incubada por 2 horas a temperatura ambiente. Aspirada e lavada 5 vezes. Adicionou-se 100 μ L do detector de trabalho (anticorpo monoclonal anti-TNF α biotilado), a placa foi incubada por mais 1 hora a temperatura ambiente. Aspirada e lavada 7 vezes. Adicionou-se 100 μ L da solução substrato (tetrametilbenzidina e peróxido de hidrogênio) e incubada por 30 minutos a temperatura ambiente com ausência de luz. Por fim, adicionou-se 50 μ L de solução de parada (1 M H₃PO₄) e a leitura foi realizada a 450 nm.

3.7.8. Análise Histopatológica das Sinóvias

A membrana sinovial foi coletada e preservada em formaldeído 10%, seguindo-se do processamento por método de rotina até a inclusão em blocos de parafina, que foram subseqüentemente seccionados em micrótomo com navalhas de aço, obtendo-se tecido sinovial de 4 μ m visando a coloração hematoxilina-eosina (H&E) (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995) e colorações imunohistoquímicas para detecção de TNF- α com anticorpos anti-TNF- α (Kits da Santacruz biotecnologia, USA). Os cortes histológicos foram examinados ao microscópio óptico objetivando analisar a proliferação de tecido fibroso, o tecido adiposo, o infiltrado celular, integridade capsular e a expressão de TNF- α .

A análise das lâminas por H&E foi semi-quantitativa, avaliando-se em cada grupo experimental os seguintes parâmetros histopatológicos: infiltrado

celular, número de adipócitos, integridade capsular e tecido fibroso. A avaliação imunohistoquímica da expressão de TNF- α foi exposta também por escores, sendo atribuído um valor de escore para cada parâmetro analisado (Quadro 03) (DEL CARLO *et al*, 2007).

Quadro 3: Valores de escores para cada parâmetro utilizado na análise histopatológica das sinóvias

Escores	Parâmetros
0	ausente
1	presente com intensidade leve
2	presente com intensidade moderada
3	presente com intensidade acentuada

3.7.9. Imunohistoquímica para detecção de TNF- α

A imunohistoquímica foi realizada pelo método indireto (revelação do complexo antígeno-anticorpo). Anticorpo monoclonal primário anti-TNF- α (Santacruz biotecnologia, USA) e um kit de visualização contendo anticorpo monoclonal secundário conjugado à peroxidase e cromógeno (Envision, DAKO, USA) foram usados. Método de rotina até a inclusão em blocos de parafina foi realizado.

Os blocos foram cortados em micrótomo (American Optical ®, EUA), com espessura de 4 μ m. Os cortes foram desparafinados em xilol (três banhos com duração de cinco minutos cada) e reidratados em concentrações de álcoois decrescentes 100%, 90% e 70% (banhos com duração de cinco minutos cada) e água destilada (banho com duração de cinco minutos). Após banho em tampão fosfato (PBS), pH 7,4 (cinco minutos), a peroxidase endógena foi bloqueada com solução de peróxido de hidrogênio em metanol a 10% por 15 minutos. Após a retirada do excesso da solução de peróxido de hidrogênio em água corrente, foi feito novo banho de PBS (cinco minutos) com posterior inibição dos sítios antigênicos inespecíficos através da incubação das lâminas com soro de albumina bovina (PBS/ BSA 1%) (30 minutos) em câmara

úmida a temperatura ambiente. Após dois banhos de PBS por cinco minutos, foi feita incubação por 30 minutos em câmara úmida com anticorpo primário na temperatura ambiente, na proporção de 1:100 em uma solução de PBS/BSA a 1%. Após dois banhos de PBS por cinco minutos cada, todos os cortes foram incubados com o anticorpo secundário por 30 minutos em câmara úmida e a temperatura ambiente, na proporção de 1:100 em uma solução de PBS/BSA 1%. Em seguida, foram feitos dois banhos com PBS (cinco minutos cada) e incubação dos cortes com o cromógeno diaminobenzidina (DAB), de coloração azul-escura, por cinco minutos. O excesso de cromógeno foi retirado em água corrente. Após 30 segundos de hematoxilina para contraste (RESENDE *et al*, 2007).

3.7.10. Análises Estatísticas

Para análises estatísticas dos modelos experimentais foram utilizados os testes de análise de variância ANOVA com nível de significância de $p < 0,05$ e Teste de Tukey-Kramer, para determinar que grupos diferem entre os valores obtido para os grupos controle e experimental.

4. RESULTADOS

4.1. Rendimento e Análises Químicas

Após coleta, lavagem e secagem a 37°C sob corrente de ar constante, o material algal foi pesado obtendo-se 40 g de alga seca. Após fracionamento da fração total de *L. variegata* em volumes crescentes de acetona foi obtido 6 frações (F0,3, F0,5, F0,8, F1, F1,5 e F2), as quais apresentaram diferentes rendimentos, considerado um requisito importante para sua utilização em modelos experimentais (Figura 9). Estas frações também apresentaram diferenças quanto aos teores de proteína, grau de sulfatação e açúcares totais (Tabela 1).

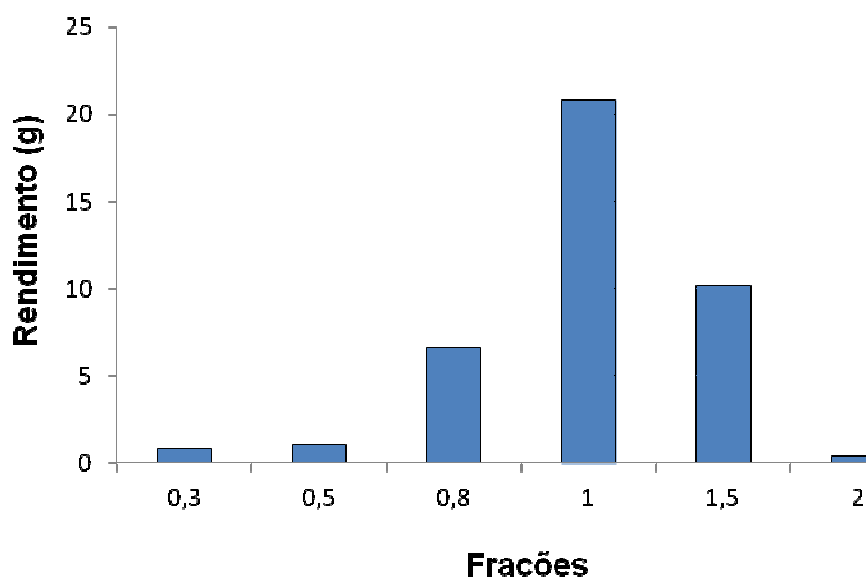


Figura 9: Rendimento das frações polissacarídicas de *L. variegata* após precipitação em diferentes volumes de acetona.

As frações F0,3, F0,5 e F1,5 apresentaram maior quantidade de elementos protéicos. A fração F2 apresentou menor rendimento, além de menor sulfatação. A fração F0,8 apresentou quantidade de açúcares semelhantes a fração F1, também apresentando altos níveis de sulfato, no entanto demonstrou possuir maior quantidade de proteínas que a fração F1. A fração de melhor rendimento (F1) foi analisada quanto a sua polidispersão em

eletroforese em gel de agarose frente à fração de maior sulfatação (F0,5) e as frações menos sulfatadas (F1,5 e F2), também foi utilizada a fração total e a mistura padrão de dermatan sulfato, heparam sulfato e condritin sulfato. As frações apresentaram migrações diferenciadas no sistema eletroforético (Figura 10).

Tabela 1: Rendimento e percentuais de proteínas, açúcares e sulfato nas frações obtidas de *L. variegata* por meio de precipitação diferencial com acetona.

Fração	Rendimento (%)	Proteínas (%)	Açúcares (%)	Sulfato (%)
FT	-	0,13 ± 0,02	41,4 ± 0,63	21,5 ± 3,4
F0,3	2,1	0,2 ± 0,03	26,2 ± 0,09	26,4 ± 1,8
F0,5	2,7	0,42 ± 0,09	29,4 ± 0,09	36,6 ± 2,5
F0,8	16,5	0,18 ± 0,06	44,5 ± 0,12	29,5 ± 2,3
F1	51,9	0,12 ± 0,08	46,6 ± 0,36	22,7 ± 2,1
F1,5	25,3	0,23 ± 0,02	52,6 ± 0,09	17,1 ± 2,6
F2	1	0,15 ± 0,04	40,8 ± 0,18	13,2 ± 1,6

A fração F1 apresentou migração eletroforética com polidispersividade metacromática no corante azul de toluidina e pequena contaminação protéica quando comparada com as demais frações. Também demonstrou possuir altos teores de açúcar (46,6 %) e sulfato (22,7%). A figura abaixo (Figura 10) ilustra o resultado da eletroforese em gel de agarose das frações total, 0,5, 1, 1,5 e 2 e da mistura (M) padrão.

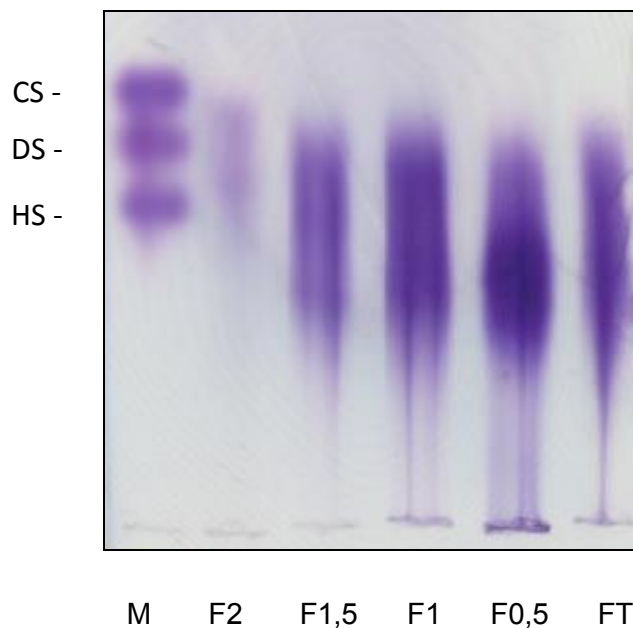


Figura 10: Eletroforese em tampão diaminopropano acetato de frações polissacarídicas obtidas por precipitação com acetona. 5 μ g das frações foram aplicadas em gel de agarose e submetidas a eletroforese a 10 V/cm por 60 minutos. M é a mistura de dermatam, heperam e condroitin.

A fração F1 foi então escolhida para melhor caracterização quanto a seus componentes moleculares e estruturais.

4.2. Identificação dos componentes moleculares da fração F1

O hidrolisado de F1 (10 mg/mL) foi submetido a caracterização de seus açúcares constituintes por HPLC. Os teores de açúcares foram expressos em razão molar (Tabela 2). Os resultados demonstraram que os polissacarídeos fracionados continham principalmente fucose, galactose e glucose. Outros trabalhos já haviam encontrado quantidades vestigiais de ácido glucurônico, resultado este semelhante ao observado no sistema de solvente butanol:piridina:água (5:10:5) e ácido isobutírico:amônia (5:3) (MEDEIROS *et al*, 2008; QUEROZ *et al*, 2006).

Tabela 2 : Relação molar de açúcares encontrados na fração F1

Relação Molar		
Fuc	Gal	Glu
1	1,4	1,9

4.3. Espectroscopia de Infravermelho da fração F1 da alga

Analisando-se a Figura 11, observa-se que estão destacadas as bandas entre 3734 e 3671 cm^{-1} com um alargamento na intensidade, característica da deformação axial do O–H, correspondente à ligação de hidrogênio intermolecular e intramolecular. A banda em 2885 cm^{-1} é atribuída à deformação axial da ligação C–H para carbonos secundários (–CH₂–) e primários (–CH₃), já a banda 1417 cm^{-1} é atribuída à deformação angular C–H. A presença de sulfato pode ser observada pela deformação a 1239 cm^{-1} e 850 cm^{-1} . A banda 1057 cm^{-1} é característica de ligações C – O – C.

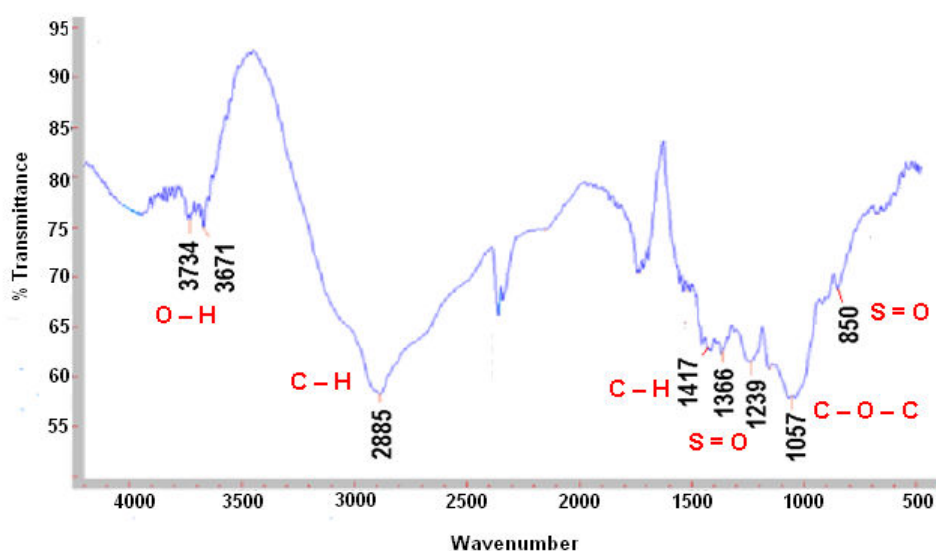


Figura 11: Espectro de Infravermelho de componentes da fração F1 de *L. variegata*.

4.4. Ressonância Magnética Nuclear da fração F1.

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear de acordo com a literatura corresponde a vibrações dos átomos em estudo. Aqui foram estudados os átomos de hidrogênios (Figura 12) e carbonos (Figura 13) de açúcares. A mudança na posição de alguns sinais de ^{13}C , diminuição da blindagem, são atribuídas a presença de grupos sulfato no polímero. O espectro bidimensional de ^1H - ^{13}C da F1 de *L. variegata* confirma os sinais sugeridos por ^1H e ^{13}C para sinais anoméricos (Figura 14).

4.4.1. Espectro de RMN de ^1H .

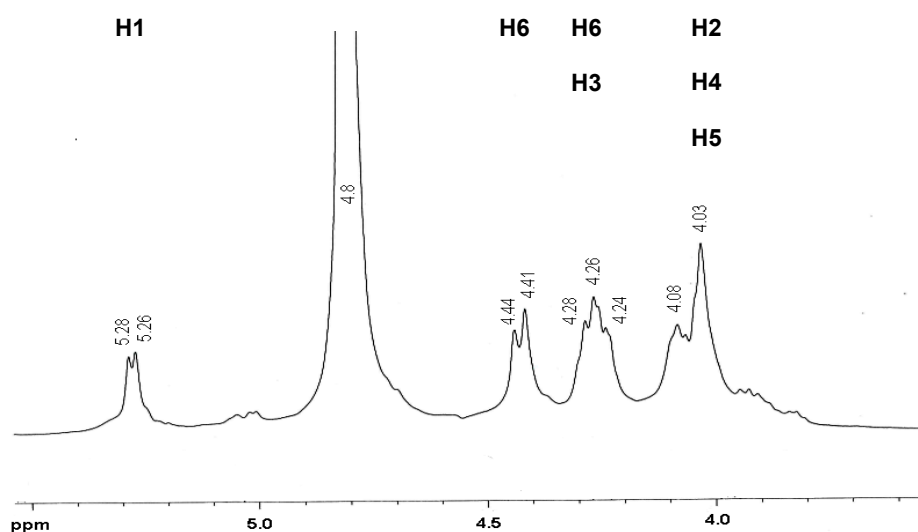


Figura 12: Espectro de ^1H da RMN de Fração 1 de *L. variegata*.

O espectro de ^1H da RMN de fração F1 de *L. variegata* (Figura 12) demonstrou a presença de sinais na região de 5,28 ppm e 5,26 ppm, correspondentes a hidrogênios ligados a carbonos anoméricos relacionados à galactose e a fucose, respectivamente. Podemos afirmar que os espectros de ^1H são complexos e sobreponíveis para fucanas (Mulloy *et al.*, 1994). Os sinais observados entre 4,44-4,41 ppm são atribuídos a H de C6 (ligado), sinais entre 4,28-4,24 ppm são atribuídos a H de C3 e C6 (livre) e os sinais entre 4,08-4,03

ppm são atribuídos a H de C2, C4 e C5. Os sinais entre 5-5,5 ppm são consistente com unidades α -L- fucopiranosil. É possível que purificações adicionais alterem o espectro. O aumento de intensidade a 4,03 é um indicativo de resíduos de fucoses sulfatadas em H4/H2.

4.4.2. Espectro de RMN de ^{13}C .

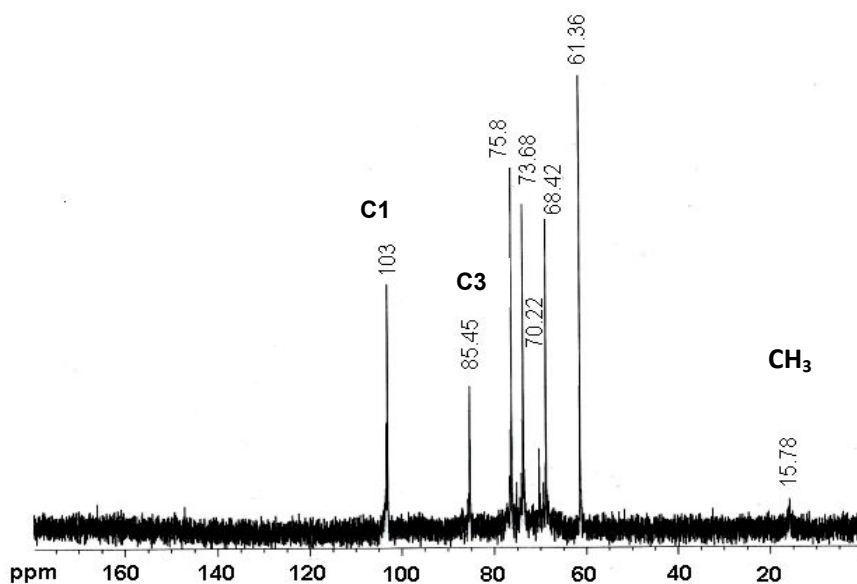


Figura 13: Espectro de ^{13}C da RMN de Fração 1 de *L. variegata*.

No espectro de ^{13}C observa-se alguns sinais em 103 a 104 ppm atribuídos a carbonos anoméricos. Um pequeno sinal observado a 22 ppm é indicativo da presença de acetato no polímero. Um sinal a 61,36 ppm é indicativo de galactose. A análise dos monossacarídeos componentes realizados por diversos métodos indicam somente a presença de galactose, fucose e glicose. O sinal a 85,45 ppm é atribuído ao C3. Os sinais dos carbonos anoméricos (C1) e do C3 são característicos de ligação do tipo β -(1 \rightarrow 3) (MULLOY *et al*, 1994). A presença de fucose no polímero é atribuída a presença do sinal 15.78 ppm. Este sinal é relacionado a presença de CH_3 . Uma correlação entre a configuração e valor da ressonância pode ser observado pelos sinais. Os valores de metil para a configuração axial ocorrem em 15.0-18.0 ppm (DUARTE *et al*,2001).

4.4.3. Espectro bidimensional de RMN de ^1H -- ^{13}C

O HMQC confirma os sinais sugeridos por ^1H e ^{13}C dos sinais anoméricos do polímero. Através da análise deste espectro podemos observar uma correlação dentre os prótons e carbonos anoméricos (103/5,28 e 103/5,26 ppm). Este espectro demonstra a simplicidade do polímero em termos de unidades de açúcares (Figura 14).

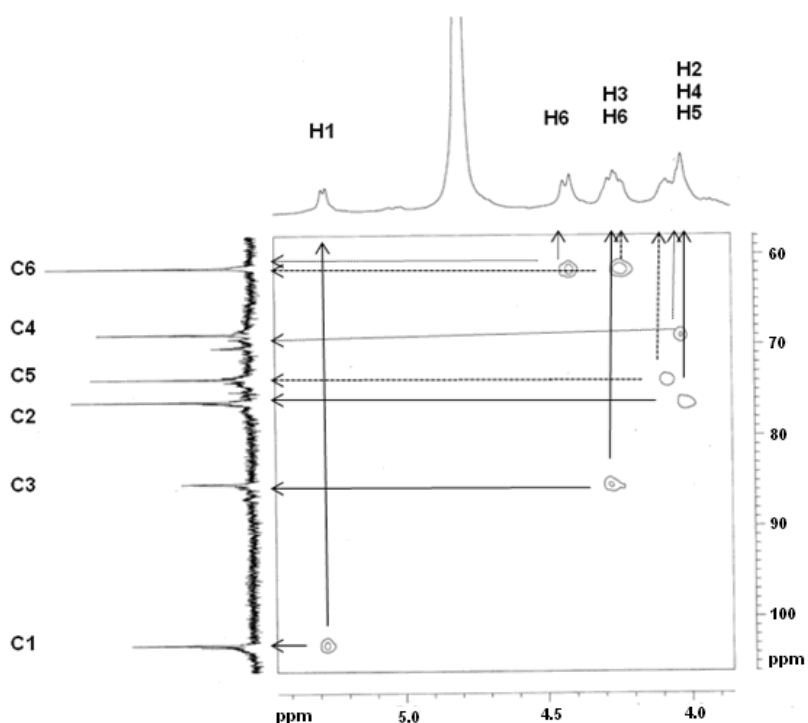


Figura 14: Espectro bidimensional de RMN de ^1H -- ^{13}C da Fração 1 de *L. variegata*.

4.5. Atividades Antioxidantes

Diversos estudos têm demonstrado a estreita relação entre os radicais livres com doenças inflamatórias, e, compostos com atividade antioxidante são amplamente estudados. Assim, um dos objetivos deste trabalho avaliar o potencial antioxidante da fração F1 da alga parda *Lobophora variegata* na remoção de radicais livres.

4.5.1. Atividade Antioxidante Total

A fração F1 apresentou atividade antioxidante total (Figura 15) frente ao molibdato de amônia. Foi utilizado um intervalo de concentração de F1 entre 0,039 à 10 mg/mL, onde observou-se um máximo da atividade a partir de 5 mg/mL. A atividade antioxidante do ácido ascórbico foi obtida e comparada à atividade da fração F1 de *Lobophora variegata*.

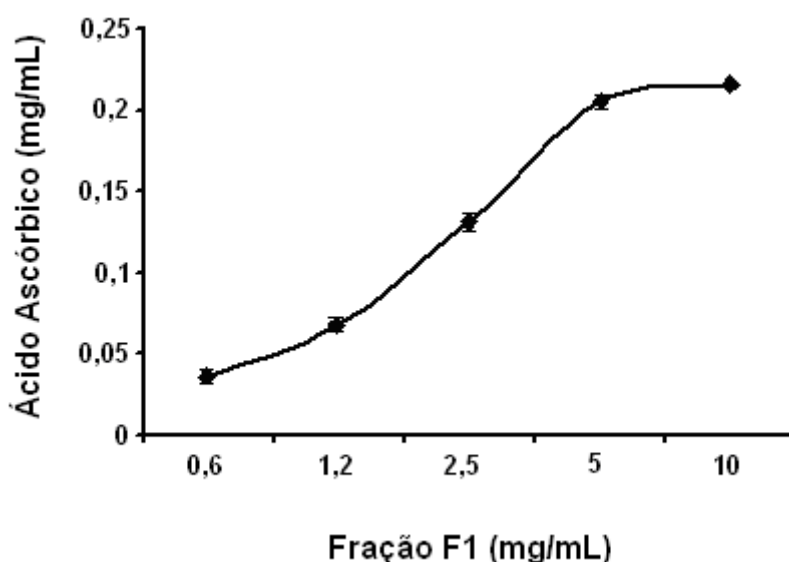


Figura 15: Atividade Antioxidante Total. O gráfico expressa a equivalência em miligramas da atividade antioxidante da fração F1 em relação ao Ácido Ascórbico.

A atividade redutora do ácido ascórbico atingiu um platô a partir de 0,250 mg/mL. Ao compararmos a atividade (absorbância) de 5 mg/mL da fração F1 com a máxima atividade do ácido ascórbico à 0,25 mg/mL, verificou-se uma taxa de redução de 75% em relação a esse redutor padrão. A concentração eficiente da fração F1 para inibir em 50% a atividade oxidante do sistema (EC_{50}), tendo por referência a atividade do ácido ascórbico, foi calculada em 2 mg/mL.

4.5.2. Poder Redutor

O poder redutor da fração F1 foi determinado pelo método de Yen e Chen (1995) com modificações (Yuan *et al.*, 2005). A redução de Fe^{+3} para Fe^{+2} implica na formação do complexo azul da prússia com conseqüente aumento da absorbância (KEHRER, 2000). Assim, uma alta absorbância da mistura de reação indica um alto poder redutor. A atividade redutora da fração F1 (Figura 16) foi comparada, em termos de equivalência massa/massa, a atividade do ácido ascórbico.

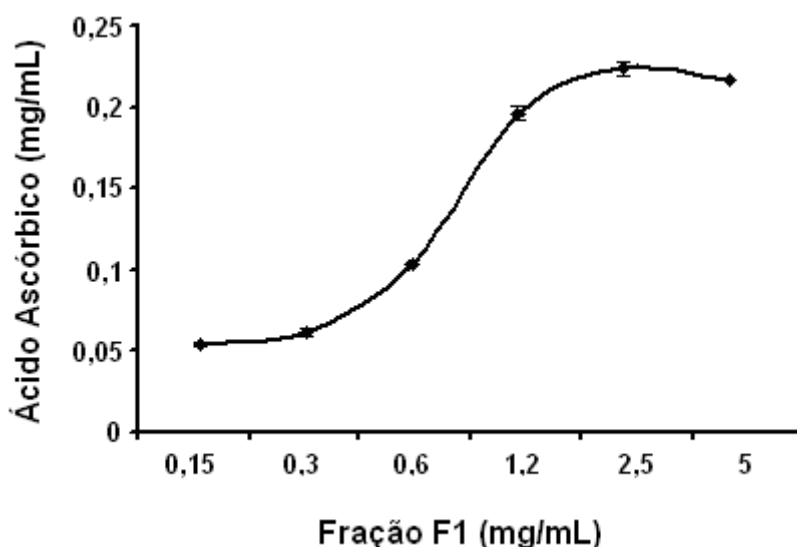


Figura 16: Ensaio do Poder redutor. O gráfico expressa a equivalência em miligramas do poder redutor da fração F1 em relação ao Ácido Ascórbico.

A máxima atividade redutora de F1 (2,5 mg/mL) foi comparada a máxima atividade do ácido ascórbico (0,25 mg/mL). Assim, a fração F1 na concentração de 2,5 mg/mL apresentou uma taxa de redução de 85,7%. O EC_{50} calculado, em relação ao ácido ascórbico, foi de 0,675 mg/mL. A concentração deste polímero variou de 0,156 a 2,5 mg/mL. Com aumento da concentração (0,156-2,5 mg/mL) houve aumento da absorbância (700 nm) de 0,57 para 0,83 demonstrando um poder redutor em uma relação dose-dependência até a concentração de 2,5 mg/mL. Propriedades redutoras estão geralmente associadas com a presença de compostos redutores e tem sido mostrado que

a presença de agentes redutores inibe a cadeia de radicais livres por meio da doação de hidrogênios (GORDON, 1990).

4.5.3. Remoção do Radical Superóxido

O radical superóxido foi produzido em um sistema fenazina metassulfato /NADH com redução do NBT. A Figura 17 mostra o percentual de inibição dos radicais superóxido em concentrações variadas de F1 (0,078 - 4 mg/mL). Observamos um percentual máximo 94% de inibição destes radicais a 2,5 mg/mL da fração F1, com EC_{50} de 0,3 mg/mL. Embora o radical superóxido tenha fraca ação oxidante, vale ressaltar a sua conversão em radicais hidroxilas tem um vasto efeito deletério sobre os sistemas vivos (FILIPPIN *et al*, 2008).

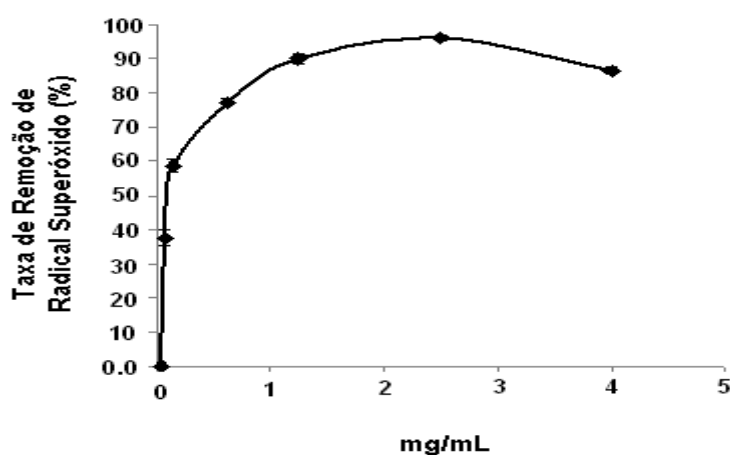


Figura 17: Curva de atividade antioxidante de *L. variegata* em sistema gerador de radicais superóxido com diferentes concentrações da Fração 1 polissacarídica (0,078 - 4 mg/mL).

4.5.4. Remoção dos Radicais Hidroxil

No sistema gerador de radicais hidroxil foi visto que a fração 1 (0,025 - 2 mg/mL) exibiu alta inibição da oxidação da deoxirribose (Figura 18). Os polissacarídeos tiveram um alto efeito sobre a remoção destes radicais. Os dados mostraram que F1 apresentou atividade inibitória do radical hidroxil em cerca de 98% quando empregado a concentração de 1 mg/mL. O EC_{50} para esse sistema foi de 0,12 mg/mL.

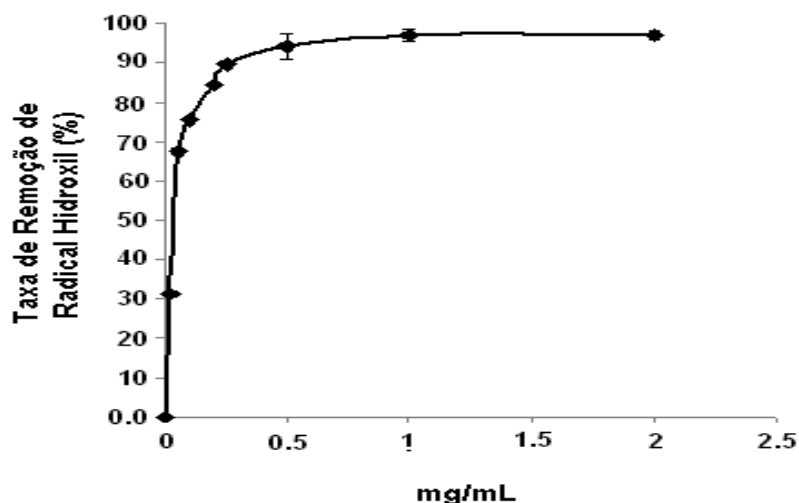


Figura 18: Atividade inibitória da formação de radicais hidroxil com emprego de F1 em diferentes concentrações (0,025 - 2 mg/mL).

4.6. Avaliação da atividade citotóxica da Fração F1

A formação de formasan, composto de coloração azulada, por células vivas pôde ser detectada após 24 horas de incubação das células com a fração F1 (0,5 e 1 mg/mL). O ensaio de citotoxicidade revelou que os componentes da fração F1 (0,5 e 1 mg/mL) (Figura 19) não apresentaram diferenças estatísticas significantes ($p > 0,05$) quando comparadas ao ensaio controle, não demonstrando capacidade citotóxica frente a leucócitos sanguíneos.

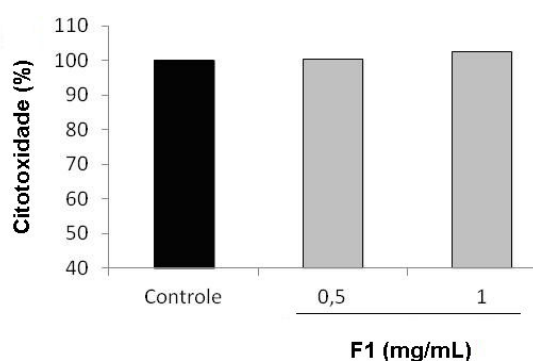


Figura 19: Ensaio de avaliação citotóxica da Fração F1 (0,5 e 1 mg/mL) de *Lobophora variegata*.

4.7. Ensaios com Animais

A fração 1 de *Lobophora* foi utilizada em todos os ensaios *in vivo*. Para fins comparativos do efeito desse polissacarídeo, a concentração de melhor efeito sobre o influxo celular e a quantidade de nitrato/nitrito no lavado articular, bem como sobre o edema, foi comparada com anti-inflamatório não esteroideal (AINES), o diclofenaco de sódio.

4.7.1. Análise do influxo leucocitário no lavado articular de ratos 6 h após injeção intra-articular de zymosan (Zy)

A injeção intra-articular de zymosan (Zy) (1 mg/50 µL de solução salina) no joelho direito de ratos produziu aumento significativo ($p < 0,001$) no número de leucócitos no lavado articular, em relação ao grupo que recebeu apenas solução salina (S) (Figura 20), sendo os maiores valores observados entre a 3^a e 6^a hora da AZy. A contagem de leucócitos totais foi máxima na 6^a hora da AZy (XAVIER, 2005).

4.7.2. Efeito de F1, Diclofenaco de sódio e L-NAME sobre o influxo de leucócitos no lavado articular de ratos submetidos à indução da artrite por Zy

As dosagens de 25, 50 e 75 mg/kg da fração F1 produziram reduções significantes com $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente, no número de leucócitos totais no lavado articular, em relação ao grupo de animais controle positivo (Zy, tratados com salina), conforme mostra a Figura 20.

Foi utilizado o pós-teste de Tukey-Kramer para as análises de comparação entre os diferentes grupos. Observou-se que a redução no número de leucócitos entre os grupos de F1 (25, 50 e 75 mg/Kg) foi extremamente significativa (entre $p < 0,01$ e $p < 0,001$). A análise dos dados revelou que o grupo tratado com o F1 de 75 mg/Kg apresentou o melhor efeito (96,7% de diminuição do influxo), quando comparado aos grupos tratados com F1 25 mg/Kg (52,1%) e F1 50 mg/kg (83,5%), no influxo de leucócitos no lavado articular de ratos.

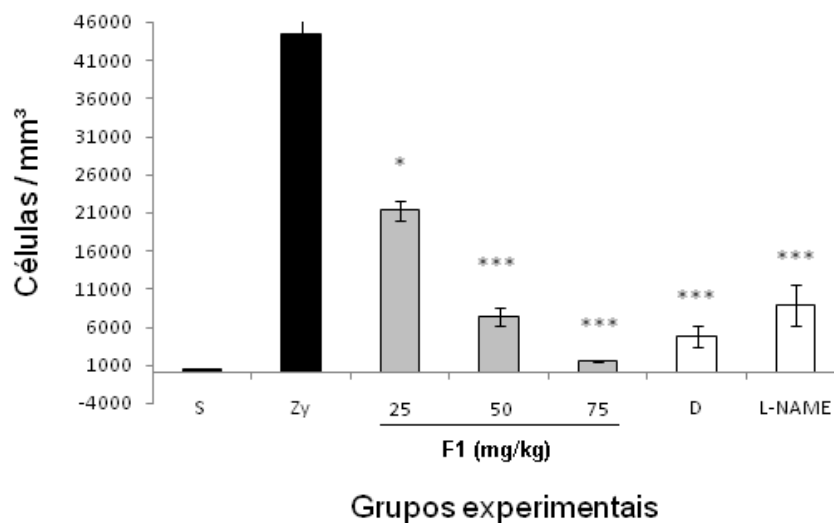


Figura 20: Infiltrado celular presente no lavado articular de ratos após a indução da artrite por zymosan. S, grupo controle negativo. Zy, grupo controle positivo. F1, grupos tratados com diferentes doses de F1 (25, 50 e 75 mg/kg). D, grupo tratados com Diclofenaco na dose de 5 mg/kg. L-NAME, grupo tratado na dose de 25 mg/kg desse composto. * = $p < 0,05$ e *** = $p < 0,001$, em relação ao grupo zymosan.

O efeito do diclofenaco de sódio (25 mg/Kg) e de F1 (50 mg/Kg) sobre o influxo de leucócitos no lavado articular de ratos 6 horas após a indução da artrite por zymosan (AZy) está mostrado na Figura 20. A administração de Zy (1 mg/50 μ L de solução salina) na cavidade articular dos ratos provocou aumento no número de leucócitos que foi máxima na 6^a hora (44426 células/mm³), como descrito anteriormente. O pós-tratamento com diclofenaco de sódio e L-NAME reduziu, em 89,3 e 80,1% respectivamente, o influxo de leucócitos no lavado articular. Esses grupos produziram redução extremamente significativa ($p < 0,001$) no número de leucócitos no lavado articular, em relação ao grupo de animais que recebeu apenas o zymosan (Zy).

Após a aplicação do teste de Tukey-Kramer, observou-se que a redução no número de leucócitos para o grupo do diclofenaco (5 mg/Kg) não foi significativa quando comparado ao grupo F1 (50 mg/Kg). A análise dos dados mostra que o grupo tratado com F1 (50 mg/Kg) apresentou efeito inibitório no influxo celular (83,5%) semelhante ao grupo tratado com diclofenaco de sódio (89,3%).

4.7.3. Efeito do zymosan na formação de nitrito no lavado articular de ratos submetidos à indução da artrite por Zy

A injeção intra-articular de zymosan (1 mg/50 μ L) de solução salina) promoveu formação significativa ($p < 0,001$) de nitrito, identificado pelo reagente de Griess, quando comparado ao grupo que recebeu apenas salina intra-articular (S) (Figura 21). Os maiores níveis de nitrito têm sido observados na 3^a e 6^a hora a partir da indução (XAVIER, 2005). Neste trabalho foi realizado quantificação dos teores de nitrito do lavado articular de animais submetidos à inflamação por 6 horas.

4.7.4. Efeito do pós-tratamento com F1, Diclofenaco de sódio e L-NAME sobre a produção de nitrito/nitrato no lavado articular de ratos submetidos a indução da artrite por Zy

O pós-tratamento com F1 (25, 50, 75 mg/Kg) (Figura 21) reduziu de forma significativa ($p < 0,001$) a produção de nitrito no lavado articular após a 6^a hora de AZy, quando comparado com o grupo que recebeu apenas zymosan intra-articular. A análise dos dados mostrou que o grupo tratado com a fração F1 na dosagem de 50 mg/Kg apresentou melhor resposta (39%) quando comparado aos grupos tratados com 25 mg/Kg (27,2%) e 75 mg/Kg (33,1%). O pós-tratamento com a fração F1 reduziu de forma dose não-dependente a produção de nitrito no lavado articular.

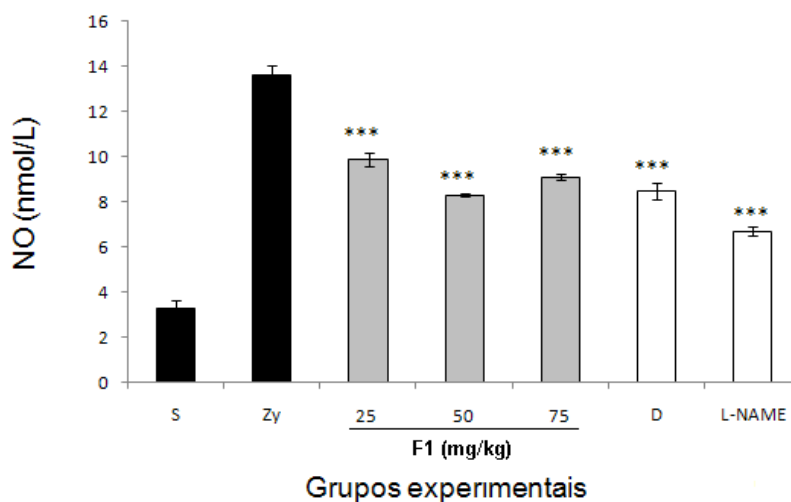


Figura 21: Níveis de nitrito presente no lavado articular de ratos após a indução da artrite por zymosan. S, grupo controle negativo. Zy, grupo controle positivo. F1, grupos tratados com diferentes doses de F1 (25, 50 e 75 mg/kg). D, grupo tratados com Diclofenaco na dose de 5 mg/kg. L-NAME, grupo tratado na dose de 25 mg/kg desse composto. *** = $p < 0,001$, em relação ao grupo zymosan.

O pós-tratamento com diclofenaco de sódio e L-NAME reduziu a produção de nitrito no lavado articular após a 6^a hora de AZy em 37,5% e 50,7%, respectivamente. A Figura 21 mostra que esses grupos tratados produziram redução significativa ($p < 0,001$), em relação ao grupo de animais que recebeu apenas o zymosan (Zy).

Após a aplicação do teste de Tukey-Kramer, observou-se que a redução na produção de nitrito no lavado articular para o grupo que recebeu diclofenaco de sódio (5 mg/Kg) não foi significativa ($p > 0,05$) quando comparado aos grupos de F1 (50 mg/Kg). A análise dos dados mostra que o grupo tratado com a fração F1 na dose de 50 mg/Kg e diclofenaco de sódio na dose de 5 mg/kg apresentaram respostas semelhantes (39% e 37,5%) em relação à redução na produção de nitrito no lavado articular de ratos após AZy.

4.7.5. Análise do edema articular

A avaliação do extravasamento de componentes sanguíneos para a região periarticular, o que resulta no edema, foi realizada por mensuração paquimétrico do joelho dos animais. Imediatamente antes da indução por zymosan realizou-se a primeira medição, em seguida as medições foram realizadas 1, 24, 48, 72 e 96 horas após indução. Animais do grupo controle negativo (salina i.a.) apresentaram um decurso constante quanto à espessura do joelho. O grupo positivo (Zy 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ i.a.) apresentou diferença estatística com $p < 0,001$ entre 1 e 96 h após indução e $p < 0,05$ no último dia (Figura 22A).

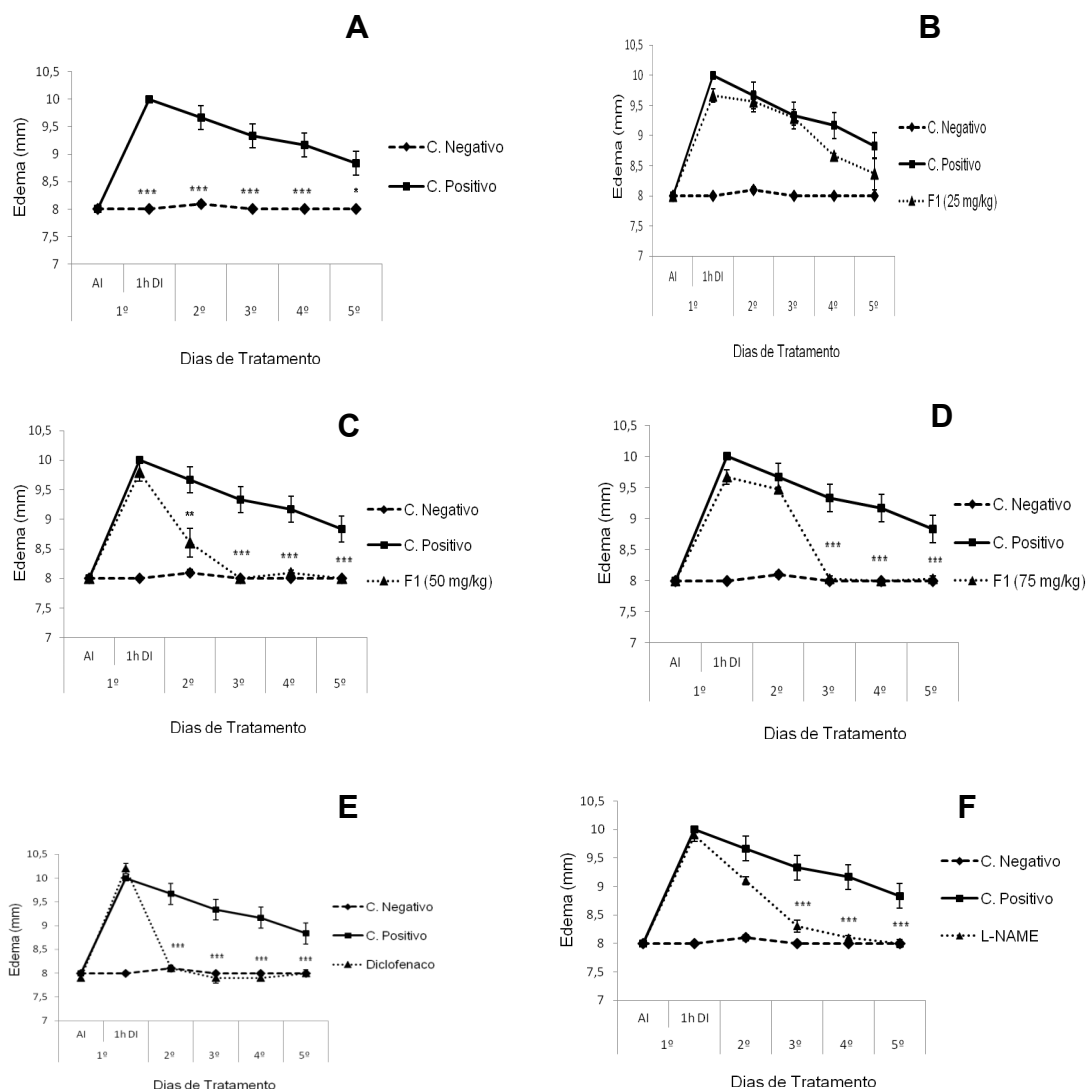


Figura 22: Avaliação de edema de Joelho de ratos Wistar. A, submetidos (controle positivo) e não submetidos (controle negativo) a indução da artrite. B, atividade anti-edematosa da fração F1 na dose de 25 mg/kg. C, atividade anti-edematosa da fração F1 na dose de 50 mg/kg. D, atividade anti-edematosa da fração F1 na dose de 75 mg/kg. E, atividade anti-edematosa do diclofenaco de sódio na dose de 5 mg/kg. F, atividade anti-edematosa do L-NAME na dose de 25 mg/kg. AI = antes da Indução, 1h DI = 1 hora depois da indução. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ e *** = $p < 0,001$ em relação ao grupo controle positivo.

O grupo tratado com F1 25 mg/kg não demonstrou ser eficaz em diminuir o edema (Figura 22B), já as concentrações de 50 e 75 mg/kg de F1 reduziram o edema no 2º e 3º dias de tratamento, com significância de $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente (Figura 22C e 22D).

O tratamento com dose de 50 mg/kg de polissacarídeo de *Lobophora variegata* reduziu o edema articular em 24 horas após indução com

significância de $p < 0,001$ quando comparado com a média do edema do grupo controle positivo após as mesmas 24 horas de indução. Apresentou semelhança com o grupo de animais tratados com diclofenaco de sódio 5 mg/kg (Figura 22E). Quando comparado com o edema de 1 hora após indução, o grupo F1 50 mg/kg diminuiu o sinal inflamatório em 63,4% na 24^o hora e 94,5-100% após 48^o horas, permanecendo assim até o final do experimento (5^o dia).

O grupo F1 75 mg/kg teve efeito efetivo a partir da 48^oh de experimento, assemelhando-se ao grupo tratado com L-NAME (Figura 22F) apresentando diminuição do edema no 3^o dia de tratamento com $p < 0,001$. Quando comparado com o edema de 1 hora após indução, o grupo F1 75 diminuiu o sinal inflamatório em 11,8% na 24^o hora e 100% após a 48^o hora, permanecendo assim até o final do experimento.

Devido o grupo F1 50 mg/kg ter apresentado melhores resultados quanto a diminuição de nitrito e redução do edema articular, o sangue desses animais foi submetido a pesquisa de TNF- α por método de ELISA. As membranas sinoviais também foram coletadas e processadas para fins histopatológicos por métodos de hematoxilina e eosina (H&E) e imunohistoquímica para pesquisa de TNF- α .

4.7.6. Avaliação de TNF- α sérico por método de ELISA

A expressão da citocina TNF- α foi determinada indiretamente a partir de amostras de sangue dos animais dos diferentes grupos experimentais pelo método de ELISA. A determinação da quantidade de TNF- α sérico foi obtida a partir de inferência da equação da curva padrão de TNF- α recombinante do Kit de ELISA DB.

TNF- α sérico dos grupos negativo, positivo (Figura 23A), tratados com a fração F1 na dose de 50 mg/kg (Figura 23B), tratados diclofenaco 5 mg/kg (Figura 23C) e tratados L-NAME 5 mg/kg (Figura 23D) foi avaliado e está expresso em unidades de absorvância versus dias de tratamento. A comparação entre os grupos controle negativo e grupo controle positivo demonstrou diferença estatística com significância de $p < 0,001$ no 5^o dia de

experimento. Observa-se uma ligeira queda dos níveis de TNF- α no grupo tratado com F1, com significância de $p < 0,001$ no 5º dia de experimento, demonstrando sua ação imunomoduladora (Figura 23B).

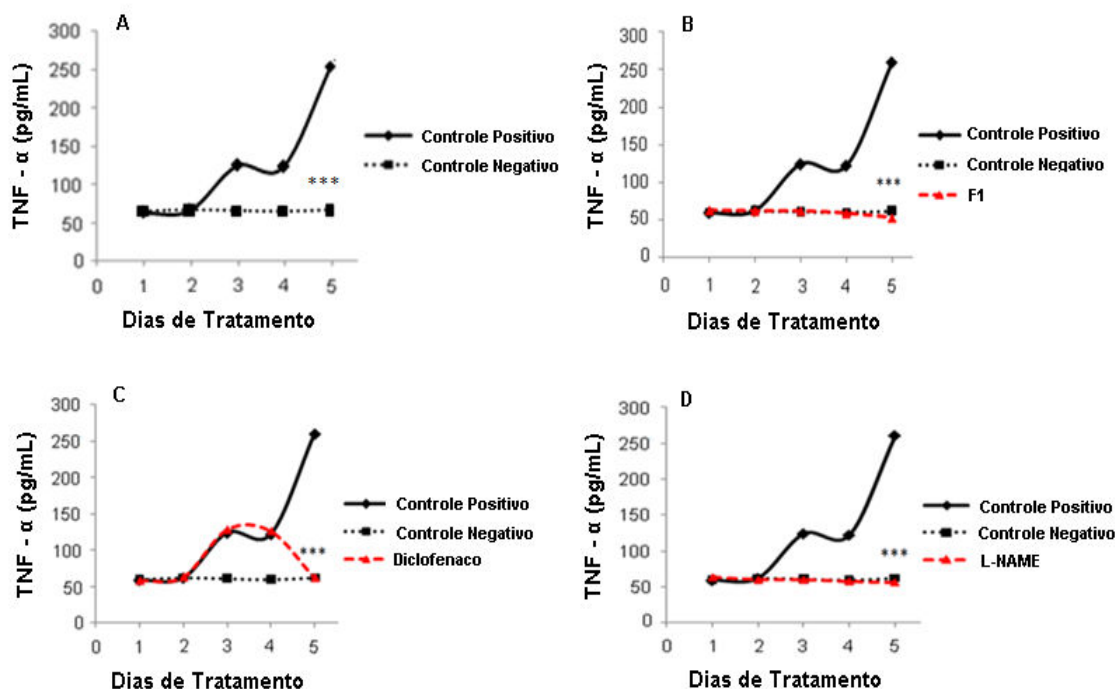


Figura 23: Representação da concentração de TNF- α sérico. **A**, representa animais dos grupos controle negativo e positivo. **B**, controles e grupo tratado com a fração F1 na dose de 50 mg/kg. **C**, controles e grupo tratado com diclofenaco de sódio na dose de 5 mg/kg. **D**, controles e grupo tratado com L-NAME na dose de 25 mg/kg. *** = $P < 0,001$ em relação ao grupo controle positivo.

Na Figura 23C, quando administrado o diclofenaco de sódio, houve aumento, sem significância estatística, da citocina. diminuindo no 4º e principalmente no 5º dia, este último com significância de $p < 0,001$. A inibição desta citocina pro-inflamatória quando se utilizou L-NAME, um inibidor da NO sintase, demonstrou efeito significativo a partir do 4º dia (Figura 23D). A diferença entre a quantidade de TNF- α do 5º dia do controle positivo e o 5º dia dos demais grupos demonstrou diminuição significativa com $p < 0,001$.

4.7.7. Histopatologia das sinóvias

As análises histopatológicas foram realizadas de acordo com as alterações inflamatórias comumente observadas na sinovite reumatóide (Harris, 1993) com métodos de coloração por H&E e imunohistoquímica pra TNF- α .

4.7.8. Coloração por Hematoxilina e Eosina (H&E)

Para verificar o efeito da F1 de *Lobophora variegata* sobre parâmetros histopatológicos foram realizadas análises das membranas sinoviais de ratos Wistar submetidos a 5 dias de experimento contra inflamação articular induzido por zymosan e coradas pelo método de H&E. Na análise do controle negativo (membranas sinoviais de animais que receberam somente salina intraarticular e foram tratados com 1 mL de salina) verificou-se a presença de grande quantidade de células armazenadoras de lipídeos (adipócitos) (escore 3), capsula sinovial normal (1-4 camadas de células e sem vilosidades) (escore 3), pouco tecido fibroso entre os adipócitos (escore 1) e nenhum elemento que identifique reação imune de caráter crônico, como células gigantes (escore 0) (Figura 24A). No controle positivo (animais submetidos a indução da inflamação por zymosan e tratados com 1 mL de salina) foi verificado pouco ou nenhum adipócito (escore 0), capsula sinovial anormal (escore 3), grande quantidade de tecido fibroso (escore 3) e elementos que caracterizam reação do sistema imunológico local, como infiltrado celular (escore 3) e células gigantes (não mostrado) (escore 1) (Figuras 24B). Na Figura 24C observa-se a membrana sinovial de animais submetidos a indução do processo inflamatório por zymosan e tratados com F1 50 mg/kg, observado uma diminuição de achados de caráter inflamatório (Tabela 3). Isto também pode ser observado nas análises histológicas das membranas de animais tratados com diclofenaco de sódio e L-NAME (Figuras 24D e 24E).

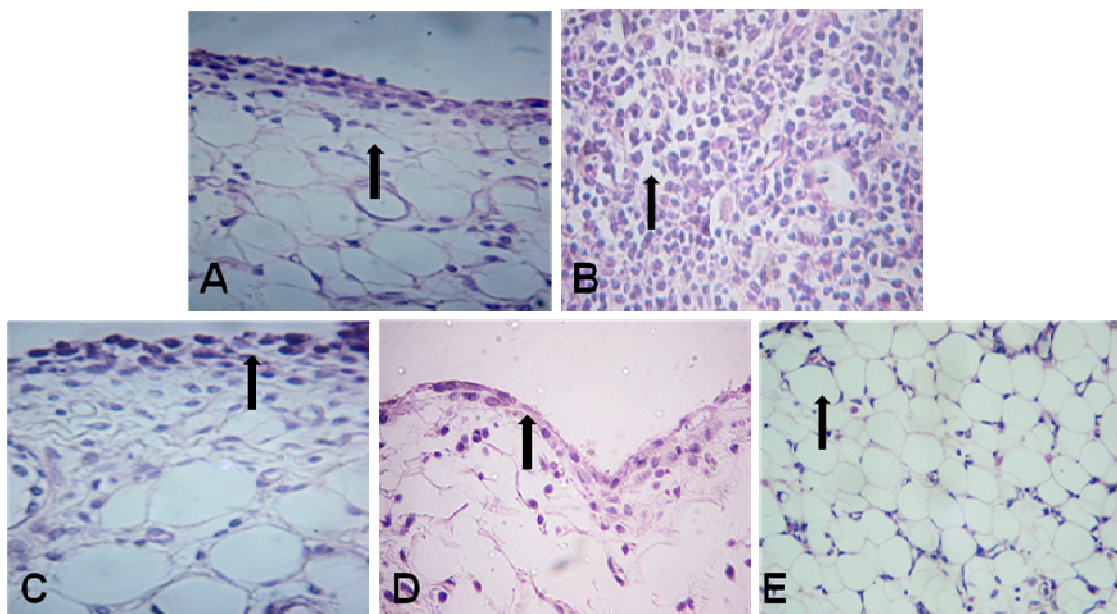


Figura 24: Análises histopatológicas de membranas sinoviais de grupos experimentais. A figura **A** representa grupo controle negativo, a seta indica o espaço intracelular de um adipócito. A figura **B** representa grupo controle positivo, seta indica tecido conjuntivo fibroso. A figura **C** representa grupo tratado com fração F1 50 mg/kg, seta indica células da capsula sinovial. A figura **D** representa grupo tratado com diclofenaco de sódio 5 mg/kg, seta indica célula na cápsula sinovial. A figura **F** representa grupo tratado com L-NAME 25 mg/kg, seta indica espaço intracelular de um adipócito. (H&E, Aumento de x 400).

Após a 1ª hora, e até o 4º dia, de AZy, os animais do grupo F1 foram tratados com 50 mg/Kg. No 5º dia os animais foram eutanasiados. A análise histopatológica da sinóvia mostrou um exsudato inflamatório leucocitário (score 1). Tecido fibroso foi encontrado em poucas regiões das achados histológicos (score 2). A seta aponta para a cápsula sinovial, a qual apresenta boa integridade (score 2).

Os parâmetros das análises histopatológica das membranas dos animais tratados com diclofenaco de sódio (5 mg/Kg) e L-NAME (25 mg/kg) estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3: Número de escores para parâmetros inflamatórios.

Grupos	Infiltrado	Adipócitos	Tecido fibroso	Integridade capsular	Células gigantes
Negativo	0	3	1	3	0
Positivo	3	0	3	1	1
F1(50 mg/kg)	1	2	2	2	0
Diclofenaco	1	3	2	2	0
L-NAME	1	3	2	2	0

A eficácia de F1 é evidenciada ao se observar a diminuição nos parâmetros inflamatórios da sinóvia, como diminuição de infiltrado leucocitário, aumento da integridade da cápsula sinovial e aumento no número de adipócitos.

4.7.9. Imunohistoquímica para TNF- α

A imunohistoquímica foi realizada pelo método indireto (revelação do complexo antígeno-anticorpo). Um anticorpo primário anti-TNF- α e um kit de visualização contendo anticorpo secundário conjugado à peroxidase e cromógeno, que confere coloração azul-escuro, foram usados.

A análise imunohistoquímica das sinóvias dos grupos testados demonstraram perfis imunológicos distintos entre os grupos. Membranas sinoviais de animais do grupo controle negativo (salina intra-articular) (Figura 25A) apresentaram estrutura normal, como já referida anteriormente, sem presença de infiltrado celular expressando TNF- α (score 0). Membranas do

grupo controle positivo (AZy intra-articular) (Figura 25B) apresentaram intenso infiltrado celular com marcada expressão da citocina pró-inflamatória TNF- α (escore 3). A figura 25C representa corte imunohistopatológico da membrana sinovial de animal submetido à indução da artrite por Zy e tratado durante o experimento com a fração F1 (50 mg/kg), onde foi observada diminuição do infiltrado celular com conseqüente diminuição da expressão de TNF- α . A análise por imunohistoquímica das membranas sinoviais de animais tratadas com os compostos de referência, diclofenaco de sódio (Figura 25D) e L-NAME (Figura 25E), também foram realizadas e os resultados estão na Tabela 4.

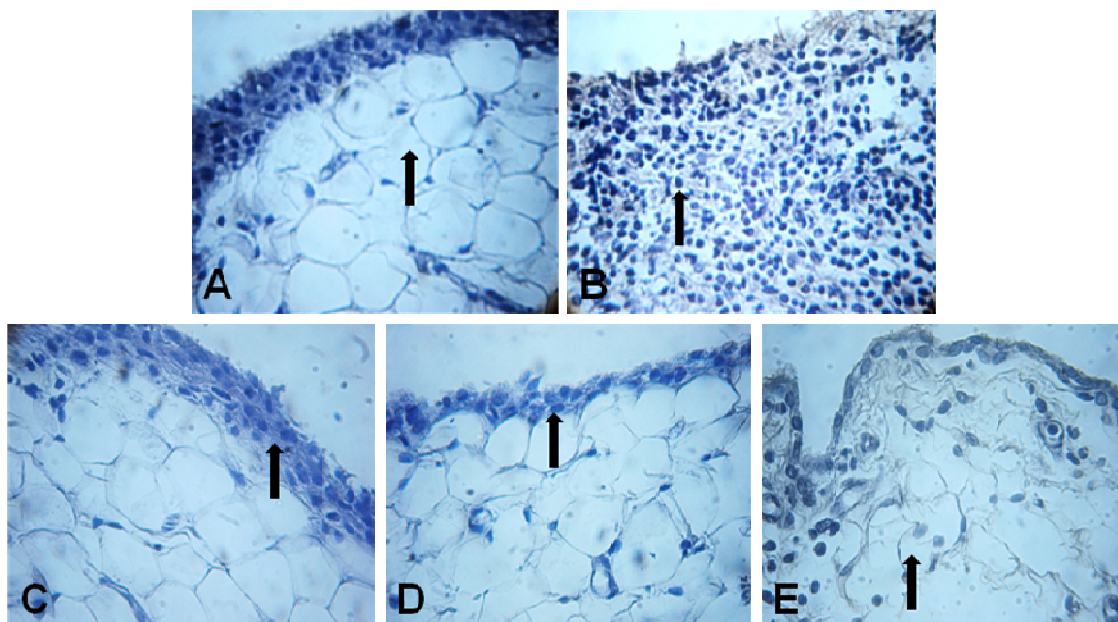


Figura 25: Análises histopatológicas de membranas sinoviais de grupos experimentais. A figura **A** representa grupo controle negativo, a seta indica o espaço intracelular de um adipócito. A figura **B** representa grupo controle positivo, seta indica células do infiltrado. A figura **C** representa grupo tratado com fração F1 50 mg/kg, seta indica a cápsula sinovial. A figura **D** representa grupo tratado com diclofenaco de sódio 5 mg/kg, seta indica célula na cápsula sinovial. A figura **E** representa grupo tratado com L-NAME 25 mg/kg, seta indica espaço intracelular de um adipócito. (Imunohistoquímica: detecção de TNF- α . Aumento dex 400).

As análises semi-quantitativas dos parâmetros inflamatórios para os dados da imunohistoquímica demonstraram resultados compatíveis com os dados já apresentados neste trabalho. Assim, a Tabela 4 apresenta os escores imunohistoquímicos para detecção de TNF- α .

Tabela 4: Número de escores imunohistoquímico para detecção de TNF- α .

Grupos	Escores para Expressão de TNF-α
Negativo	0
Positivo	3
F1(50 mg/kg)	1
Diclofenaco	1
L-NAME	1

Mais uma vez, a eficácia de F1 é evidenciada ao se observar a diminuição da expressão de TNF- α , uma citocina responsável pelo agravamento de processos inflamatórios, presente em altos níveis no líquido sinovial e soro de pacientes com artrite.

5. DISCUSSÃO

As diversas atividades *in vitro* (ZUBIA; ROBLETO; FREILE-PELEGRIN, 2007; QUEIROZ *et al*, 2008), *ex vivo* (QUEIROZ *et al*, 2006) e *in vivo* (MEDEIROS *et al*, 2008) de fucanas da alga marinha *Lobophora variegata* vem se destacando quanto às suas propriedades bioativas. A fração precipitada com 1 volume de acetona (F1) apresentou o melhor rendimento e a menor quantidade de elementos protéicos e foi o objeto de estudo deste trabalho.

A caracterização da fração F1 por eletroforese em gel de agarose demonstrou polidispersividade o que limita o seu estudo estrutural. Estes dados confirmam os mesmos resultados obtidos por Queiroz *et al*. (2003). Além de altos teores de açúcares (46,6%), esta fração exibiu alto percentual de sulfato (22,7%).

A fração F1, além de fucose, apresenta galactose e glicose. A espectroscopia de infravermelho confirma vibrações entre átomos de hidrogênio e oxigênio com estiramentos entre 3734 e 3671 cm^{-1} . Também demonstrou presença de ligações entre enxofre e oxigênio com bandas em 1239 cm^{-1} e 850 cm^{-1} , características de grupamento sulfato. Vibrações semelhantes foram encontradas por Medeiros *et al*, (2008) ao estudar galactofucanas sulfatadas da alga *Lobophora variegata*. A presença de grupamentos sulfato axial ligados ao esqueleto do polissacarídeo (851 cm^{-1}), é confirmada por outros trabalhos que elucidam a presença de sulfato axial no carbono 4 de resíduos de fucose (MOURÃO *et al*, 2004).

A ressonância nuclear magnética (RNM) de ^1H e ^{13}C demonstrou sinais característicos de hidrogênios e carbonos anoméricos de galactose em 5,28-5,26 ppm e 103 ppm, respectivamente, e grupamento metil característicos de C6 de fucose, em 15,78 ppm. De acordo com Mulloy *et al* (1994) o sinal para carbono anomérico e o sinal em torno 85 ppm são característicos de ligação do tipo β -(1 \rightarrow 3) entre açúcares. Para Duarte *et al* (2001) sinais entre 15.0 e 18.0 ppm são característicos de grupos metil. Os espectros de RMN monodimensionais obtidos de frações fucanas, comprovaram que estes polímeros têm sinais diferentes na região do carbono anomérico. Sinais sobrepostos foram observados em fucoidans (SANTOS, 2004). Segundo

Rocha (2002), os espectros de RNM de mono e bidimensionais (HMQC) exibem multiplicidade de sinais que sugerem ligações glicosídicas variadas e diferentes padrões de sulfatação. O autor afirma ainda, que propor uma estrutura para polissacarídeos complexos como estes desconsiderariam suas peculiaridades estruturais e seria omitir, utilizando dados simplistas, o modelo estrutural a ser proposto.

Quando analisada frente a sistemas oxidantes, a fração F1 demonstrou atividade redutora e removedora de radicais superóxido e hidroxil. Resultados semelhantes foram encontrados por Zubia, Robleto e Freile-Pelegrin (2007) que, avaliando a atividade antioxidante de polissacarídeos da alga *Lobophora variegata*, identificaram alta remoção de radicais livres em sistemas *in vitro*. A atividade antioxidante de outras algas marinhas marrons tem sido demonstrada em diversos trabalhos. Souza *et al* (2007) analisando polissacarídeos sulfatados das algas marrons *Fucus vesiculosus* e *Padina gymnospora* identificaram atividades antioxidantes removedoras de radicais superóxido e hidroxil. Wang *et al* (2008) estudando polissacarídeos sulfatados da alga *Lamiraria japonica* demonstraram sua atividade oxido-redutora frente a diferentes sistemas, como: poder redutor e atividade removedora de radicais superóxido e hidroxil. Este autor também relatou que o conteúdo de sulfato e fucose podem ter papel significativo na atividade antioxidante de polissacarídeos de algas. Ye *et al* (2008) demonstraram alta atividade antioxidante dos polissacarídeos da alga marrom *Sargassum pallidum* que, de acordo com o autor, apresenta alto conteúdo de sulfato (22,6%). Devido às diferenças entre os sistemas de testes empregados para se fazer a avaliação da atividade antioxidante, Rocha *et al* (2007) recomendam o uso de pelo menos dois métodos, dependendo do potencial esperado e da origem da amostra.

A fração F1 não demonstrou atividade citotóxica em cultura de células (leucócitos) nas concentrações empregadas (0,5 e 1 mg/mL). Queiroz *et al* (2006) estudando a citotoxicidade de galactofucanas de *Lobophora variegata* em linhagem de células leucêmicas HL60 também não observaram citotoxicidade. Esse resultado dá subsídio à utilização da fração F1 em ensaios com animais, como análises da atividade antiinflamatória, que demonstrou redução nos parâmetros inflamatórios, tais como edema, migração celular e liberação de

mediadores inflamatórios, dentre estes, TNF- α e NO. Este último (NO) é considerado o principal mediador do efeito destrutivo do TNF- α em artrites e inibidores da síntese de NO tem demonstrado retardar sinais clínicos e histológicos em artrites induzidas experimentalmente (VUOLTEENAHO *et al*, 2007). A administração da fração F1 de *Lobophora variegata* reduziu o influxo leucocitário (52,1 – 96,7%) no lavado articular de forma dose dependente. O que pode estar relacionado à diminuição de cofatores do processo inflamatório, como células e mediadores. Cardoso *et al* (2009) avaliando o potencial antiinflamatório da alga *Fucus vesiculosos* frente a inflamação articular também identificou tal efeito na diminuição de células do lavado articular de forma dose dependente. A mínima migração de leucócitos utilizando a fração F1 ocorreu com a dose de 75 mg/kg (96,7%).

Os grupos de animais tratados com a fração F1 apresentaram uma redução (27,2 – 39%) na produção de nitrito, sendo que a dose de 50 mg/kg apresentou melhor resultado, fato este também demonstrado por Cardoso *et al* (2009) que utilizaram polissacarídeos sulfatados da alga *Fucus vesiculosus* ao analisarem indiretamente os níveis de NO sinovial por analisarem a quantidade de nitrito, relatando ainda uma possível dose de saturação para a diminuição dos níveis de NO no fluido sinovial. Hebeda (2008) analisando a utilização de L-NAME, em culturas celulares, suporta a idéia de que esse composto inibe não seletivamente a atividade das NOS no foco inflamatório, confirmando propriedades pró-inflamatórias do ON. No entanto, Migita *et al* (2001) demonstrou atividade protetora do ON, estando associado a prevenção de apoptose por inibir a ativação da caspase 3. A inibição do influxo de células polimorfonucleares, como neutrófilos, é responsável, pelo menos parcialmente, pela diminuição dos níveis de ON, provavelmente por estas células estarem envolvidas no aumento na expressão da NOS induzível (iNOS) (YKI-JARVINEN *et al*, 2003; BEZERRA *et al*, 2004). A produção demasiada de ON pode promover ativação, diferenciação e resposta efetora de células T em diferentes vias patogênicas de doenças auto-imunes (NAGY *et al*, 2007). A diminuição do edema confirmou os eventos antiinflamatórios descritos após o uso da fração F1, do diclofenaco de sódio e do L-NAME. A diminuição de TNF- α sérico foi confirmada pelas análises histológicas. Lianxu *et al* (2006) ao estudar o processo inflamatório demonstrou a atividade do TNF- α , via NF- κ B,

em aumentar os níveis das enzimas iNOS e COX-2, relacionadas a produção de ON e prostaglandina E₂. Altas concentrações de iNOS tem sido relacionadas ao aumento de superóxido (O₂^{•-}) intracelular (GUNNETT *et al*, 2005) e disfunções endoteliais em pacientes com AR (MAKI-PETAJA *et al*, 2008).

Os aspectos histopatológicos das membranas sinoviais dos animais tratados, como: presença de adipócitos, pouco tecido fibroso, diminuição de células inflamatórias e diminuição da expressão de TNF- α confirmaram diminuição dos parâmetros inflamatórios, como o número de leucócitos no líquido sinovial e TNF- α sérico, discutidos anteriormente. Dados histopatológicos obtidos por Xavier (2005) confirmam esses resultados.

Os dados obtidos confirmam a presença de um polissacarídeo sulfatado oxido-redutor que apresenta atividade antiinflamatória em modelo de artrite. No entanto, estudos posteriores devem ser realizados para obtenção de novos dados que possam elucidar os caminhos metabólicos e vias de sinalização de compostos naturais como os polissacarídeos sulfatados aqui apresentados.

6. CONCLUSÕES

- 1 A alga marrom *Lobophora variegata* sintetiza diferentes frações de polissacarídeos precipitados com diferentes volumes de acetona;
- 2 A F1 apresenta alto rendimento e altos teores de açúcares além baixa contaminação protéica;
- 3 A caracterização química e CLAE de F1 demonstra a presença dos açúcares fucose, galactose, glicose e traços de xilose em sua estrutura;
- 4 As espectroscopias de Infravermelho e RMN (^{13}C e ^1H) da fração confirmam tratar-se de uma heterofucana;
- 5 A fração 1 de *Lobophora variegata* apresenta atividade antioxidante, de inibição de radicais livres, como o superóxido e o radical hidroxil;
- 6 A administração da Fração F1 de *Lobophora variegata* reduziu a artrite induzida por zymosan, com efeito significativo na redução de parâmetros inflamatórios, como edema, migração celular, teor de óxido nítrico articular e concentração de TNF- α sérico;
- 7 F1 50 mg/kg apresenta semelhanças quando comparada ao diclofenaco de sódio na fase aguda e crônica da artrite;
- 8 Estes dados concluem que esta fucana possui propriedades antiinflamatórias e além de potentes antioxidantes indicando ser um bom alvo farmacêutico;

Referências:

AFELTRA, A. Treatment of rheumatoid arthritis: new therapeutic approaches with biological agents. *Curr. Drug Target Immune Endocr. Metabol. Disord.* V.1, p.45-65, 2001.

ALBERS JM, PAIMELA L, KURKI P, EBERHARDT KB, EMERY P, van't HOF MA, et al. Treatment strategy, disease activity, and outcome in four cohorts of patients with early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* v.60, p.453-458, 2001.

ALQUINI G.; CARBONERO, E.R.; ROSADO F.R.; COSENTINO, C.; IACOMINI M. Polysaccharides from the fruit bodies of the basidiomycete *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr. *FEMS Microbiology Letters.* v. 230, p. 47-52, 2004.

ALTINDAG, O.; KARAKOC, M.; KOCYIGT, A.; et al. Increased DNA damage and oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Biochem* 40(3-4): 167-171, 2007.

AVALOS, I.; CHUNG, C.P.; OESER, A.; et al. Oxidative stress in systemic lúpus erythematosus: relationship to disease activity and symptoms. *Lupus* 16(3): 195-200, 2007.

BARBOSA, A.M.; STELUTI, R.M.; DEKKER, R.F.H.; CARDOSO, M.S.; SILVA, M.L.C. Structural characterization of Botryosphaeran: a (10³;10⁶)-b-D-glucan produced by the ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria* sp. *Carbohydrate Research.* v. 338, p.1691-1698, 2003.

BARRY, H.J.G. *Free Radicals in Biology and Medicine.* 4. Ed. New York: Oxford University Press, 2007.

BECKER, D.J.; LOWE, J.B. Fucose: biosynthesis and biological function in mammals. *Glycobiology*, v. 13, n. 7, p. 41R-53R, July 2003.

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

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.29R, 2003.

BEZERRA, M.M.; BRAIN, S.D.; GREENACRE, S.; JERÔNIMO, S.M.B.; MELO, L.B.; KEEBLE, J.; ROCHA, F.A.C. Reactive nitrogen species scavenging, rather than nitric oxide inhibition, protects from articular cartilage damage in rat zymosan-induced arthritis. *Br J Pharmacol* 2004; 141: 172-82.

BILAN, M.I. Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus evanescens* C. *Ag. Carboh. Res.*, v. 337, p. 719-730, 2002.

BITTENCOURT, P.I.H. Metabolismo do Ácido Araquidômico na Sepse, in Sepse. Manole, São Paulo, 2007.

BLUNT, J.W.; COPP, B.R.; MUNRO, M.H.G.; NORTHCOTE, P.T.; PRINSEP, M.R. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, v.23, p.26–78. 2006.

BROWN, G.D.; GORDON, S. Immune recognition: a new receptor for β -glucans. *Nature*, p.413-436, 2001.

CANTILLO-CIAU Z.; MOO-PUC R.; QUIJANO L. AND FREILE-PELEGRÍN Y. The Tropical Brown Alga *Lobophora variegata*: A Source of Antiprotozoal Compounds. *Mar. Drugs*, v.8, p. 1292-1304, 2010.

CANTILLO-CIAU, Z.; MOO-PUC, R.; QUIJANO, L. AND FREILE-PELEGRÍN, Y. The tropical brown alga *lobophora variegata*: a source of antiprotozoal compounds. *Mar. Drugs*, v.8, p.1292-1304, 2010.

CARBONERO, E.R.; MONTAI, A.V.; WORANOVICZ-BARREIRA, S.M.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. Polysaccharides of lichenized fungi of three *Cladina* spp.: significance as chemotypes. *Phytochemistry*. v. 61, p. 681–686, 2002.

CARDOSO, M.L.; XAVIER, C.A.C.; BEZERRA, M.E.B.; PAIVA, A.A.O.; CARVALHO, M.G.F.; BENEVIDES, N.M.B.; ROCHA, P.A.C.; LEITE, E.L. Assessment of Zymosan-Induced leukocyte influx in a rat model using sulfate polysaccharides. *Planta Me.*, v.75, p.1-7. 2009.

CASSATELA, M.A. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunology Today*, v. 16, p. 21-26, 1995.

CERQUEIRA, N.F.; YOSHIDA, W.B. Óxido Nítrico: revisão. *Acta Cir. Bras.*, v. 17, p. 417-423, 2002.

CHEVOLOT, L., FOUCAULT, A., CHAUBET, F., KERVAREC, N., SINQUIN, C., FISHER, A. M., AND BOISSON-VIDAL, C. *Carbohydr. Res.* v.319, p.154–165, 1999.

CHIARELLO, B.; DRIUSSO, P.; RADI, A.L.M. *Fisioterapia Reumatológica*. Barueri – SP: Editora Manole, p.89, 2005..

CHIKANZA, I.C.; KINGSLEY, G.; PANAYI, G.S. Peripheral blood and synovial fluid monocyte expression of interleukin 1(alpha) and 1 (beta) during active rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* V.22; p.600-606, 1995.

CHIZHOV, A.O.; DELL, A.; MORRIS, H.R.; HASLAM, S.M.; MCDOWELL, R.A.; SHASHKOV, A.S.; NIFANT'EV, N.E.; KHATUNTSEVA, E.A. & USOV, A.I. A study of fucoidan from the brown seaweed *Chorda filum*. *Carbohydr. Res.*, v.319, p. 108-119, 1999.

CONCHIE, J. & PERCIVAL, E.G.V. Fucoidan. Part II. The hydrolysis of a methylated fucoidan prepared from *Fucus vesiculosus*. J. Chem. Soc., p. 827-832, 1950.

CONTRAN, R.S., ROBBINS, SL, KUMAR V, ABBAS F. *Patologia: bases patológicas das doenças*. 7ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1011-47, 2005.

CRILLY, A. Genotyping for disease associated HLA DR beta 1 alleles and the need for early joint surgery in rheumatoid arthritis: a quantitative evaluation. *Ann Rheum. Dis.* V. 58, p.114-117, 1999.

CUZZOCREA, S.; COSTANTINO, G.; ZINGARELLI, B. & CAPUTI, A.P. Beneficial effects of Mn (III) tetracs (4-benzoic acid) porphyrin (MnTbap), a superoxide dismutase mimetic, in carrageenan-induced pleurisy. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 26, p. 25-33, 1998.

DEL CARLO R.J., Galvão M.R., Vitoria M.I.V., Natali A.J, Barbosa A.L.T., Monteiro B.S., Pinheiro L.C.P. Imobilização prolongada e remobilização da articulação fêmoro-tíbio-patelar de ratos: estudo clínico e microscópico. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.59, n.2, p.363-370, 2007.

DEN BROEDER, A.A.; WANTEN, G.J.; OYEN, W.J.; NABER, T.; VAN RIEL, P.L.; BARRERA, P. Neutrophil migration and production of reactive oxygen species during treatment with a fully human anti-tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 30(2): 232-237, 2003.

DIETRICH, C. P. and DIETRICH, S. M. C. *Analytical Biochemistry*. 1976, 70, 645-647.

DODGSON, K.S.; Price, R.G. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. *Biochem. J.*, v. 84, p. 106-10, 1962.

DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. *Br. J. Anaesth*, v. 75, p. 125-131, 1995.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82(1): 47-95, 2002.

DROGE, W.; SCHULZE-OSTHOFF, K.; MIHM, S.; GALTER, D.; SCHENK, H.; ECK, H.P., ROTH, S.; GMUNDER, H. Functions of glutathione and glutathione disulfide in immunology and immunopathology. *FASEB J* 8: 1131-1138, 1994.

DUARTE, M.E.R.; CARDOSO, M.A.; NOSEDA, M.D.; CEREZO, A.S. Structural studies on fucoidans from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum*. *Cabohyd. 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. 350-6. 1956.

DUCATTI D.R.B. Oligossacarídeos obtidos por hidrólise redutiva parcial de polissacarídeos de algas vermelhas: estudos de ressonância magnética nuclear. Tese (Mestrado). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

FANG, Y.; CHEN, Y. AND GE, S. The role of PMN CD11b/CD18 on the increasing PMN adhesion to endothelial cells induced by severe burn injury. *Zhonghua Wal Ke Za Zhi.*, v. 35, n.8, p. 504-506, 1997.

FAULKNER, D.J. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 2002, 19, 1–49.

FELDMAN, M.; MAINI, R.N. The Role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. V.38, p.3-7, 1999.

FERREIRA A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Med Brasil*; 43(1): 61-81, 1997.

FILIPPIN L.I.; VERCELINO, R.; MARRONI N.P.; XAVIER, R.M.; Redox Influence on the Inflammatory Response in Rheumatoid Arthritis. *Rev. Bras Reumatol.*, v. 48, n.1, p. 17-24, 2008.

FORMAN, H.J.; FUKUTO, J.M.; TORRES, M. Redox signaling: thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers. *Am J Physiol Cell Physiol* 287(2): C246-256, 2004.

FURST, D.E. Update consensus statement on tumor necrosis factor blocking agents for the treatment of rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* v.59, p.1-12, 2000.

GABOURY, J. et al. Nitric oxide prevents leukocyte adherence: role of superoxide. *Am. J. Physiol.*, v. 265, p. 862-867, 1993.

GALLIN, J.I.; GOLDSTEIN, I.M.; SNYDERMAN, R. Inflammation: basic principles and clinical correlates. 2 ed. New York: Raven Press, 1982.

GANDON, C.; BRUNETEAU, M. Structural studies of the extracellular b-D-glucans from *Phytophthora parasitica* Dastur. *Carbohydrate Research* 313 (1998) 259–263.

GEGOUT, P. Characterization of zymosan-induced arthritis in the rat: effects on joint inflammation and cartilage metabolism. *Life Sci.*, v.55, n.17, p.321-326, 1994.

GINN-PEASE, M.E.; WHISLER, R.L. Optimal NF- κ B mediated transcriptional responses in Jurkat T cells exposed to oxidative stress are dependent in intracellular glutathione and costimulatory signals. *Biochem Biophys Res Commun.* v. 226: p. 695-702, 1996.

GOMAA, A.A.; ELSHENAWY M.M.; AFIFI N.A.; MOHAMMED E.A. and THABIT R.H. Dual effect of nitric oxide donor on adjuvant arthritis. *International Immunopharmacology*. n. 9, 2009.

GORDON, M. H. The mechanism of antioxidant action in vitro. In B. J. F. Hudson (Ed.), Food antioxidants (pp. 1–18). London and New York: Elsevier Applied Science., 1990.

GRANERT, C. *et al.* Inhibition of leukocyte rolling with polysaccharides fucoidan preventa pleocytosis in experimental meningitis in the rabbit. J. Clin. Invest., v.93, p. 929-936, 1994.

GRANGER D.L., Tainitor, R.R., Boockvar K.S., Hibbs J.B. Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction. Methods Enzymol. v.268, p.142-5. 1996.

GUNETT C.A., LUND D.D., McDOWELL A.R., FARACI F.M., HEISTAD D.D. Mechanism of inducible nitric oxide synthase-mediated vascular dysfunction. Arterioscler Thromb Vasc Biol., v. 25, p. 1617-1622, 2005.

HALLIWEL B., GUTTRIDGE J.M.C., CROSS C.E. Free radicals, antioxidants and human diseases: Where are we now? J. Lab. Clinic Med., v. 119, p. 598-620, 1992.

HARRIS Jr. E. D. Etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis. In Kelly, W. N. textbook of Rheumatology, 4 edition WB Soundres Co. Philadelphia, USA, p.833-873, 1993.

HARRIS Jr. E. D. Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy. N.Engl. J. Med. V.322, n.18, p.1277-1289, 1990.

HEBEDA, C. B. *In vivo* inhibition of nitric oxide synthases: effects on expressions of adhesion molecules and secretion of inflammatory mediators. Tese [Doutorado] – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 2008.

HITCHON, C.A; EL-GABALAWY, H.S. Oxidation in rheumatoid arthritis. Arthritis Res Ther 6(6): 265-78, 2004.

HSU, C.-Y.; CHAN, Y.-P. and CHANG, J. Antioxidant activity of extract from *Polygonum cuspidatum*. Biol Res 40: 13-21, 2007.

HWANG, E.S.; KIM, G.H. Biomarkers for oxidative stress status of DNA, lipis, and proteins in vitro and in vivo cancer research. Toxicology 229(1-2):1-10, 2007.

JAMES T. WU AND LILY L. WU. Acute and Chronic Inflammation: Effect of the Risk Factor (s) on the Progression of the Early Inflammatory Response to the Oxidative and Nitrosative Stress. J Biomed Lab Sci., v. 19, n. 32, 2007.

JONES, D.P. Disruption of mitochondrial redox circuitry in oxidative stress. Chem Biol Interact 163 (1-2): 38-53, 2006.

JUNQUEIRA L.C.U.; Carneiro J. Histologia básica, nona edição. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan; 1995.

KANNAN,K.; ORTMANN, R.A.; KIMPEL, D. Animal models the rheumatoid arthritis and their relevance to human disease. *Pathophysiology*. 2005;12:167-181.

KANNO, N.; SATO, M.; *Biochem. Intern.* 1990, 21, 519.

KAYSER, C.; SOUZA, A.W.S. Anti-Tumor Necrosis Factor a Agent in the Treatment of Rheumatoid Arthritis in the Clinical Practice. *Rev Bras Reumatol*, v. 47, n.3, p. 212-217, 2007.

KEHRER, J.P. *Toxicology* 149 (2000) 43–50

KEYSTONE, E.C. Zymosan-induced arthritis: a model of chronic proliferative arthritis following activation of the alternative pathway of complement. *Arthritis Rheum*.v.20, p.1396-1401, 1989.

KHAN, A.I., LANDIS, R.C., MALHOTRA R. L-Selectin ligands in lymphoid tissues and models of inflammation. *Inflammation*, v. 27, n. 5, p. 265-280, Oct 2003.

KIECHELE, F.L.; MALINSKI, T. Nitric oxide: biochemistry, pathophysiology, and detection. *Am. J. Clin. Pathol.*, v. 100, p. 567-575, 1993.

KLOAREG, B; QUATRANO, R. S. Structure of cell wall of marine algae and ecophysiological function of matrix polysaccharides. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Ver.*, v. 26, p.259-315, 1987

KORNPROBST, J. N; SALLENAVE, C; BARNATHAN, G *Comp. Biochem. Physiol.* 1998, 119 B, 1.1998.

KUMAR, S.; RABSON, A.B.; GÉLINAS, C. The RxxRxRxxC motif conserved in all Rel/κB proteins is essential for the DNA-binding activity and redox regulation of the v-Rel oncoprotein. *Mol. Cell. Biol.* 12:3094-3106, 1992.

KUO, P.C.; SCHOROEDER, R.A. The emerging multifaceted roles of nitric oxide. *Ann. Surg.*, v. 221, p. 220-235, 1995.

LASKY, L. A. Syalomucins in inflammation and hematopoiesis. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 376, p. 259, 1995.

LEE, D.M.; WEINBLATT, M.E. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 358(9285): 903-911, 2001.

LEHMANN J.C.; JABLONSKI-WESTRICH D.; HAUBOLD U., GUTIERREZ-RAMOS J.C., SPRINGER T., HAMANN A. Overlapping and selective roles of endothelial intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and ICAM-2 in lymphocyte trafficking. *J. Immunol.*, v. 171, n. 5, p. 2588-93, Sept 2003.

LEITE, E.L.; MEDEIROS, M.G.L.; ROCHA, H.A.O.; FARIAS, G.G.M.; SILVA, L.F.; CHAVANTE, S.F.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B. Structure of a new fucan from the algae *Spatoglossum schroederi*. *Plant Science*, v. 132, p. 215-228, 1998.

LEY, K.; TEDDER, T.F. Leukocyte interactions with vascular endothelium: new insights into selectin-mediated attachment and rolling. *J. Immunol.*, v. 155, p. 525-528, 1995.

LIANXU, C.; HONGTI, J.; CHANGLONG, Y. NF-kBp65-specific siRNA inhibits expression of genes of COX-2, NOS-2 and MMP-9 in rat IL-1b-induced and TNF-a-induced chondrocytes. *OsteoArthritis and Cartilage*. v.14, p.367-376. 2006.

LIU, F.; OOI, V.E.; CHANG, S.T. Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharides extracts. *Life Sciences*, v. 60, p. 763-771, 1997.
LUSTER, A.D. Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. *New Engl.J. Med.*, v. 338, p. 436, 1998.

MAES, E., FLOREA, D., DELPLACE, F., LEMOINE, J., PLANCKE, Y., AND STRECKER, G. *Glycoconj. J.* v.14, p.127-146, 1997.

MAJNO, G. Studies on inflammation II. The site of action of histamine and serotonin. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, v. 11, p. 571, 1961b.

MAJNO, G.; PALADE G.E. Studies on inflammation I. The effect of histamine and serotonin on vascular permeability: an electron microscopic study. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, v. 11, p. 571-605, 1961a.

MAKI-PETAJA R.M., CHERIYAN J., BOOTH A.D., HALL F.C., BROWN J., WALLACE S.M.L., *et al.* Inducible nitric oxide synthase is increased in patients with rheumatoid arthritis and contributes to endothelial dysfunction. *Int J Cardiol.*, v. 129, p. 399-405, 2008.

MARQUES, C. T. Atividade antinflamatória de uma heterofucana da alga marrom *Padina gymnospora*. Dissertação de Mestrado. UFRN – Natal, 2007.

MATTHEWS, J.R.; WAKASUGI, N.; VIRELIZIER, J.L.; YODOI, J.; HAY, R.T. Thioredoxin regulates the DNA binding activity of NF-κB by reduction of a disulphide bond involving cysteine 62. *Nucleic. Acids. Res.* 20:3821-3830, 1992.

McCANDLESS, E. L.; CRAIGIE, J. S.; *Ann. Rev. Plant Physiol.* 1979, 30, 41.
McEVER, R.P.; CUMMINGS, R.D. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J. Clin. Invest.*, v. 100, p. 485-491, 1997.

MEDEIROS, V. P.; QUEIROZ, K. C. S.; CARDOSO, M. L.; MONTEIRO, G. R. G.; OLIVEIRA, F. W.; CHAVANTE, S. F.; GUIMARÃES, L. A.; ROCHA, H. A. O. AND LEITE, E. L. Sulfated galactofucan from *Lobophora variegata*: Anticoagulant and anti-inflammatory properties. *Biochemistry*, v.73, p. 1265-1273, 2008.

MIGITA K.; YAMASAKI S.; KITA M.; IDA H.; SHIBATIMI K. Nitric oxide protects cultured rheumatoid synovial cells from Fas- induced apoptosis by inhibiting caspase-3. *Immunology*, v. 103, p. 352-357, 2001.

MOLONEY DJ, PANIN VM, JOHNSTON SH, CHEN J, SHAO L, WILSON R, WANG Y, STANLEY P, IRVINE KD, HALTIWANGER RS, VOGT TF. Fringe is a glycosyltransferase that modifies Notch. *Nature*. 27; 406(6794): 369-375, 2000.

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

MONTEIRO, E.C.A.; TRINDADE, J.M.F.; DUARTE, A.L.B.P.; CHAHADE, L.H. Os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs). *O reumatologista*. v. 9, p. 53-63, 2008.

MORELAND, L.W. Inhibitors of tumor necrosis factor: new treatment options for rheumatoid arthritis. *Clev. Clin. J. Med.* V.66, p.367-374, 1999.

MORRIS, S.M.; BILLIAR, T.R. New insights into regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Am. J. Physiol.*, v. 266, p. 829-839, 1994.

MORY, H. & NISIZIWA, K. Sugar constituents of sulfated polysaccharides from the fronds of *Sargassum ringgoldianum*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, v. 48, p. 981-986, 1982.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, p. 55-63, 1983.

MOURÃO, P.A.S.; PEREIRA, M.P.; PAVÃO, M.S.G.; MULLOY, B.; TOLLEFSEN, D.M.; MOWINCKEL, M.; ABILDGAARD, U. Structure and anticoagulant activity of a fucosylated chondroitin sulfate from echinoderm. *J. Biol. Chem.*, v. 271, p. 2373-23984, 1996.

MOURÃO, S.; ANDRADE, L.R.; SALGADO, L.T.; FARINA, M.; PEREIRA, M.S.; FILHO, G.M.A. Ultrastructure of acidic polysaccharides from the cell walls of brown algae. *Journal of Structural Biology*. v. 145, p. 216–225, 2004.

MULLOY B. RIBEIRO, A. C MOURÃO, P. A. S. Sulfated Fucans from Echinoderms Have a Regular Tetrasaccharide Repeating Unit Defined by Specific Patterns of Sulfation at the 0-2 and 0-4 Positions. *Val.* 269, No. 35, Issue of September 2, pp. 22113-22123, 1994.

NAGAOKA, M.; SHIBATA, H.; KIMURA-TAKAGI, I.; HASHIMOTO, S.; KIMURA, K.; MAKINO, T.; AIYAMA, R.; UEYAMA, S.; YOKOKURA, T. Structural study of fucoidan from *Cladosiphon okamuranu* Tokida. *Glycoconjugate J.*, v. 16, p. 19-26, 1999.

NAGY G.; CLARK J.M.; BUZAS E.; GORMAN C.; PASZTOR M.; KONEZ A.; *et al.* Nitric oxide production of T lymphocytes is increased in rheumatoid arthritis. *Immunol Lett*, v. 118, p. 55-58, 2007.

NARDELLA, A.; CHAUBERT, F.; BOISSON-VIDAL, C.; BLONDIN, C.; DURAND, P.; JOZEFONVICZ, J. Anticoagulant low molecular weight fucans produced by radical process and ion exchange chromatography of high

molecular weights fucans extracted from brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. Carbohydr. Res., v. 289, p. 201-208, 1996.

NISHINO, T.; FUKUDA, A.; NAGUNO, T.; FUJIHARA, M.; EISUKE, K. Inhibition of the generation of thrombin and factor Xa by a fucoidan from the brown seaweed *Ecklonia kurome*. Thromb. Res., v. 98, p. 37-49, 1999.

NISHINO, T.; KIYOHARA, H.; YAMADA, H.; NAGUNO, T. Na anticoagulant fucoidan from Brown seaweed *Ecklonia kurome*. Phytochemistry, v. 30, p. 535-539, 1991.

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. Thromb. Res., v. 99, p. 623-634, 2000.

NORMAN, E.K. *et al.* Sialyl Lewis^x (sLe^x) and sLe^x mimetic, cgp69669a, disrupt e-selectin-dependent leukocytes rolling in vivo. Blood, v. 91, p. 475-483, 1998.

OKTYABRSKY, O.N.; SMINORVA, G.V. Redox regulation of cellular functions. Biochemistry (Mosc) 72(2):132-145, 2007.

OZKAN, Y.; YARDÝM-AKAYDÝN, S.; SEPICI, A.; KESKIN, E.; SEPICI, V.; SIMSEK, B. Oxidative status in rheumatoid arthritis. Clin Rheumatol 26(1): 64-68, 2007.

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

PAP, T. *et al.* Fibroblast biology: role of fibroblast in the pathogenesis of ^{rheumatoid} arthritis. Arthritis Research. v.2, p.361-367, 2000.

PAYNE; D.; KUBES, P. Nitric oxide donors reduce the rise in reperfusion-induced intestinal mucosal permeability. Am. J. Physiol., v. 265, p. 189-195, 1993.

PERCIVAL, E.; McDOWELL, R. H.; in *Biochemistry of Storage Carbohydrates in Green Plants*; Dey, P.; Dixon, R. A., Eds.; Academic Press; Nova York, p 30-5. 1967.

PEREIRA, F.E.L.; BOGLIOLO, L. Livro: Bogliolo Patologia. Capítulo 7 - Inflamações. Editora Guanabara Koogan. 6^a Ed. Rio de Janeiro, 2004.

PETRONE WF, ENGLISH DK, WONG K, MCCORD JM Free-radicals and inflammation: superoxide dependent activation of a neutrophil activating factor in plasma. Proc Natl Acad Sci USA 77: 1159-1163. 1980.

POBER, J.S.; COTRAN, R.S. Overview: the role of endothelial cells in inflammation. Transplantation, v. 50, p. 537, 1990.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E1. Analytical Biochemistry, v. 269, p. 337-341, 1999.

QUEIROZ, K.C.S. Estudo de Polímeros Bioativos da alga Marrom *Lobophora variegata*. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN, 2003.

QUEIROZ, K.C.S.; ASSIS, C.F.; MEDEIROS, V.P.; ROCHA, H.A.O.; AOYAMA, H.; FERREIRA, C.V. AND LEITE, E.L. Cytotoxicity effect of Algal Polysaccharides on HL60 Cells. *Biochemistry*, v. 71, No. 12, 2006.

QUEIROZ, K.C.S.; MEDEIROS, V.P.; QUEIROZ, L.S.; ABREU, L.R.D.; ROCHA, H.A.O.; FERREIRA, C.V.; JUCÁ, M.B.; AOYAMA, H. and LEITE, E.L. Inhibition of reverse transcriptase activity of HIV by polysaccharides of brown algae. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. v. 62, p. 303-307, 2008.

RALTON, S. H. Nitric oxide and bone: what a gas! *Br. J. Rheumatol.*, v. 36, p. 831-838, 1997.

REBELATTO, J.R.; MORELLI, J.G.S. *Fisioterapia Geriátrica*. Barueri – São Paulo: Editora Manole, 2005. 268p

RENNENBERG, H.; *Ann. Rev. Plant Physiol.* 1984, 35, 121.

RESENDE C.R.S.; Falabella M.E.V.; Valença S.S., Teixeira H.G.C. & Tinoco E.M.B. Peripheral giant cell granuloma - Immunohistochemical study of tumor necrosis factor-alpha. *R. Periodontia*. v 17. n 04. 2007.

ROCHA, F.A.C. Efeitos de inibidores da síntese de óxido nítrico na dor inflamatória articular e influxo celular da artrite induzida por zymosan em ratos. *Rer. Bras. Reumatol.* v.43, p.206-217, 2003.

ROCHA, F.A.C. Periarthritis promotes gait disturbance in zymosan-induced arthritis in rats. *Inflamm. Res.* V. 48, p. 485-490, 1999.

ROCHA, H.A.O. Extração e purificação de uma fucana da alga marinha *Spatoglossum schroederi*. [Tese-Biologia Molecular] Universidade Federal de São Paulo-SP, 2002.

ROCHA, H.A.O.; MORAES, F.A.; TRINDADE, E.S.; FRANCO, C.R.C.; TORQUATO, R.J.S.; VEIGA, S.S.; VALENTE, A.P.; MOURÃO, P.A.S.; LEITE, E.L.; NADER, H.B. AND DIETRICH, C.P. Structural and Hemostatic Activities of a Sulfated Galactofucan from the Brown Alga *Spatoglossum schroederi* AN IDEAL ANTITHROMBOTIC AGENT? *J. BIOLOGICAL CHEMISTRY*, v.280, p. 41278-41288, 2005.

ROCHA, J.B.T.; OLALYE, M.T. Commonly used tropical medicinal plants exhibit distinct in vitro antioxidant activities against hepatotoxins in rat liver. *Experimental and Toxicologic Pathology*. v. 58, p. 433–438, 2007.

RORRER, G. L.; CHENEY. D. P.. Bioprocess engineering of cell and tissues cultures for marine seaweeds. *Acquacultural engineering*. V. 32, p. 11-41, 2004.

ROSA, R.M.; ROEHRS, R.; SAFFI, J.; HENRIQUES, J.A.P. “O papel da reparação de lesões oxidativas induzidas no DNA na redução do risco de

desenvolvimento de câncer”. In: Salvador M, Henriques JAP. (Orgs.). Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo. 1. ed. Canoas: Editora da Ulbra, 2004.

ROSEN, S.D.; BERTOZZI, C.R. The selectins and their ligands. *Curr. Opin. Cell Biol.*, v. 6, p. 663, 1994.

ROUT, D.; MONDAL, S.; CHAKRABORTY, I.; PRAMANIK, M. AND ISLAM S.S. Chemical analysis of a new (1!3)-, (1!6)-branched glucan from an edible mushroom, *Pleurotus florida*. *Carbohydrate Research*, v.340, p.2533–2539, 2005.

SAMA, A.E.; D’AMORE, J.; WARD, M.F.; CHEN, G.; WANG, H. Bench to bedside: HMGB1-a novel proinflammatory cytokine and potential therapeutic target for septic patients in the emergency department. *Acad. Emerg. Med.*, v. 11, n. 8, p. 867-873, Aug 2004.

SANTOS, M.G.L. Propriedades imunomoduladoras das fucoidanas purificadas de *Fucus vesiculosus*. 2004.

SCHWARTZ, R.S. Autoimmunity and Autoimmune Diseases. *Fundamental Immunology*, third edition, p. 1033-1097, chapter 30, New York, 1993.

SEN C.K. Redox signaling e the emerging therapeutic potential of thiol Antioxidants. *Chemical Pharmacology*. Vol 55, pp. 1747-1758. 1998.

SEN, C.K.; PACKER, L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J* 10: 709-720, 1996.

SENNA, E.R.; DE BARROS, A.L.; SILVA, E.O.; et al. Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: a study using the COPCORD approach. *J Rheumatol* 31(3): 594-597, 2004.

SHIMADA, Y.; HASEGAWA, M.; KABURAGI, Y.; HAMAGUCHI, Y.; KOMURA, K.; SAITO, E.; TAKEHARA, K.; STEEBER, D.A.; TEDDER, T.F.; SATO, S. L-selectin or ICAM-1 deficiency reduces an immediate-type hypersensitivity response by preventing mast cell recruitment in repeated elicitation of contact hypersensitivity. *H. Immunol.*, v. 170, n. 8, p.4325-4334, Apr 2003.

SIES, H. *Oxidative Stress: Introductory ramks*. v. 1. London: Academic Press, 1985. P. 1-8.

SMIDERLE, F.R.; OLSEN, L.M.; CARBONERO, E.R.; BAGGIO, C.H.; FREITAS, C.S.; MARCON R.; SANTOS, A.R.S.; GORIN, P.A.J. AND IACOMINI, M. Anti-inflammatory and analgesic properties in a rodent model of a (1→3),(1→6)-linked β -glucan isolated from *Pleurotus pulmonarius*. *European Journal of Pharmacology* v.597, p. 86–91, 2008.

SODEN, M. *et al.* Immunohistological features in the synovium obtained from clinically uninvolved knee joints of patients with rheumatoid arthritis. *British Journal of Rheumatology*. v.28, p.287-292, 1989.

SOUZA, M.C.R.; MARQUES, C.T.; DORE, C.M.G.; SILVA, F.R.; ROCHA, H.A.O. AND LEITE, E.L. Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds. *J Appl Phycol.* v.19, p.153–160, 2007.

SPECTOT J. Refinement of the coomassie blue method of protein quantification. A simple and linear spectrophotometric assay of 0.5 to 50 µg of protein. *Anal Biochem* 1978; 86: 142-3.

SPRINGER, T.A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multi-step paradigm. *Cell*, v. 76, p. 301-314, 1994.

SPRINGER, T.A. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu. Rev. of Physiol.*, v. 57, p. 827-872, 1995.

SUN, H.-H.; MAO, W.-J.; CHEN, Y.; GUO, S.-D., LI H.-Y.; QI, X.-H.; CHEN, Y.-L.; XU, J. Isolation, chemical characteristics and antioxidant properties of the polysaccharides from marine fungus *Penicillium* sp. F23-2. *Carbohydrate Polymers.* v. 78, p. 117–124. 2009.

SUNG, J.Y.; HONG, J.H.; KANG, H.S.; et al. Methotrexate suppresses the interleukin-6 induced generation of reactive oxygen species in the synoviocytes of rheumatoid arthritis. *Immunopharmacology.* 47(1): 35-44, 2000.

SURH, Y.J. *Oxidative Stress, Inflammation, and health.* Packer L (ed.). Londres: Taylor & Francis, 2005.

TARNER, I.H. The different stages of synovitis: acute vs chronic, early vs late and non-erosive vs erosive. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology.* V.19, N.01, p. 19-35, 2005.

TAYLON, P. R. The beta-glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *J. Immunol.* V.169, p.3876-3882, 2002.

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

TELEMAN, A., LUNDQVIST, J., TJERNELD, F., STALBRAND, H., AND DAHLMAN, O. *Carbohydr. Res.* v.329, p.807–815, 2000.

TOKUNAKA, K.; OHNO, N.; ADACHI, Y.; TANAKA, S.; TAMURA, H.; YADOMAE T. Immunopharmacological and immunotoxicological activities of a water-soluble (143)-b-D-glucan, CSBG from *Candida* spp. *International Journal of Immunopharmacology.* v. 22, p. 383-394, 2000.

VILELA-SILVA, E. S. A., CASTRO, M. O., VALENTE, A. P., BIERMANN, H. C., AND MOURÃO, P. A. S. *J. Biol. Chem.* v.277, p.379–387, 2002.

VUOLTEENAHO K., MOILANEN T., KNOWLES R.G., MOILANEN E. The role of nitric oxide in osteoarthritis. *Scand J Rheumatol.*, v. 9, p. 9-15, 2007.

WANG J.; ZHANG Q.; ZHANG Z.; LI Z. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Laminaria japonica*. International Journal of Biological Macromolecules, v.42, p. 127–132. 2008.

WILLMENT, J.A. Dectin-1 expression and function are enhanced on alternatively activated and GM-CSF-treated macrophages and are negatively regulated by Il 10, dexamethasone, and lipopolysaccharide. Journal of Immunology. V. 171, p.4569-4573, 2003.

XANTHOULEA, S.; PASPARAKIS, M.; KOUSTENI, S.; BRAKEBUSCH, C.; WALLACH, D.; BAUER, J.; LASSMANN, H.; KOLLIAS, G. Tumor necrosis factor (TNF) receptor shedding controls thresholds of innate immune activation that balance opposing TNF functions in infectious and inflammatory diseases. J. Exp. Med., v. 200, n. 3, p. 367-376, Aug 2004.

XAVIER, C.A.C. Efeito do fucoidam de *Fucus vesiculosus* em um modelo experimental de artrite reumatóide. 2005.

YAN, Z. Expression of inducible nitric oxide synthase inhibits platelet adhesion and restores blood flow in the injured artery. Circ. Res., v. 79, p. 38-44, 1996.

YE H.; WANG K.; ZHOU C.; LIU J.; ZENG X. Purification, antitumor and antioxidant activities in vitro of polysaccharides from the brown seaweed *Sargassum pallidum*. Food Chemistry. v.111. p.428–432. 2008.

YEN, G.-C., & CHEN, H.-Y.. Antioxidant activity of various tea extract in relation to their antimutagenicity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 43, p. 27–32, 1995.

YUAN, Y.V., BONE, D.E., CARRINGTON, M.F. Antioxidant activity of dulse (*Palmaria palmata*) extract evaluated in vitro. Food Chemistry v. 91, p. 485–494, 2005.

YKI-JARVINEN H., BERGHOLM R., LEIRISALO-REPO M. Increased inflammatory activity parallels increased basal nitric oxide production and blunted response to nitric oxide in vivo in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis., v. 62, p. 630-634, 2003.

ZHANG, Q.; YU, P.; LI, Z.; ZHANG, H.; XU,Z.; LI, P. Antioxidant activities of sulfated polysaccharide fractions from *Porphyra haitanensis*. J. Applied Phycology, v. 15, p. 305-310, 2003.

ZHOU, Y.C. & ZHENG, R.L. Phenolic compounds and analog as superoxide anion scavengers and antioxidants. Biochemical Pharmacology, v. 42, p. 1177-1179, 1991.

ZUBIA, M.; ROBLEDO, D.; FREILE-PELEGRIN, Y. Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the Yucatan Peninsula, Mexico. J. Appl. Phycol., v. 19, p. 449–458, 2007.

ANEXO 1: Tabela de deslocamentos químicos para ^1H e ^{13}C de açúcares fucose, galactose e glicose.

^{13}C	δ (ppm)	^1H	δ (ppm)
C1	98,2 – 106,43	H1	4,13 – 5,31
C2	68,76 – 80,25	H2	3,18 – 4,17
C3	70,97 – 86,5	H3	3,37 – 4,54
C4	68,3 – 83,9	H4	3,20 – 4,5
C5	65,1 – 76,7	H5	3,19 – 4,44
C6	14 – 18,5 (CH_3) / 60,8 – 70,1	H6	0,84 – 1,34(CH_3) / 3,40 – 4,16

Os intervalos de sinais expostos são oriundos da análise dos trabalhos de: DUCATTI, 2005; ALQUINI *et al*, 2004; CARBONERO *et al*, 2002; GANDON *et al*, 1998; ROUT *et al*, 2005; SMIDERLE *et al*, 2008; CANTILLO-CIAU *et al*, 2010; BARBOSA *et al*, 2003; ROCHA *et al*, 2005; CHEVOLOT *et al*, 1999; MAES *et al* 1997; TELEMAN *et al*, 2000 e VILELA-SILVA *et al*, 2002.

ANEXO 2: Parecer do Comitê de Ética.



Universidade Federal do Rio Grande do Norte
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Natal (RN), 07 de julho de 2009.

Prezado Professor/Pesquisador,

Vimos, através deste documento, informar que o projeto "**Influência de polissacarídeos sulfatados da alga *Lobophora variegata* na artrite reumatóide induzida por zymosan**", protocolo nº **011/2009**, após análise das adequações, foi considerado **APROVADO** por esta Comissão.

Informamos que, segundo o Regimento Interno da CEUA (Cap. 2, Art. 13), é função do professor/pesquisador responsável pelo projeto a elaboração de relatório(s) de acompanhamento que deverá(ão) ser entregue(s) dentro do(s) prazo(s) estabelecido(s) abaixo:

- Relatório: **Agosto de 2010**.

Agradecemos a sua atenção e nos colocamos a disposição para eventuais esclarecimentos.

Cordialmente,

Elaine C. Gavioli
Presidente da CEUA

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](#)