



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**MARIA LEILA CARDOSO**

**EFEITO DE FRAÇÕES OBTIDAS DA FUCOIDANA DE *Fucus vesiculosus* EM MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRITE INDUZIDA POR ZYMOSAN**

**NATAL  
2007**

**MARIA LEILA CARDOSO**

**EFEITO DE FRAÇÕES OBTIDAS DA FUCOIDANA DE *Fucus vesiculosus* EM MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRITE INDUZIDA 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: Prof<sup>a</sup> Edda Lisboa Leite

**NATAL  
2007**

Divisão de Serviços Técnicos  
Catalogação da Publicação na Fonte. UFRN / Biblioteca Central Zila Mamede

Cardoso, Maria Leila.

Efeito de frações obtidas da fucoidana de *Fucus vesiculosus* em modelo experimental de artrite induzida por Zymosan / Maria Leila Cardoso. – Natal, RN, 2007.

84 f. : il.

Orientador : Edda Lisboa Leite.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Departamento de Bioquímica.

1. *Fucus vesiculosus* – Dissertação. 2. Fucoidanas – Dissertação. Artrite – Dissertação. 3. Zymosan – Dissertação. I. Leite, Edda Lisboa. II. Título.

RN/UF/BCZM

CDU 582.272(043.3)

*Ao Meu Pai do Céu que me dá forças, saúde e fé para que eu realize minha  
missão neste plano terrestre.*

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora querida prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Edda Lisboa Leite, uma pessoa especial, simples e competente, um exemplo de garra, perseverança e que em alguns momentos de desânimo sempre me animava, me enchia de entusiasmo novamente com sua bela risada. Professora que sabe ensinar, exigir, mas sempre com um jeitinho meigo! Serei sempre grata por ter me acolhido em seu laboratório.

A minha mainha Euza por sempre está ao meu lado, obrigada por ser sempre meu porto seguro. A minha família e todos que eu amo, a minha vó Nina e Ricardo por me agüentar nos momentos de estresse, em especial meu pai Cardoso e meu irmão Carlinhos pelo companheirismo em todos os momentos da minha vida.

À professora Dr<sup>a</sup> Selma Jerônimo, coordenadora do curso de pós-graduação da Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Aos professores do Departamento de Bioquímica: Roberto Dimenstein, Elizeu Antunes, João Felipe, Luciana da Matta, Luiz Abreu, Fernanda Wanderley, Suely Ferreira, Dilma Ferreira, José Fernandes, Jacira Maria. Em especial, aos professores Hugo Alexandre e Maurício Pereira Sales que participaram da minha qualificação.

A Evio, biólogo da UFRN, pela importante contribuição nas análises histopatológicas.

As colegas inesquecíveis Héryka e Cybelle onde formamos o “trio unha e carne” nas apresentações de artigos e nos papos do dia-dia, Milla por ter sido em várias vezes meu braço direito e esquerdo. Meus colegas: Lissandra, Marília, Micheline, Leonardo Rêgo, Rominne, Júlio César, Cleysivam, Tarciana, Viviane, Celina e Glória.

A Carol Addison, um agradecimento em especial por ter sido meu anjo da guarda, além de ser minha incentivadora e um exemplo de determinação.

Aos meus colegas de turma a qual tive o privilégio de fazer parte: Danielle, Karla Daniele, Leonardo Pepino, Kátya, Tirciane, Robério, Gioconda, Joseane, Edílson, Eduardo, Nednaldo, Videane.

Aos funcionários do departamento: Creuza, Eliene, D. Margarita, Sr. Itamar, Jonas, Kildare.

Aos órgãos financiadores: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Pró-reitoria de pesquisa e Pós-graduação da UFRN pelos recursos para a elaboração deste trabalho.

....Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe. Eu só levo a certeza de que muito pouco eu sei....Cada um de nós compõe a sua história e cada ser em si carrega o dom de ser capaz, de ser feliz...

Almir Sater / Renato Teixeira

## RESUMO

A fucoídana de *Fucus vesiculosus* é conhecida por exibir funções biológicas diversas. Este trabalho analisou a ação terapêutica de populações obtidas da fucoídana comercial (*F. vesiculosus*) no modelo de artrite induzida por zymosan. Após fracionamento com acetona obteve-se três populações de fucoídana que foram denominadas de fucoídanas F1 (52,3%), F2 (36,7%) e F3 (10,7%). As análises químicas demonstraram que F1, dentre as fucoídanas obtidas, foi a que apresentou a maior quantidade do íon sulfato. O perfil eletroforético mostra que a fucoídana comercial ou total (FT), diferente das outras fucoídanas e dos padrões de glicosaminoglicanos, se mostrou bastante polidisperso, o que indicou que essa é constituída por uma mistura de polissacarídeos sulfatados. Por outro lado, as fucoídanas obtidas a partir de FT mostraram apenas uma banda eletroforética com uma polidispersão bem menor do que aquela observada para FT. A fucoídana F2 apresentou uma migração intermediária entre as fucoídanas F1 e F3. Devido a pequena quantidade de massa obtida de F3, utilizou-se apenas as fucoídanas F1 e F2 nos ensaios da artrite induzida. Após 1 hora da indução foram administradas F1 ou F2 (10, 25 e 50 mg/Kg i.p) ou diclofenaco sódico (10 mg/Kg i.p) ou lumiracoxibe (5 mg/Kg v.o) ou L-NAME (30 mg/Kg i.p). Após 6 h, foram realizadas as análises do influxo celular e níveis de nitrito e a análise histopatológica. As fucoídanas F1 e F2 foram mais potentes tanto na diminuição do número de leucócitos, quanto na quantidade de óxido nítrico encontrado no lavado. O que indica que o mecanismo antiinflamatório dessas fucoídanas não está só relacionado com o bloqueio das selectinas, mas também com a inibição da síntese do óxido nítrico.

Palavras-chave: *Fucus vesiculosus*. Fucoídanas. Artrite. Zymosan.



## ABSTRACT

The fucoidan from *Fucus vesiculosus* is known for having diverse biological properties. This study analyzed the therapeutic action of populations of commercial fucoidan (*F. vesiculosus*) on zymosan-induced arthritis. Three populations of fucoidan were obtained after acetone fractionation; these were denominated F1 (52.3%), F2 (36.7%) and F3 (10.7%). Chemical analyses showed that F1 contained the largest amount of sulfate ion. The electrophoretic profile shows that the commercial or total fucoidan (TF), different from the other fucoidans and from glycosaminoglycan patterns, is quite polydisperse, which indicates that it is composed of a mixture of sulfate polysaccharides. On the other hand, the fucoidans obtained from TF showed only an electrophoretic band with much lower polydispersion than that observed for TF. Fucoidan F2 showed a migration between fucoidans F1 and F3. Owing to the small amount of mass obtained from F3, we used only fucoidans F1 and F2 in the induced arthritis tests. After 1 hour of induction, we administered F1 or F2 (10, 25 and 50 mg/kg i.p.) or diclofenac sodium (10 mg/kg i.p.) or lumiracoxib (5 mg/kg o.a.) or L-NAME (30 mg/kg i.p.). After 6 hours, we performed analyses of cell influx and nitrite levels in addition to histopathological analysis. Fucoidans F1 and F2 were more potent both in decreasing the number of leukocytes and the amount of nitric oxide found in the synovial fluid. This indicates that the anti-inflammatory mechanism of these fucoidans is not only related to selectin block, but also to nitric oxide synthesis inhibition.

Keywords: *Fucus vesiculosus*. Fucan. Arthritis. Zymosan.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Fotos das mãos e pés de uma paciente com artrite reumatóide.	17
FIGURA 2	Articulação em indivíduo saudável (A), articulação em paciente com AR inicial (B), articulação em paciente com AR tardia (C)	20
FIGURA 3	Captura, rolamento e adesão firme do leucócito	25
FIGURA 4	Efeitos catabólicos da excessiva produção de óxido nítrico na cartilagem articular	30
FIGURA 5	Estruturas propostas para fucoidans de <i>Fucus vesiculosus</i>	32
FIGURA 6	Esquema do protocolo experimental	47
FIGURA 7	Perfil eletroforético das frações das fucoidanas de <i>Fucus vesiculosus</i>	50
FIGURA 8	Efeito da fração F1 (10, 25 e 50 mg/Kg i.p), F2 (10, 25 e 50 mg/Kg i.p), diclofenaco sódico (10 mg/Kg i.p), lumiracoxibe (5 mg/Kg v.o) e L-NAME (30 mg/Kg i.p) no influxo celular	53
FIGURA 9	Efeito da fração F1 (10, 25 e 50 mg/Kg i.p), F2 (10, 25 e 50 mg/Kg i.p), diclofenaco sódico (10 mg/Kg i.p), lumiracoxibe (5 mg/Kg v.o) e L-NAME (30 mg/Kg i.p) no nível de nitrito	55
FIGURA 10	Efeito da fração F2 (25 mg/Kg i.p) aplicada antes da indução do zymosan e após indução no influxo celular	57
FIGURA 11	Efeito da fração F2 (25 mg/Kg i.p) aplicada antes da indução do zymosan e após indução no nível de nitrito	58
FIGURA 12	Representação histopatológica da sinóvia de ratos que receberam apenas solução salina intraarticular (H&E, x200)	60
FIGURA 13	Representação histopatológica da sinóvia de ratos que receberam zymosan intraarticular e não foram tratados (H&E, x200)	60
FIGURA 14	Representação histopatológica da sinóvia de ratos que receberam zymosan intraarticular e foram tratados com fração F1 (25 mg/Kg) (H&E, x400)	61
FIGURA 15	Representação histopatológica da sinóvia de ratos que receberam zymosan intraarticular e foram tratados com fração F1 (50 mg/Kg) (H&E, x400)	61
FIGURA 16	Representação histopatológica da sinóvia de ratos que receberam zymosan intraarticular e foram tratados com fração F2 (25 mg/Kg) (H&E, x400)	62
FIGURA 17	Representação histopatológica da sinóvia de ratos que receberam zymosan intraarticular e foram tratados com fração F2 (50 mg/Kg) (H&E, x400)	62
FIGURA 18	Representação histopatológica da sinóvia de ratos que receberam zymosan intraarticular e foram tratados com Diclofenaco sódico (10 mg/Kg) (H&E, x400)	63
FIGURA 19	Representação histopatológica da sinóvia de ratos que receberam zymosan intraarticular e foram tratados com Lumiracoxibe (5 mg/Kg) (H&E, x400)	63

- FIGURA 20 Representação histopatológica da sinóvia de ratos que receberam 64  
zymosan intraarticular e foram tratados com L-NAME (30 mg/Kg)  
(H&E, x400)
- FIGURA 21 Representação histopatológica da sinóvia de ratos que receberam 64  
zymosan intraarticular e foram tratados com fração F2 (25 mg/Kg)  
profilaticamente (H&E, x400)

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 Valores de escores para cada parâmetro.....46

QUADRO 2 Constituintes químicos da fucoidana total e de suas frações obtidas....51

## LISTA DE ABREVIATURAS/SIGLAS

AG	Aminoguanidina
AINES	Antiinflamatórios não-esteroidais
Anti-CCP	Anti-peptídio cíclico citrulinado
AR	Artrite Reumatóide
Azy	Artrite induzida por Zymosan
CETAVLON	Brometo de N-cetil-N-N-N- trimetilamônio
cNOS	Óxido nítrico sintase cálcio dependente
COX	Ciclooxigenase
COX 1	Ciclooxigenase 1
COX 2	Ciclooxigenase 2
COX 3	Ciclooxigenase 3
CS	Condroitin Sulfato
DS	Dermatan Sulfato
EDTA	Etileno Diamino Tetraacetato de sódio diidratado
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
FAP	Fator Ativador de Plaquetas
FR	Fator reumatóide
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos
H&E	Hematoxilina e Eosina
HS	Heparan Sulfato
i.a	Intraarticular
i.p	Intraperitoneal
ICAMs	Moléculas de Adesão Intercelular

IFN- $\gamma$	Interferon gama
IL-1	Interleucina 1
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
L-NAME	Éster metil L-N <sup>G</sup> -nitroarginina
L-NIL	N-iminoetil-L-lisina
L-NMMA	N <sup>G</sup> -monometil-L-arginina
LTB <sub>4</sub>	Leucotrieno B <sub>4</sub>
MMP	Metaloproteinase
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrito
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrato
NOS	Óxido nítrico sintase
ON	Óxido Nítrico
PDA	1,3 diaminopropano acetato
PECAM-1	Molécula de Adesão Celular Plaqueta-Endotélio 1
PG	Prostaglandina
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PGG <sub>2</sub>	Prostaglandina G <sub>2</sub>
PGH <sub>2</sub>	Prostaglandina H <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	Prostaciclina
PMNs	Polimorfonucleares

ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
TGF- $\beta$	Fator Transformador de Crescimento beta
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral alfa
TXA <sub>2</sub>	Tromboxano A <sub>2</sub>
v.o	Via Oral
VCAM-1	Molécula de Adesão Celular Vascular 1
Zy	Zymosan

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
1.1	ARTRITE REUMATÓIDE.....	17
1.1.1	<b>Etiologia</b> .....	17
1.1.2	<b>Mecanismos celulares</b> .....	18
1.1.3	<b>Diagnóstico e tratamento</b> .....	21
1.2	ARTRITE INDUZIDA POR ZYMOSAN (Azy).....	23
1.3	O PAPEL DE LEUCÓCITOS NA INFLAMAÇÃO.....	24
1.4	CICLOOXIGENASES E ANTIINFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIIS.....	26
1.5	ÓXIDO NÍTRICO E INIBIDORES DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE.....	28
1.6	<i>Fucus vesiculosus</i> .....	31
1.6.1	<b>Alga marrom</b> .....	31
1.6.2	<b>Fucoidana de <i>Fucus vesiculosus</i></b> .....	32
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	36
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	37
3.1	MATERIAL BIOLÓGICO.....	37
3.1.1	<b>Fucoidana de <i>Fucus vesiculosus</i></b> .....	37
3.1.2	<b>Animais</b> .....	37
3.2	OUTROS MATERIAIS.....	37
3.3	APARELHOS.....	38
3.4	FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS DE <i>Fucus vesiculosus</i> .....	39
3.5	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE.....	39
3.6	ANÁLISES QUÍMICAS.....	40
3.6.1	<b>Açúcares totais</b> .....	40
3.6.2	<b>Proteína</b> .....	40
3.6.3	<b>Sulfato</b> .....	40



3.7	MODELO DE ARTRITE INDUZIDA POR ZYMOSAN.....	41
3.7.1	<b>Grupo controle positivo.....</b>	<b>41</b>
3.7.2	<b>Grupo controle negativo.....</b>	<b>41</b>
3.7.3	<b>Grupos tratados com as populações da fucoidana obtidas após o fracionamento.....</b>	<b>42</b>
3.7.4	<b>Grupos tratados com antiinflamatórios não-esteroidais.....</b>	<b>43</b>
3.7.5	<b>Grupo tratado com inibidor da óxido nítrico sintase.....</b>	<b>43</b>
3.8	ANÁLISE DO INFLUXO CELULAR.....	44
3.9	DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (ON).....	44
3.10	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DAS SINÓVIAS.....	45
3.11	MÉTODOS ESTATÍSTICOS.....	48
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>49</b>
4.1	OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES DAS FUCOIDANAS DE <i>Fucus vesiculosus</i> .....	49
4.2	EFEITO DO TRATAMENTO COM OS COMPOSTOS ANALISADOS SOBRE O INFLUXO DE LEUCÓCITOS NO LAVADO ARTICULAR.....	51
4.3	EFEITO DO TRATAMENTO COM OS COMPOSTOS ANALISADOS SOBRE O NÍVEL DE NITRITO NO LAVADO ARTICULAR.....	54
4.4	EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM A FRAÇÃO F2 - 25 MG/KG SOBRE O INFLUXO DE LEUCÓCITOS E NÍVEL DE NITRITO NO LAVADO ARTICULAR.....	56
4.5	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DAS SINÓVIAS.....	59
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>65</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>71</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>72</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 ARTRITE REUMATÓIDE

A artrite reumatóide (AR) foi descrita pela primeira vez como uma entidade clínica, em 1800, pelo estudante francês de medicina Landre-Beauvais (SHORT, 1974). A artrite reumatóide é uma doença autoimune, inflamatória, crônica e de etiologia desconhecida, apresentando como principal sintoma, a persistente poliartrite simétrica que afeta principalmente as mãos, punhos e pés (KHURANA; BERNEY, 2005) (FIGURA 1).



FIGURA 1: Fotos das mãos e pés de uma paciente com artrite reumatóide. Fonte: [www.medstudents.com.br/image/reumat/imgerh19.htm](http://www.medstudents.com.br/image/reumat/imgerh19.htm)

#### 1.1.1 Etiologia

A etiologia ainda é desconhecida, porém, vários estudos sugerem o envolvimento de fatores comportamentais e genéticos na origem dessa doença (SCHWARTZ, 1993). Em relação ao aspecto genético, há uma frequência elevada de pacientes com artrite reumatóide que expressa o antígeno leucocitário humano DR4 (HLA -DR4) o qual faz parte do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) da classe II (CALIM; ELSWOOD; KLOUDA, 1989; CRILLY *et al.*, 1999). Algumas infecções

são descritas como desencadeantes da artrite reumatóide, por exemplo, a infecção pelo vírus Epstein-Barr (EBV) que seria um aspecto comportamental, em indivíduos geneticamente predispostos parece provocar uma resposta autoimune (KOURI *et al.*, 1990; SEWELL; TRENTHAM, 1993). Segundo FIRESTEIN (1997), o vírus Epstein-Barr e o colágeno tipo II possuem epítomos comuns e uma reação imunológica dirigida contra o EBV pode afetar a cartilagem articular rica em colágeno tipo II.

### **1.1.2 Mecanismos celulares**

A artrite reumatóide caracteriza-se pela sinovite crônica, formação do *pannus* e destruição óssea (TARNER *et al.*, 2005) (FIGURA 2), os sinoviócitos e os leucócitos como os macrófagos, linfócitos e neutrófilos são células envolvidas na inflamação da sinóvia (DENG; LENARDO, 2006).

Na artrite reumatóide, os macrófagos se acumulam na membrana sinovial e na junção cartilagem-*pannus* produzindo algumas citocinas pró-inflamatórias tais como,  $TNF\alpha$ , IL-1, quimiocinas (KINNE *et al.*, 2000) que estimulam a atração de leucócitos para a membrana sinovial com subsequente sinovite (FELDMANN; BRENNAN; MAINI, 1996). O  $TNF\alpha$  estimula a proliferação de sinoviócitos, induzindo a hiperplasia sinovial e a formação do *pannus* (DENG *et al.*, 1999; FELDMAN; MAINI, 2003) e a IL-1 estimula a proliferação de fibroblastos sinoviais que estão envolvidos na regulação da expressão de moléculas de adesão (VCAM-1), citocinas e metaloproteinases (PAP *et al.*, 2000).

As células T CD4+ encontram-se em grande quantidade na membrana sinovial de pacientes com artrite reumatóide (MATSUOKA *et al.*, 1991), acredita-se que ela seja desencadeada por estes linfócitos os quais reconhecem antígenos apresentados pelo

HLA-DR4 (CHOY; PANAYI, 2001). Esses linfócitos, uma vez ativados, estimulam monócitos, macrófagos, fibroblastos sinoviais e células B (CHIKANZA; KINGSLEY; PANAYI, 1995). Embora os linfócitos T sejam predominantes no infiltrado leucocitário, as células B também estão envolvidas na patogênese da artrite reumatóide (DE VITA *et al.*, 2002), produzindo o fator reumatóide (FR). Cerca de 80% dos portadores da AR apresentam esse fator (KHURANA; BERNEY, 2005). O termo FR engloba um grupo de auto-anticorpos das classes IgG, IgM e IgA que tem em comum a capacidade de reagir com diferentes epítomos da porção Fc da molécula de imunoglobulina G (IgG) humana (JONSSON; VALDIMARSSON, 1993; SHMERLING; DELBANCO, 1991).

Outro leucócito que merece destaque na patogênese da AR é o neutrófilo, uma das primeiras células a chegar no local acometido, o qual exerce um papel importante no quadro inflamatório agudo (PILLINGER; ABRAMSON, 1995). Os neutrófilos estimulam a produção de IL-8 e da anafilatoxina C5a no fluido sinovial as quais participam da atração de leucócitos para o interior da articulação e provocam a destruição da cartilagem através da produção de espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e enzimas proteolíticas (HARRIS, 1990; CHATHAM *et al.*, 1993).

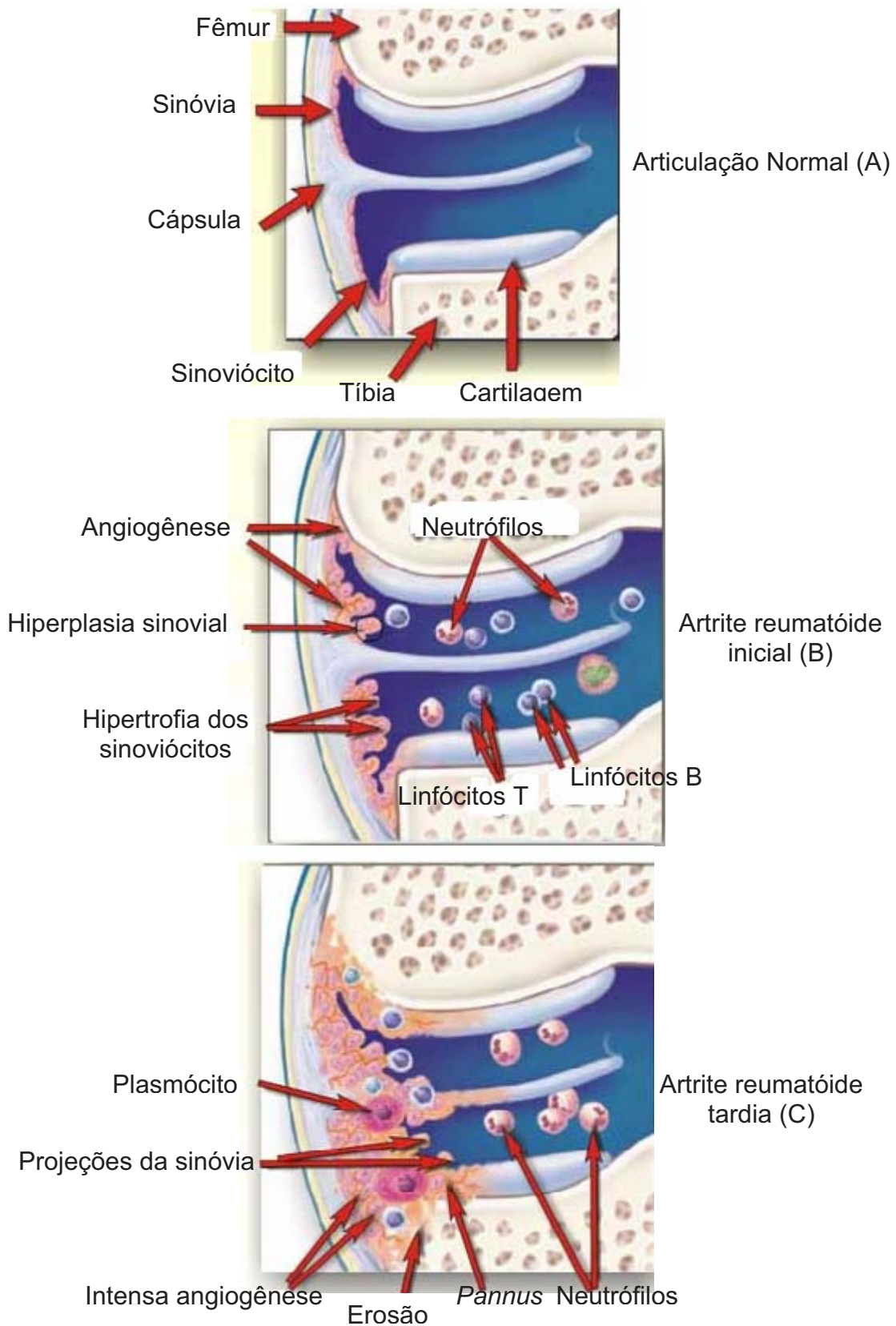


FIGURA 2: Articulação em indivíduo saudável (A), articulação em paciente com AR inicial (B), articulação em paciente com AR tardia (C). Fonte: modificado de <http://www.geocities.com/aferrante.geo/AR.htm>

### **1.1.3 Diagnóstico e tratamento**

O diagnóstico da artrite reumatóide engloba exames físicos, imunológicos, hematológicos e radiológicos (KHURANA; BERNEY, 2005). As características físicas do paciente incluem principalmente fadiga, inchaço nas mãos e limitação dos movimentos (MCGREGOR, 1995). Alguns exames imunológicos são realizados como a pesquisa do fator reumatóide (FR), contudo o FR também pode ser encontrado em outras patologias, atualmente vem sendo substituído pela pesquisa de auto-anticorpos anti-CCP (Cyclic Citrullinated peptide) que possui uma alta especificidade (VAN VENROOIJ; VOSSENAAR; ZENDMAN, 2004). O quadro laboratorial da artrite reumatóide pode conter entre outros achados, anemia, aumento da velocidade de hemossedimentação e da proteína C reativa (KHURANA; BERNEY, 2005; VOULGARI *et al.*, 1999; DAVIS *et al.*, 1997). Os danos nas articulações que aparecem no decorrer da doença são detectados em radiografias, exames de ressonância magnética e técnicas especiais de ultra-som (TEH *et al.*, 2003).

Os objetivos do tratamento da artrite reumatóide são aliviar a dor, reduzir a inflamação, evitar ou reduzir os danos nas articulações, prevenir manifestações extra-articulares e melhorar a função e o bem-estar do paciente (PISETSKY; St CLAIR, 2001; ALBERS *et al.*, 2001). No tratamento da AR são utilizados medicamentos que auxiliam na remissão dos sintomas como dor e inflamação, tais como os antiinflamatórios não esteroidais: ibuprofeno, naproxeno, os inibidores seletivos da ciclooxigenase-2: celecoxibe, rofecoxibe, alguns analgésicos: acetaminofeno, propoxifeno e glicocorticóides: cortisona, prednisona. Além desses medicamentos que ajudam a aliviar os sintomas, há aqueles que têm potencial para modificar o curso da doença que são os fármacos anti-reumáticos modificadores da doença, sendo o metotrexato o mais

usado. Os fármacos imunossupressores como a azatioprina e a ciclosporina são também utilizados no tratamento da AR (ARTRITHIS FOUNDATION, 2000; RAZA *et al.*, 2006; SCHIFF, 1997). Há novos recursos terapêuticos que são os fármacos conhecidos como modificadores de respostas biológicas, eles são o infliximab e o etanercept que são agentes farmacológicos bloqueadores do TNF $\alpha$ , e a anakinra que atua como antagonista da IL-1, porém, seus custos elevados e a administração por via parenteral limitam o uso dos mesmos (MORELAND, 1999; FURST *et al.*, 2000).

A escolha de um fármaco em particular ou de uma combinação terapêutica depende da gravidade da doença, das características individuais e do custo do tratamento (LAURINDO *et al.*, 2002). A terapia farmacológica de uma doença crônica engloba vários eventos adversos e elevados custos financeiros devido ao uso prolongado de medicamentos (MOURA; REYES, 2002; BAHIA; SIMRNER; OLIVEIRA, 2004). O uso contínuo de fármacos anti-reumáticos provoca efeitos potencialmente tóxicos, então uma avaliação risco-benefício deve ser feita. O Colégio Americano de Reumatologia recomenda a monitorização do uso desses medicamentos através de exames que avaliem dentre outras funções, a função hepática e renal (KHURANA; BERNEY, 2005). O tratamento da AR também engloba outras medidas como o repouso, uma dieta adequada, fisioterapia e atividades físicas direcionadas a necessidade de cada paciente (ACR, 1996).

## 1.2 ARTRITE INDUZIDA POR ZYMOSAN (Azy)

Os modelos animais de artrite reumatóide auxiliam na elucidação da fisiopatologia e permitem o estudo sobre tratamentos que amenizem ou inibem os processos inflamatórios envolvidos na artrite reumatóide (WILLIAMS, 1998). A artrite reumatóide pode ser induzida em animais por várias substâncias, tais como o zymosan, adjuvante, colágeno, antígeno e imunocomplexos (KANNAN; ORTMANN; KIMPEL, 2005). A artrite induzida por zymosan é um modelo de baixo custo operacional, tem início definido e permite a reprodução da lesão em prazo curto, podendo ser utilizado em rápidos protocolos experimentais (RAMOS, 2000).

O zymosan é um polissacarídeo derivado da parede celular do fungo *Saccharomyces cerevisiae*, o seu principal componente estrutural é a  $\beta$ -glucana que apresenta propriedades imunoestimulatórias (DERBOCIO *et al.*, 2005). O zymosan é reconhecido pelo receptor dectina 1 que é expresso em monócitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas (WILLMENT, 2003), após o reconhecimento estimula a produção de citocinas inflamatórias (TAYLON *et al.*, 2002). Este polissacarídeo também provoca a geração da anafilatoxina C5a, através da ativação da via alternativa do complemento, com subsequente ativação de monócitos e acúmulo de neutrófilos (SZABÓ *et al.*, 1995). A injeção de zymosan na cavidade articular provoca aumento da permeabilidade vascular levando a edema local e ainda acentuado influxo celular com predomínio de polimorfonucleares (PMNs). A quantidade de células presentes no líquido sinovial é máxima na sexta hora após a indução (ROCHA *et al.*, 2003).



### 1.3 O PAPEL DE LEUCÓCITOS NA INFLAMAÇÃO

O ponto chave para o desenvolvimento de um processo inflamatório, incluindo as doenças autoimunes como a artrite reumatóide, é o recrutamento de leucócitos para o local da inflamação (TARRANT; PATEL, 2006) (FIGURA 3). A migração de leucócitos para os sítios inflamatórios inicia-se com a captura celular e subsequente rolamento do leucócito sob o endotélio, a captura inicial dos leucócitos pelo endotélio é mediada primeiramente por proteínas da superfície celular, pertencentes à família selectina e seus ligantes (ROSEN; BERTOZZI, 1994). Há três grandes classes de selectinas expressadas em determinadas células que justificam suas denominações: L-(leucócito), P-(plaqueta) e E-(endotélio) selectina (TEDDER *et al.*, 1995). Os tipos de interações moleculares envolvidas na captura celular são geralmente fracas e levam ao rolamento de leucócitos no endotélio, após o processo de rolamento, os leucócitos tornam-se firmemente aderentes ao endotélio. A adesão firme é mediada por interações entre integrinas e seus ligantes que são membros da superfamília de imunoglobulina, conhecidos como moléculas de adesão intercelular (ICAMs), por exemplo, molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1), molécula de adesão celular plaqueta-endotélio 1 (PECAM-1) (YUSUF-MAKAGIANSAR *et al.*, 2002). Esse processo resulta em achatamento da célula e migração do leucócito entre células endoteliais adjacentes, um processo conhecido como diapedese (SZEKANECZ; KOCH, 2004; CROSS; BURY, 2003).

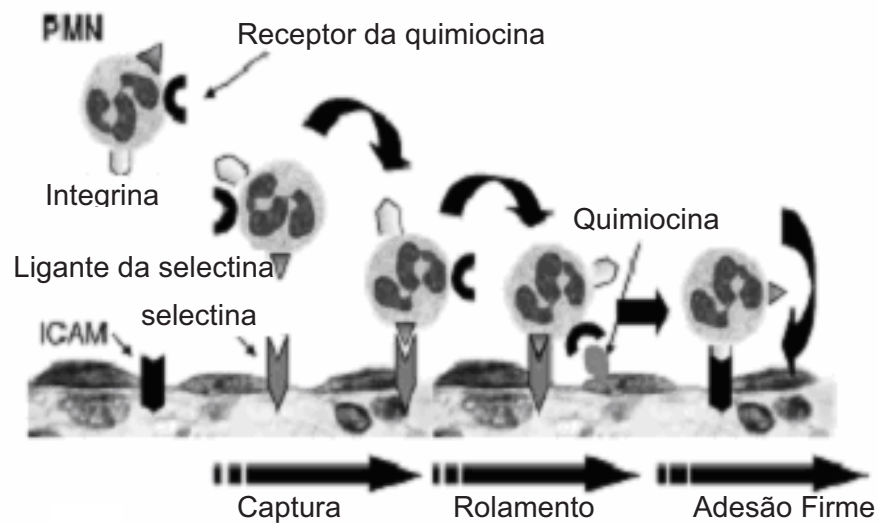


FIGURA 3 - Captura, rolamento e adesão firme do leucócito. Adaptado de TARRANT; PATEL, 2006.

A passagem de leucócitos para os sítios da inflamação é um processo altamente regulado, sendo um potencial alvo terapêutico nas doenças autoimunes crônicas, como a AR (TARRANT; PATEL, 2006). As moléculas de adesão bem como as interações receptor-citocina, que regulam a migração órgão-específica, são alvos ideais para regular negativamente a resposta inflamatória sem comprometer a vigilância imune contra infecções (MEAGER, 1999).

Nas articulações de pacientes com artrite reumatóide, o neutrófilo é a mais abundante de todas as células recrutadas durante o processo inflamatório (KITSIS; WEISSMANN, 1991). Esses são atraídos para o interior das articulações de pacientes com artrite reumatóide, por quimioatraentes comumente detectados no fluido sinovial reumatóide, tais como leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), C5a, IL-8 e TGF-β (fator transformador de crescimento beta). Uma vez recrutados para o interior da articulação são expostos a uma ampla variedade de citocinas pró-inflamatórias locais, como IL-1β, TNFα (fator de necrose tumoral alfa), GM-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos e

macrófagos) e IL-6 (FELDMAN *et al.*, 1990). As funções principais dos neutrófilos são o reconhecimento, a fagocitose e a destruição de antígenos protegendo o organismo de infecções (EDWARDS, 1994), também produzem quantidades significantes de espécies reativas de oxigênio (*Reactive Oxygen Species* – ROS) e enzimas proteolíticas (EDWARDS; HALLETT, 1997; EDWARDS, 1996; FIALKOW; WANG; DOWNEY, 2007). Embora as espécies reativas de oxigênio apresentem uma resposta fisiológica que é vantajosa para o hospedeiro, o processo é certamente desvantajoso quando provoca um excessivo dano ao tecido (VAN DEN WORM *et al.*, 2001). Os leucócitos polimorfonucleares (PMNs) possuem um papel importante na degradação da cartilagem, foi observado que o tecido *pannus* apresenta uma quantidade elevada de PMNs e que seus produtos são capazes de destruir o colágeno como também os polissacarídeos da cartilagem (HILBERT *et al.*, 2002).

#### 1.4 CICLOOXIGENASES E ANTIINFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIIS

A ciclooxigenase (COX) participa do processo inflamatório através da produção de prostanóides que são importantes mediadores pró-inflamatórios. Durante a fase inicial da inflamação a PGE<sub>2</sub> é o principal produto da ciclooxigenase (KAPOOR *et al.*, 2005). Há duas formas principais da ciclooxigenase, a ciclooxigenase 1 (COX-1) e a ciclooxigenase 2 (COX-2); a COX-1 é constitutivamente expressa em tecidos como o vascular, o renal e o gastrointestinal, enquanto que a COX-2 é uma isoforma induzida sobre a estimulação pró-inflamatória de várias citocinas (HERMANN, 2006). A COX-1 medeia as funções fisiológicas como a citoproteção gástrica e a manutenção da função renal, já a COX-2 está relacionada ao estímulo inflamatório (HOOZEMANS *et al.*, 2001).

A inibição da produção de prostaglandinas, principalmente da PGE<sub>2</sub>, pelo bloqueio das ciclooxigenases é um importante mecanismo antiinflamatório (DOAN; MASSAROTTI, 2005). A PGE<sub>2</sub> é um potente vasodilatador que favorece o influxo celular (ROCHA; PLUMB; COFFMAN, 2003), além disso é a principal responsável pela formação do eritema durante a inflamação aguda e indução da dor e febre (KAPOOR *et al.*, 2005).

Os antiinflamatórios não-esteroidais (AINEs) bloqueiam as ciclooxigenases e geralmente são indicados para o tratamento da dor inflamatória, a qual constitui o maior problema da medicina em pacientes sofrendo de doenças inflamatórias mais prevalentes, como a artrite reumatóide, a osteoartrite e a enxaqueca, porém, sabe-se que os inibidores da COX não só interferem no mecanismo da dor como também desordena várias funções do organismo (ZEILHOFER; BRUNE, 2006). A toxicidade gastrointestinal, a falência renal e os riscos cardiovasculares são eventos adversos bem conhecidos dos inibidores da COX (BRESALIER *et al.*, 2005). A toxicidade gastrointestinal está relacionada com a inibição da COX-1. O desenvolvimento de agentes antiinflamatórios inibidores da COX-2 que provocam uma redução dos eventos gastrointestinais é baseado no fato de que a COX-1 predomina no estômago, protegendo-o das prostaglandinas, enquanto que a COX-2 é induzida na inflamação causando dor, edema e desconforto (BERTOLINI; OTTANI; SANDRINI, 2001). Entretanto, os inibidores seletivos da COX-2 também diminuem a produção de PGI<sub>2</sub> vascular (ação de vasodilatação e anti-agregante) e podem afetar o equilíbrio entre eicosanóides protrombóticos e anti-trombóticos, o equilíbrio em favor de eicosanóides protrombóticos (tromboxano A<sub>2</sub>) pode levar a eventos trombóticos cardiovasculares (MUKHERJEE, 2002).

Atualmente, os inibidores seletivos da COX-2 como o celecoxibe, valdecoxibe, parecoxibe e rofecoxibe estão sendo substituídos pelo lumiracoxibe que é um novo tipo de inibidor seletivo da COX-2 (BRUNE; HINZ, 2004; MANGOLD *et al.*, 2004). O lumiracoxibe difere estruturalmente dos outros fármacos da mesma classe, é pouco lipofílico, possui alta seletividade e uma menor meia-vida plasmática comparada com os outros inibidores seletivos da COX-2, essas propriedades levam a uma menor exposição sistêmica deste fármaco, minimizando ou inibindo o surgimento de eventos adversos (FARKOUH *et al.*, 2004; SCHNITZER *et al.*, 2004).

### 1.5 ÓXIDO NÍTRICO E INIBIDORES DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE

O óxido nítrico (ON) é um radical livre, gasoso, com tempo de meia-vida menor que 15 segundos e na presença de oxigênio é rapidamente metabolizado a nitrato e nitrito (STAMLER; SINGEL; LOSCALZO, 1992). A síntese do óxido nítrico resulta da oxidação de um dos nitrogênios guanidino da L-arginina que é convertida em L-citrulina, esta reação é catalisada pela enzima NO-sintase (NOS) (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003). As isoformas da NOS são agrupadas em duas categorias, a NOS constitutiva (c-NOS), dependente de íons cálcio e de calmodulina e que está envolvida na sinalização celular, e a NOS induzível (i-NOS) produzida por macrófagos e outras células ativadas por citocinas (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991; MARLETTA, 1994). A produção de níveis baixos de óxido nítrico a partir da cNOS serve para regular alguns processos homeostáticos, enquanto que a geração de grandes quantidades de óxido nítrico a partir da iNOS explica o surgimento de efeitos pró-inflamatórios e citotóxicos (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991; MONCADA; HIGGS, 1993).

A produção de óxido nítrico contribui para a patogênese da artrite reumatóide através de uma variedade de caminhos, promove ações pró-inflamatórias como aumento da vasodilatação e permeabilidade, potencializa a produção de TNF e IL-1 pelos leucócitos e estimula a atividade angiogênica pelos monócitos e macrófagos (LANDER *et al.*, 1993). O óxido nítrico produzido pela estimulação de citocinas, em pacientes com artrite reumatóide, exerce efeitos nos condrócitos e células sinoviais com subsequente degradação da cartilagem articular (FIGURA 4) (ABRAMSON *et al.*, 2001; VAN'T HOF *et al.*, 2000), estes efeitos são inibição da síntese do colágeno e proteoglicano (TASKIRAN *et al.*, 1994), ativação de metaloproteinases (HIRAI *et al.*, 2001), aumento da susceptibilidade a danos por outros oxidantes (CLANCY *et al.*, 1997) e apoptose dos condrócitos (CLANCY *et al.*, 1997; VAN'T HOF *et al.*, 2000). No modelo de artrite induzida por zymosan, a membrana sinovial encontra-se infiltrada por macrófagos e granulócitos, e as citocinas produzidas por estas células inflamatórias levam a co-indução das enzimas COX e iNOS, provocando o surgimento da dor, edema e destruição tecidual (NEEDLEMAN; MANNING, 1999). O óxido nítrico produzido não só medeia a inflamação como também aumenta a atividade enzimática da COX (SALVEMINI *et al.*, 1993), observou-se que o ON ativa COX-1 na fase inicial da inflamação e potencializa COX-2 na fase final da inflamação induzida por carragenana na pele (TORIYABE *et al.*, 2004).

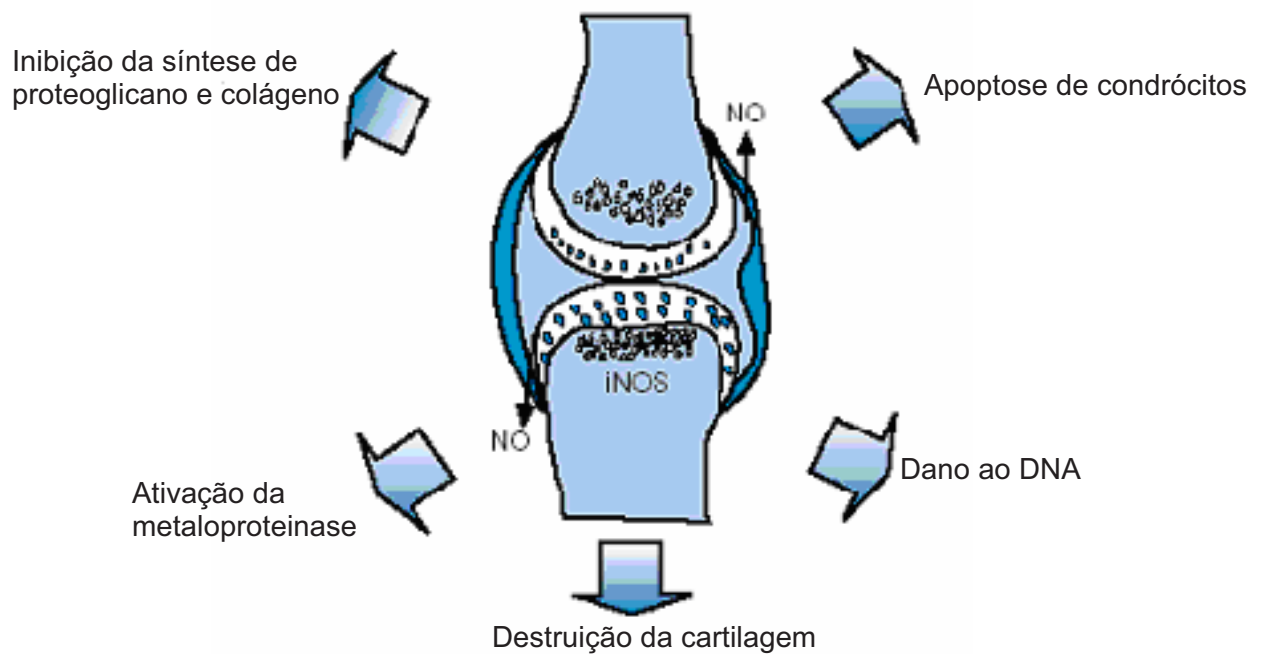


FIGURA 4 - Efeitos catabólicos da excessiva produção de óxido nítrico na cartilagem articular. Adaptado de ABRAMSON *et al* (2001).

A administração de inibidores da NOS reverteu a inflamação em vários modelos de artrites experimentais (STEFANOVIC-RACIC *et al.*, 1994; STEFANOVIC-RACIC *et al.*, 1995), inclusive reduziu a hiperalgesia e o influxo celular na artrite induzida por zymosan, em ratos, quando dados de forma profilática (ROCHA *et al.*, 2003). Estudos demonstraram que a administração simultânea de inibidores de iNOS e COX-2 produzem efeitos antinoceptivos na dor induzida por formalina e efeitos antipiréticos na febre induzida por fungo de Brewer em camundongos (DUDHGAONKAR *et al.*, 2004; BHAT *et al.*, 2005). Vários inibidores da NOS têm sido utilizados em estudos sobre os efeitos do óxido nítrico, tanto em células isoladas como *in vivo*, por exemplo os inibidores N<sup>G</sup>-nitro- L-arginina-metil-éster (L-NAME), o N-iminoetil-L-lisina (L-NIL) e a aminoguanidina (AG), o L-NIL e a AG apresentam uma alta seletividade para iNOS (VEIHELMANN *et al.*, 2002; ROCHA *et al.*, 2003). Os inibidores L-NAME e AG

administrados tanto profilático como terapeuticamente causam uma redução significativa no influxo celular dentro das cavidades articulares e membranas celulares (BEZERRA *et al.*, 2004) e o L-NIL possui a vantagem de não só aliviar os sintomas inflamatórios, através da dupla inibição (do ON e da COX-2 mediada pelo ON), como também de remover os efeitos citotóxicos do óxido nítrico (SALVEMINI *et al.*, 1995).

## 1.6 *Fucus vesiculosus*

### 1.6.1 Alga marrom

As algas marrons têm sido bastante estudadas por possuírem uma ampla variedade de polissacarídeos ácidos como ácidos algínicos, homofucanas e as heterofucanas (KLOAREG; QUATRANO, 1988; PERCIVAL; McDOWELL, 1967). As homofucanas são constituídas de fucose sulfatada e as heterofucanas além da fucose sulfatada contêm outros açúcares e ácidos urônicos (DUARTE *et al.*, 2001; ROCHA *et al.*, 2005). O termo fucana é usado para definir um polissacarídeo composto principalmente de L-fucose sulfatada e que contém menos de 10% de outros monossacarídeos, já o termo fucoídano pode ser utilizado para definir heterofucanas, contudo os termos fucana e fucoídano geralmente são considerados sinônimos (ROCHA *et al.*, 2006). As fucoídanas de algas marrons apresentam um padrão de sulfatação irregular e em algumas moléculas pode-se encontrar o grupo acetil (CHIZHOV *et al.*, 1999; BILAN *et al.*, 2002).



### 1.6.2 Fucoïdana de *Fucus vesiculosus*

As análises estruturais realizadas com fucoïdanas demonstraram que estes compostos apresentavam estrutura casual com graus de ramificações diferenciados. Divergências com relação à estrutura de fucoïdanas foram observadas em estudos realizados por Conchie; Percival (1950) e por Patankar *et al* (1993) com fucoïdanas extraídas de *Fucus vesiculosus*. Essas diferenças podem ser observadas na figura 5.

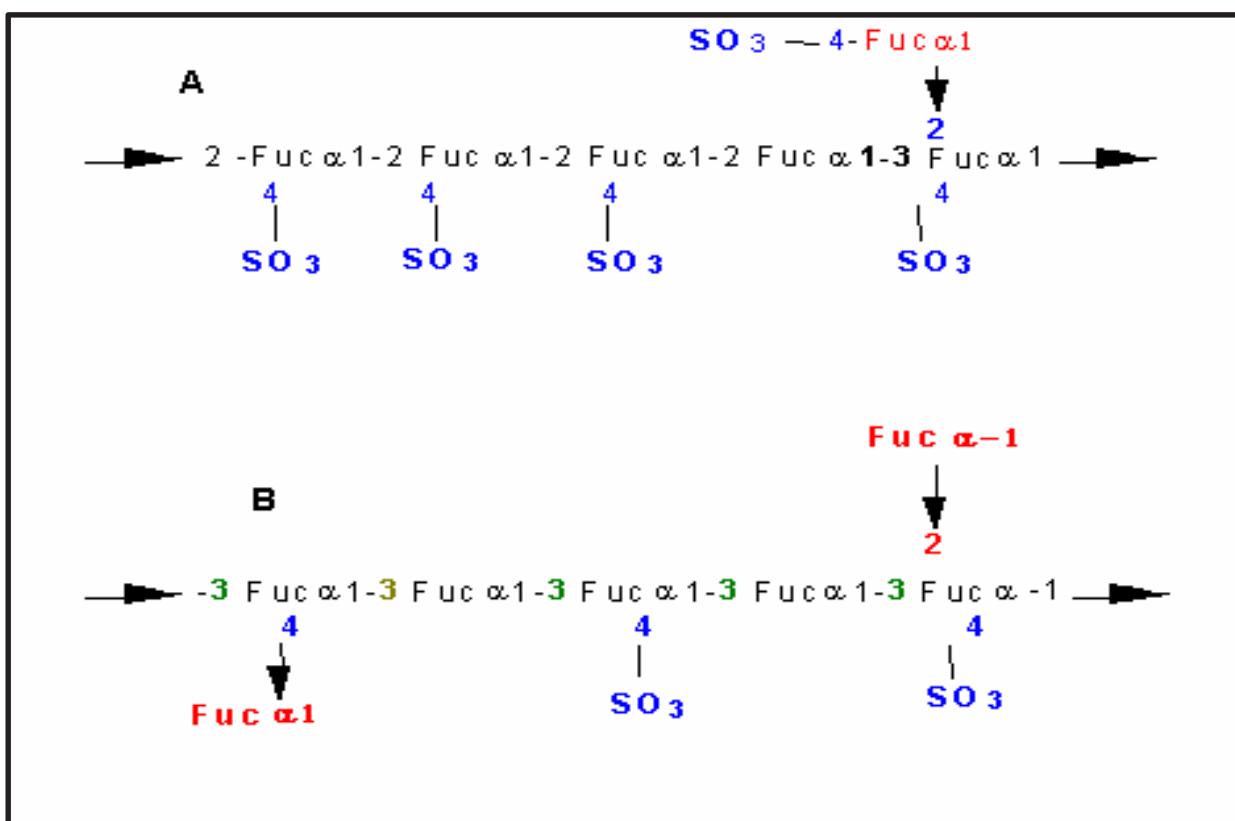


FIGURA 5 - Estruturas propostas para fucoïdanas de *Fucus vesiculosus*. (A) Modelo de Conchie; Percival, 1950. (B) Modelo de Patankar *et al.*, 1993.

Patankar *et al* (1993) verificaram que a fucoidana apresentava uma cadeia central constituída por fucoses unidas por ligações do tipo  $\alpha(1\rightarrow3)$  e sulfato no carbono 4 da fucose, os pontos de ramificações  $\alpha(1\rightarrow2)$  ocorriam a cada dois ou três resíduos de fucose. Eles verificaram ainda, a presença de um alto grau de ramificação na molécula, sendo a fucose o açúcar terminal e não a fucose 4-sulfato como proposto por Conchie; Percival (1950).

Uma fucoidana de *F. vesiculosus* também denominada de fucana é conhecida por exibir diversas funções biológicas, por exemplo, anti-angiogênica, anticomplemento, inibição do rolamento de leucócitos, regulação da produção de citocinas, bloqueio de P- e L-selectina, antioxidante (ROCHA *et al.*, 2006), apresenta também um efeito inibitório na indução da iNOS em macrófagos ativados inibindo a produção de óxido nítrico, o que pode explicar alguns dos efeitos antiinflamatórios da fucoidana (YANG *et al.*, 2006).

Em trabalhos atuais foi observado que o suplemento da fucoidana, em ratos com falência renal crônica, demonstrou efeitos de proteção renal (ZHANG *et al.*, 2003), em seguida descobriu-se sua ação na diminuição da proteinúria associada com a nefrite *Heyman* (ZHANG *et al.*, 2005). Em outro estudo, a fucoidana reduziu os efeitos tóxicos do oxalato nas células renais através de suas propriedades antioxidantes, a administração de fucoidana reverteu as mudanças bioquímicas anormais, provando ser um potencial candidato na amenização da toxicidade mediada pelo oxalato (VEENA *et al.*, 2006). Além disso, a suplementação exógena com estes polissacarídeos em ratos hiperoxalúricos é efetiva na diminuição do estresse oxidativo, pelo aumento das atividades das enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, a catalase e a

glutathiona peroxidase, e ainda pela limitação da peroxidação lipídica (VEENA *et al.*, 2007).

As fucoidanas de alto peso molecular inibem o rolamento de leucócitos em vênulas (LEY *et al.*, 1991; WESTON; PARISH, 1991) provavelmente pela ligação a L-selectina e subsequente inibição da adesão de linfócitos ao endotélio que é mediada por essa molécula de adesão (STOOLMAN; ROSEN, 1987). A atividade antiinflamatória da fucoidana de *F. vesiculosus* parece ser decorrente da capacidade de bloquear, *in vitro* e *in vivo*, as selectinas P e L (GRANERT, 1994). Segundo Patankar *et al* (1993) a fucoidana apresenta a capacidade de competir com o ligante natural Sialil Lewis X (Sle<sup>x</sup>) que é um tetrassacarídeo fucosilado reconhecido pelas selectinas.

Poucos trabalhos apresentam a ação da fucoidana de *F. vesiculosus* em modelos experimentais de artrite reumatóide, Xavier (2005) mostrou que a administração da fucoidana comercial de *F. vesiculosus* reduziu a inflamação na fase aguda da artrite induzida por zymosan, contudo não foi observado o efeito de suas frações. A maioria dos estudos biológicos descritos anteriormente usou uma mistura de polissacarídeos sulfatados de *F. vesiculosus*, disponíveis comercialmente sem se preocupar em fracionar o composto, porém, seria importante estabelecer uma relação entre a atividade biológica da fucoidana e sua estrutura molecular, assim ajudaria no esclarecimento da estrutura-atividade, o que seria útil para o surgimento de um novo agente terapêutico (BERTEAU; MULLOY, 2003).

A necessidade de agentes terapêuticos com o mínimo de eventos adversos, principalmente no tratamento de doenças crônicas como a artrite reumatóide, estimulou o nosso estudo sobre o efeito antiinflamatório da fucoidana de *F. vesiculosus* no modelo de artrite reumatóide, já que os fármacos utilizados nesta patologia apresentam, com o

uso prolongado, eventos adversos indesejáveis. Aliado a esta necessidade, outra pretensão do nosso estudo foi avaliar os efeitos antiinflamatórios das frações obtidas da fucoidana deste polímero para auxiliar no estabelecimento do(s) mecanismo(s) de ação destes polissacarídeos sulfatados, através da comparação com efeitos de compostos já conhecidos comercialmente que atuam em diferentes vias de ação.

## 2 OBJETIVOS

- Fracionar a fucoidana comercial obtida da alga marinha *Fucus vesiculosus*
- Analisar o efeito antiinflamatório das frações obtidas no modelo de artrite induzida por zymosan
- Investigar a ação profilática da fração com resultados mais satisfatórios.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 MATERIAL BIOLÓGICO**

##### **3.1.1 Fucoïdana de *Fucus vesiculosus***

A fucoïdana de *Fucus vesiculosus* foi adquirida comercialmente da Sigma Aldrich (USA).

##### **3.1.2 Animais**

A atividade antiinflamatória das frações obtidas de *F. vesiculosus* foi avaliada utilizando-se ratos da linhagem Wistar (*Ratus norvegicus albinus*) com dois meses de idade, pesando entre 150-240 g, machos e fêmeas, providos no biotério do Departamento de Bioquímica-UFRN. Todos os animais usados durante o experimento foram submetidos à dieta e água *ad libitum* em condições controladas de iluminação (ciclo 12 h claro/ escuro) e temperatura (25°C).

#### **3.2 OUTROS MATERIAIS**

- Agarose adquirida da Bio Rad Laboratories (Richmond, CA. EUA)
- Cloreto de sódio, ácido acético, ácido clorídrico da Reagen Quimibrás Indústrias Químicas S.A. (Rio de Janeiro, RJ, Brasil)
- Brometo de cetiltrimetilamônio (CETAVLON) da British Drug House Chemical (Poole, Inglaterra).
- EDTA (ácido etileno-diamino-tetra-acético) (Reagem)
- Zymosan (Sigma)
- Diclofenaco sódico (NOVARTIS)

- Lumiracoxibe (NOVARTIS)
- N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (SIGMA)
- Hematoxilina (Reagem)
- Eosina (Merck)
- Solução salina 0,9 % (estéril e apirogênica)
- Hidrato de cloral (Reagen)
- Condroitim 4 sulfato (extraído de cartilagem de baleia), condroitim 6 sulfato (extraído de cartilagem de tubarão) e dermatam sulfato (extraído da pele de porco) foram adquiridos da Seikagau Kogyo Co. (Tóquio, Japão)
- Acetona (Sigma)

### 3.3 APARELHOS

Além dos aparelhos habitualmente empregados em nosso laboratório podemos citar:

- Agitador orbital, modelo 255, FANEM Ltda. (São Paulo, SP, Brasil)
- Banho maria e estufas de temperaturas constantes, FANEM Ltda. (São Paulo, SP, Brasil)
- Câmaras para eletroforese em gel de agarose (Técnica Permatron Ltda., São Paulo, SP, Brasil)
- Medidor de pH, Orion Research model 701 A/ digital Ionalyzer (Cambridge, MA, EUA)
- Bomba Bio Rad Laboratories (Hercules, CA, EUA)
- Microscópio, Olympus modelo BX - 41(Tokyo, Japão)

### 3.4 FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS DE *FUCUS VESICULOSUS*

A fucoidana comercial foi pesada para um total de 1 g e dissolvida em 25 mL de NaCl (0,25M), acrescentou-se 25 mL de acetona sendo, então, mantida a 4°C durante 12 horas. Após centrifugação (15 min, 5.000 x g) obtivemos um precipitado que denominamos de F1. Ao sobrenadante adicionamos mais 25 mL de acetona e repetimos o processo usando concentrações crescentes de acetona. Com isso, foram obtidas as frações F1, F2 e F3 que correspondem aos precipitados, secos a pressão reduzida, obtidos a partir de 1,0; 2,0 e 3,0 volumes de acetona.

### 3.5 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

A agarose (0,6%) diluída em tampão 1,3 diamino propano acetato (PDA) 0,05 M, pH 9,0 foi colocado sobre lâminas de vidro medindo (7,5x 5,0x 0,2cm) e (7,5x 10x 0,2cm). Alíquotas de 5 µl (50 µg das amostras) foram aplicadas em canaletas no gel e submetidas à eletroforese (5 V/cm durante 1 hora), em caixa resfriada a 4°C. A origem das aplicações corresponde ao pólo negativo (DIETRICH; DIETRICH, 1977).

Os padrões de glicosaminoglicanos sulfatados (em vermelho de cresol) foram utilizados como referência de mobilidade na eletroforese. Após o tempo previsto de migração eletroforética para o sistema de tampão PDA, os compostos foram precipitados no gel de agarose pela submersão da lâmina por um tempo mínimo de duas horas, a temperatura ambiente, em CETAVLON 0,1% (brometo de N-cetil-N-N-N-trimetilamônio). Após a precipitação dos polissacarídeos, o gel foi seco sob uma corrente contínua de ar quente e corado com azul de toluidina 0,1 %, numa solução de ácido acético 1% e etanol 50%, onde o excesso de corante foi removido em solução



descolorante, uma solução preparada a partir de ácido acético 1% em etanol 50 %. A etapa de descoloração do gel de agarose foi então repetida até que o fundo da lâmina descorou-se completamente. Em seguida, o gel foi posto para secar a temperatura ambiente. As bandas de migração eletroforética das fucoidanas e dos padrões de glicosaminoglicanos sulfatados foram reveladas pela metacromasia específica de cada composto, aqueles compostos ricos em sulfato demonstraram uma coloração azul arroxeada característica (DIETRICH; DIETRICH, 1977).

### 3.6 ANÁLISES QUÍMICAS

#### 3.6.1 Açúcares totais

A quantificação dos açúcares totais foi realizada pelo método do fenol/ácido sulfúrico de acordo com Dubois *et al* (1956), empregando-se como padrão L-fucose como monossacarídeo padrão. As leituras foram realizadas a 490 nm.

#### 3.6.2 Proteína

O conteúdo de proteína foi determinado com o reagente de Coomassie blue R segundo o método de Spector (1978) e a leitura realizada a 595 nm, empregando-se como padrão albumina de soro bovina.

#### 3.6.3 Sulfato

O teor de sulfato total foi determinado após hidrólise ácida (ácido clorídrico 6N, 6 horas, 100°C) por turbidimetria pelo método da gelatina-bário (DODGSON; PRICE, 1962). O sulfato de sódio (1 mg/mL) foi utilizado como padrão sendo submetido às mesmas condições das amostras em estudo.

### 3.7 MODELO DE ARTRITE INDUZIDA POR ZYMOSAN

A indução da artrite por zymosan foi realizada após a anestesia dos animais com éter etílico, através da injeção intra-articular de 1 mg de zymosan, dissolvido em 50  $\mu$ L de solução salina a 0,9 %, no joelho direito dos ratos (ROCHA *et al.*, 1997, 1999, 2003). Após seis horas de instalação da artrite, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral (400 mg/Kg i.p.) e foi realizada a exsanguinação (animais mortos por decapitação) a fim de evitar a hemorragia intra-articular. Cada grupo de animais era composto por 6 animais (n=6). Os procedimentos cirúrgicos foram efetuados de acordo com o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (DHEW Publication, Bethesda, MD, USA).

#### 3.7.1 Grupo controle positivo

Aplicou-se 1 mg de zymosan (Sigma) intra-articular, dissolvido em 50  $\mu$ L de solução salina e os animais não receberam qualquer forma de tratamento, apenas 1 mL de solução salina 0,9 % intraperitoneal (i.p) após 1 hora da indução da artrite. O sacrifício desses animais foi realizado, sob anestesia, na 6<sup>a</sup> hora de indução da artrite.

#### 3.7.2 Grupo controle negativo

A este grupo foi administrado 50  $\mu$ L de solução salina estéril (0,9 %) intra-articular. Após uma hora da indução da artrite, esses animais receberam uma injeção (i.p) de 1 mL de solução salina 0,9 % e o sacrifício foi realizado após seis horas da indução da artrite.

### **3.7.3 Grupos tratados com as populações de fucoidana obtidas após o fracionamento**

Devido à pequena quantidade de massa obtida de F3, utilizou-se apenas as fucoidanas F1 e F2 nos ensaios de artrite induzida.

- tratamento

Aplicou-se de modo intra-articular 1 mg de zymosan dissolvido em 50  $\mu$ L de solução salina, após uma hora da indução os grupos de animais foram tratados com diferentes doses de F1 e F2 (10 mg/Kg, 25 mg/Kg e 50 mg/Kg). Após dissolução em 1 mL de água destilada, as frações foram administradas pela via intraperitoneal (i.p). O sacrifício dos animais ocorreu, sob anestesia, na 6<sup>a</sup> hora de indução da artrite. As doses de 10, 25 e 50 mg/Kg foram testadas entre outras concentrações, mas essas revelaram resultados significantes em relação aos parâmetros avaliados.

- Pré-tratamento

A intervenção profilática foi realizada com a população de fucoidana de determinada dose que apresentou o melhor resultado, a fim de verificar se sua resposta no pós-tratamento se reproduz no pré-tratamento. Os animais foram tratados, por via intraperitoneal, trinta minutos antes da indução da artrite por zymosan e após seis horas da indução foram sacrificados.

#### **3.7.4 Grupos tratados com antiinflamatórios não-esteroidais**

Os animais foram tratados com diclofenaco sódico - inibidor não seletivo da ciclooxigenase - 10 mg/Kg (via intraperitoneal – i.p) e lumiracoxibe - inibidor seletivo da ciclooxigenase 2 - 5 mg/Kg (via oral – v.o), após uma hora de indução da artrite com zymosan. Sob anestesia, seis horas após a indução, os animais foram sacrificados. As doses dos fármacos diclofenaco e lumiracoxibe foram escolhidas com base em outros autores que empregaram modelos experimentais em ratos com esses antiinflamatórios (TEGEDER *et al.*, 2000; MARTINEZ; OLIVEIRA; FORTES, 1999; FABRICIO *et al.*, 2005).

#### **3.7.5 Grupo tratado com inibidor da óxido nítrico sintase**

A aplicação intra-articular de 1 mg de zymosan dissolvido em 50 µL de solução salina provocou o quadro inflamatório. Após uma hora da indução, os animais foram tratados com um inibidor da óxido nítrico sintase não específico, o éster metil N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina (L-NAME) 30 mg/Kg (intraperitonealmente – i.p). O sacrifício dos animais ocorreu, sob anestesia, na 6<sup>a</sup> hora de indução da artrite. A dose do composto L-NAME foi escolhida com base em outros autores que empregaram modelos experimentais em ratos com esse composto (LUI; LEE, 2004; TEDESCO *et al.*, 2002).

### 3.8 ANÁLISE DO INFLUXO CELULAR

A coleta do líquido sinovial foi realizada através da lavagem na cavidade articular, aplicando-se duas vezes 0,2 mL de tampão fosfato de sódio (0,15 M e pH 7,4) contendo 37,2 mg de EDTA (0,01 M). O lavado articular foi obtido por aspiração e mantido em banho de gelo. Utilizou-se amostras desse lavado para contagem do número total de células na câmara de Neubauer, diluídas em solução de Turk (composto de ácido acético glacial, azul de metileno e água destilada), líquido diluidor que hemolisa as hemácias e preserva as células nucleadas (BEZERRA *et al.*, 2004; ROCHA *et al.*, 2003).

### 3.9 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (ON)

O líquido articular foi centrifugado (3000 g/ 10min/ 4° C) e o sobrenadante foi estocado a – 4° C para dosagem de óxido nítrico. A produção de óxido nítrico no lavado sinovial foi determinada pela quantificação dos níveis de  $\text{NO}_2^-$  (nitrito) /  $\text{NO}_3^-$  (nitrato) pelo método de Griess (GRANGER *et al.*, 1996). Os níveis totais de  $\text{NO}_2^-$  /  $\text{NO}_3^-$  foram determinados com o  $\text{NO}_3^-$  nas amostras (0,08 mL) convertido a  $\text{NO}_2^-$  pela incubação de 0,01 mL de nitrato redutase de espécies de *Aspergillus* (1 unidade/mL) e 0,01 mL de NADPH (1mM) por 30 minutos a 37 ° C. Os níveis de nitrito foram determinados por espectrofotômetro (540 nm), comparando a absorbância de 0,1 mL da amostra após a adição de 0,1 mL do reagente de Griess (ácido sulfanílico a 1 %, N-1naftil-etilenodiamino 0,1 % e ácido fosfórico a 5 %) com a absorbância dos padrões de nitrito (1-100  $\mu\text{M}$ ).

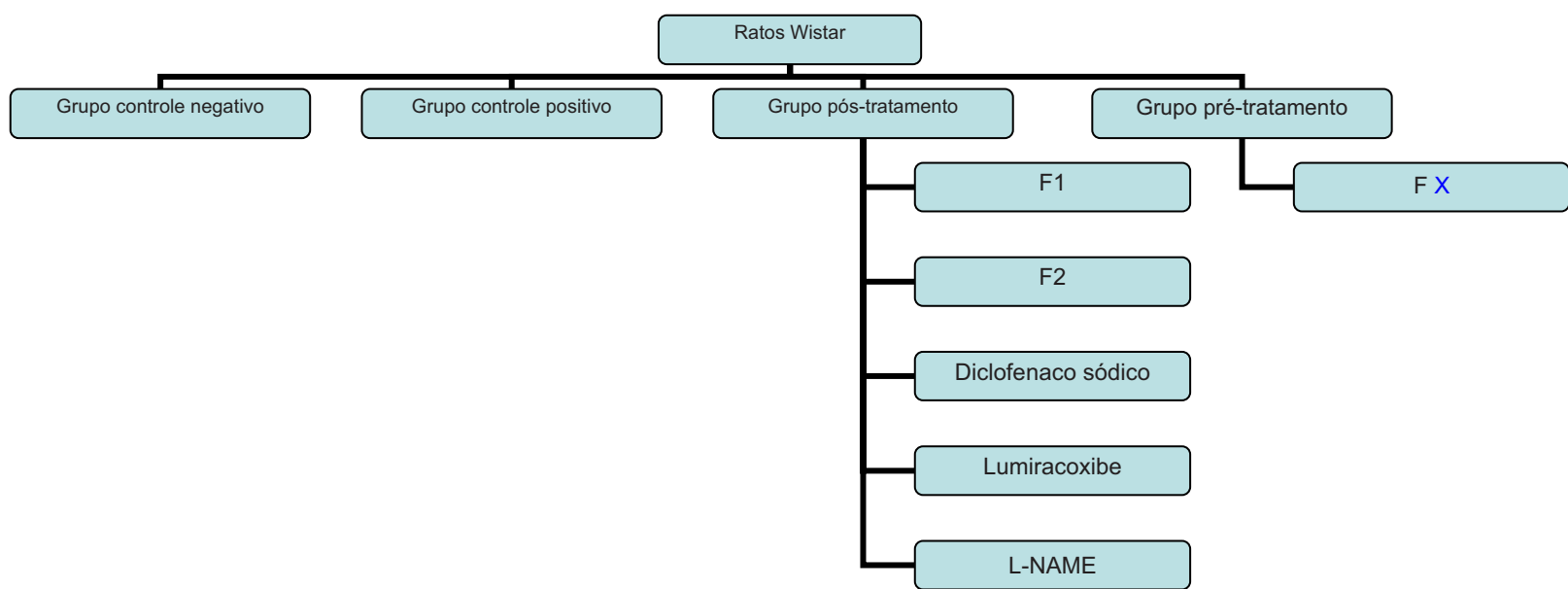
### 3.10 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DAS SINÓVIAS

Após a coleta do lavado sinovial, a sinóvia foi coletada e fixada em formol a 10%, seguindo-se do processamento por métodos de rotina até a inclusão em blocos de parafina. A desidratação e outras etapas do tratamento tiveram como objetivo a extração da água dos tecidos pela submersão dos mesmos em banhos com concentrações crescentes de etanol a 70% até etanol absoluto. Este solvente foi então substituído por xilol, substância miscível com o meio de inclusão. Desta forma, os tecidos tornaram-se translúcidos, razão porque essa etapa foi denominada diafanização ou clareamento. Por último, foi realizada a inclusão dos fragmentos mergulhados em parafina. Os cortes teciduais foram colocados em moldes retangulares, formando blocos que foram subseqüentemente seccionados por navalhas de aço do micrótomo de 4  $\mu\text{m}$  visando a coloração por hematoxilina-eosina (H&E). A avaliação histológica foi feita empregando-se interpretação subjetiva de vários parâmetros como o exsudato inflamatório, comprometimento do exsudato inflamatório (perivascular, intersticial e epitélio sinovial), depósitos fibrinóides e necrose, escolhidos com base em achados de autores que empregaram modelos experimentais de artrite em ratos Wistar. Atribuiu-se um valor de escore para cada parâmetro analisado (QUADRO 1). A figura 6 representa o esquema do protocolo experimental.

QUADRO 1: valores de escores para cada parâmetro

Escore 0	Parâmetro ausente
Escore 1	Parâmetro presente com intensidade leve
Escore 2	Parâmetro presente com intensidade moderada
Escore 3	Parâmetro presente com intensidade acentuada

Fonte: Bezerra et al (2004); Harris (1993); Ramos et al (2001)



Salina

Zymosan

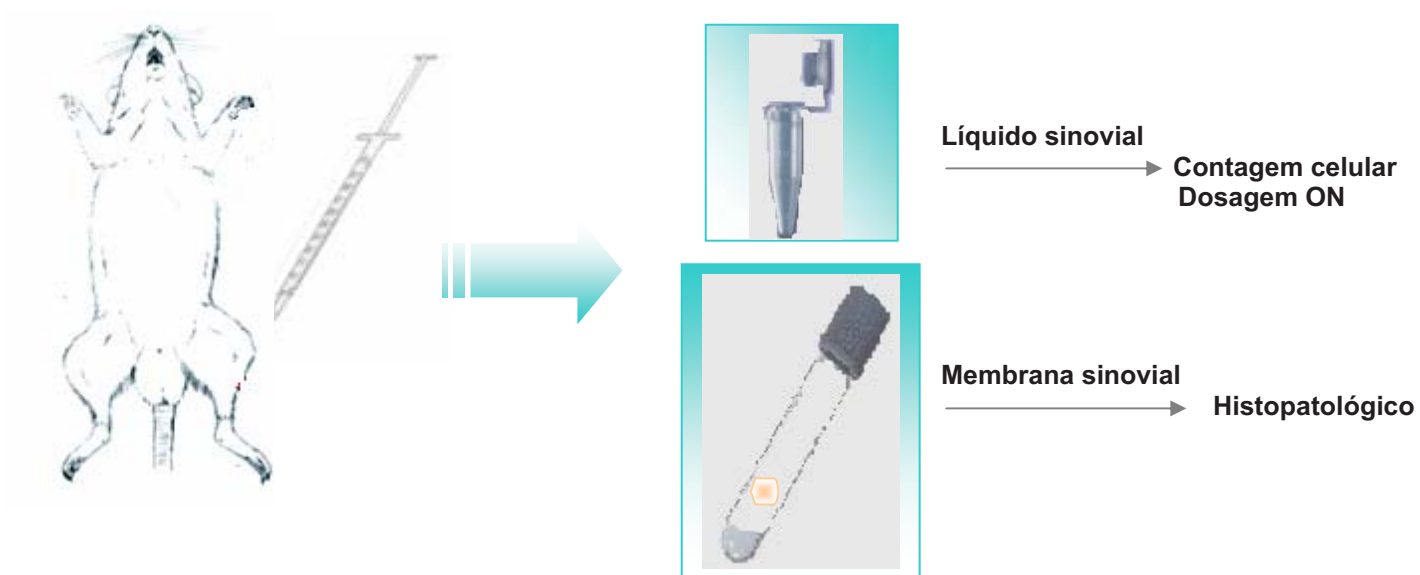


FIGURA 6: Esquema do protocolo experimental



### 3.11 MÉTODOS ESTATÍSTICOS

Para a análise estatística dos grupos experimentais no modelo de artrite induzida por zymosan em ratos da linhagem Wistar foram utilizados os seguintes testes:

- Teste de Kolmogorov-Smirnov, para avaliar a distribuição normal dos grupos analisados com  $p < 0,05$ ;
- Estatística de Bartlett para verificar a homogeneidade das variâncias;
- Análise de variância (ANOVA) com nível de significância de  $p < 0.05$
- Teste de Tukey-Kramer, para determinar que grupos diferem entre os valores obtidos para os grupos controle e experimental (comparações múltiplas).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES DE FUCOIDANAS DE *Fucus vesiculosus*.

Foram utilizados polissacarídeos sulfatados, fucoidanas, obtidas a partir da fucoidana total proveniente da alga *Fucus vesiculosus*, por precipitação diferencial em acetona nas concentrações 1, 2 e 3 volumes. Estas frações, F1, F2 e F3 foram denominadas de acordo com o volume de acetona utilizado no processo de fracionamento. A fração F1 apresentou maior rendimento em relação às demais frações (52,3%), as frações F2 e F3 apresentaram rendimentos da ordem de 36,7% e 10,7%, respectivamente. Tendo em vista um melhor rendimento de F1 e F2, ambas foram utilizadas nos experimentos.

As frações de polissacarídeos F1, F2 e F3 foram submetidas à eletroforese em gel de agarose em tampão PDA 0,05 M a pH 9,0. Analisando-se a figura 7, pode-se concluir que a fucoidana total (FT) apresentou forte polidispersão e que as três frações obtidas apresentaram diferentes migrações eletroforéticas. Observando-se esta mesma figura, verificou-se que a fração F2 apresentou migração intermediária entre as frações F1 e F3. Os padrões de referência utilizados foram os glicosaminoglicanos sulfatados condroitim, dermatan e heparan sulfatos, uma vez que não se tinha padrões específicos para polissacarídeos de algas.

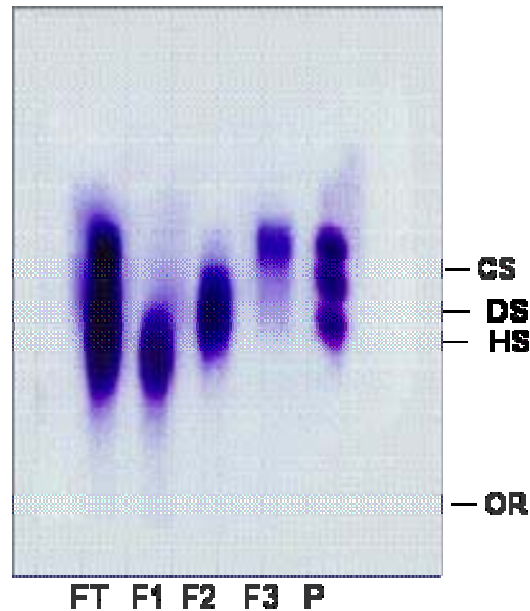


FIGURA 7 - Perfil eletroforético das frações das fucoidanas de *Fucus vesiculosus*. As frações obtidas pela precipitação em acetona foram submetidas à eletroforese em gel de agarose em tampão 1,3 diaminoprapano acetato, 0,05 M pH 9,0. FT, F1, F2 e F3 foram submetidas à eletroforese, precipitadas no gel com CETAVLON, secadas e coradas em azul de toluidina, de acordo com o que já foi dito em métodos. Os padrões utilizados (P) foram os GAGS condroitim (CS); dermatan (DS) e heparam sulfato (HS). Sendo OR origem.

As dosagens químicas foram realizadas a fim de caracterizar as frações quanto ao teor de sulfato, proteínas e açúcares totais (QUADRO 2). O maior teor de sulfato foi detectado na fração 1 (55%), seguido da fração 2 (45%) e a fração 3 apresentou o menor teor (26%). Observa-se em algumas frações, um percentual total maior que 100% devido à presença de outros componentes os quais não foram dosados como, a umidade, sais, entre outros. Pode-se ter também, um percentual menor que 100% relativo à perda de material durante o procedimento da análise.

QUADRO 2 - Constituintes químicos da fucoidana total e de suas frações obtidas.

Fração	*Proteína %	**Açúcares totais %	***Sulfato %
FT	0,13	58,1	40
F1	0,50	45,3	55
F2	0,80	55,3	45
F3	0,70	41,5	26

\*Spector, 1978    \*\*Método Dubois et al., 1956    \*\*\*Método Dogson; Price, 1962

#### 4.2 EFEITO DO TRATAMENTO COM OS COMPOSTOS ANALISADOS SOBRE O INFLUXO DE LEUCÓCITOS NO LAVADO ARTICULAR.

O influxo de leucócitos é um dos parâmetros utilizados no processo de avaliação de um quadro inflamatório. Os ratos receberam uma injeção intra-articular de zymosan no joelho direito contendo 1 mg de zymosan diluído em 50  $\mu$ L de solução salina e após 1 hora foram administrados os compostos analisados. Após 6 horas de indução da inflamação por zymosan, a contagem de leucócitos foi realizada no lavado articular.

A figura 8 mostra os efeitos dos compostos analisados sobre o influxo celular. Em relação a F1, todas as concentrações testadas apresentaram redução do influxo de leucócitos em relação ao grupo controle positivo. Não foi observado diferença significativa entre o efeito apresentado por F1 25 mg/Kg e 50 mg/Kg ( $p > 0,05$ ).

Nos testes realizados com a F2, nota-se que essa fração apresentou o mesmo comportamento da fração 1. A fração F2 nas doses de 25 mg/Kg e 50 mg/Kg também não apresentou diferença significativa entre si, porém, vale salientar que de

forma diferenciada de F1, a fração F2 não apresentou efeito inibitório sobre o influxo de leucócitos quando administrada na dose de 10 mg/Kg.

Os AINES (antiinflamatórios não esteroidais) são inibidores das ciclooxigenases e, portanto, importantes fármacos antiinflamatórios. Dois fármacos que agem, via ciclooxigenase 1 e 2: o diclofenaco sódico, e via ciclooxigenase 2: o lumiracoxibe foram utilizados nos experimentos. Após 6 horas de indução por zymosan, os grupos tratados com o diclofenaco sódico 10 mg/Kg i.p e Lumiracoxibe 5 mg/Kg v.o apresentaram uma redução do influxo de leucócitos no lavado articular de forma significativa em comparação ao grupo controle positivo,  $p < 0,001$  e  $p < 0,01$ , respectivamente. Contudo, eles não apresentaram diferença significativa entre si ( $p > 0,05$ ).

Observa-se ainda na figura 8 que o éster de metil N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina (L-NAME), inibidor não seletivo da óxido nítrico sintase, na dose de 30 mg/Kg administrado intraperitonealmente promoveu uma ação inibitória sobre a migração de leucócitos de forma significativa em relação ao grupo não-tratado. Os compostos diclofenaco, lumiracoxibe e L-NAME não apresentaram diferença significativa entre si ( $p > 0,05$ ).

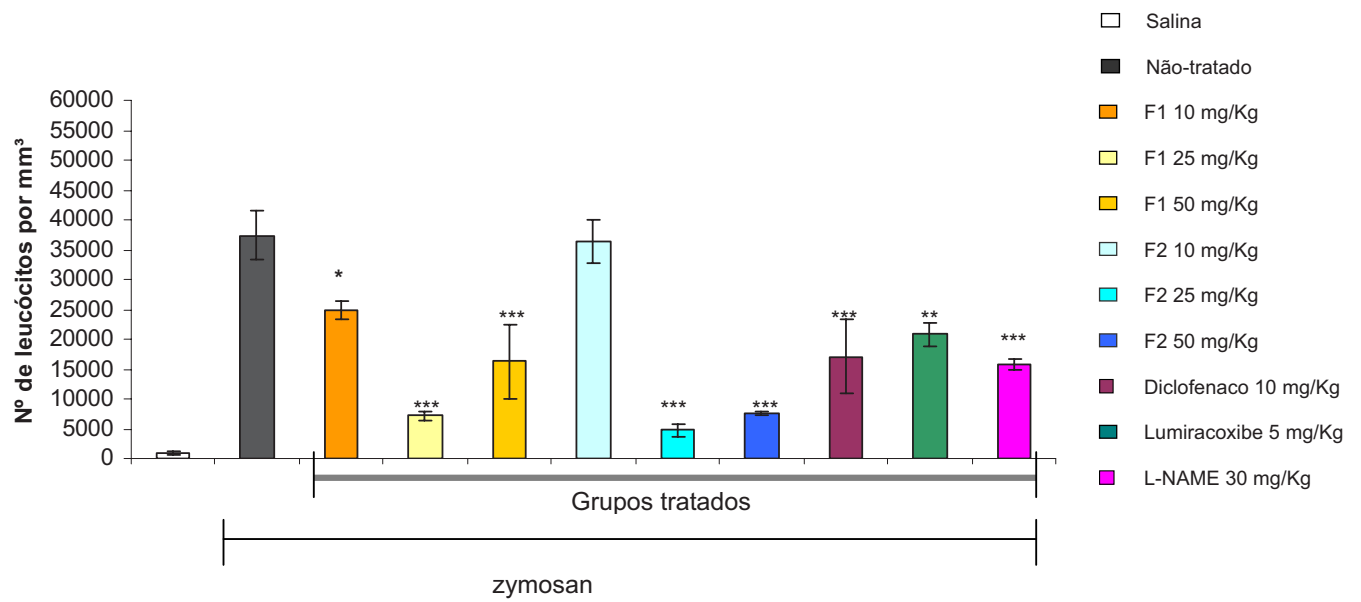


FIGURA 8 - Efeito da fração F1 (10, 25 e 50 mg/Kg i.p), F2 (10, 25 e 50 mg/Kg i.p), diclofenaco sódico (10 mg/Kg i.p), lumiracoxibe (5 mg/Kg v.o) e L-NAME (30 mg/Kg i.p) no influxo celular, no modelo de artrite induzida por zymosan em ratos Wistar – controle positivo: zymosan (grupo não-tratado); controle negativo: salina. \*P < 0,05, \*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,001 em relação ao grupo zymosan (ANOVA univariada seguida de teste de Tukey).

#### 4.3 EFEITO DO TRATAMENTO COM OS COMPOSTOS ANALISADOS SOBRE O NÍVEL DE NITRITO NO LAVADO ARTICULAR.

As frações F1 e F2 nas doses de 10, 25 e 50 mg/Kg quando aplicadas 1 h após a indução da artrite, provocaram uma diminuição na produção de óxido nítrico, no fluido sinovial, após a 6<sup>a</sup> hora da indução da artrite. Analisando a figura 9, nota-se que F1 e F2 em todas as doses testadas reduziram de forma significativa o nível de nitrito ( $P < 0,001$ ) em relação ao grupo controle positivo.

Os compostos diclofenaco sódico 10 mg/Kg i.p, lumiracoxibe 5 mg/Kg v.o e L-NAME 30 mg/Kg i.p apresentaram uma redução significativa do nível de nitrito no lavado articular em comparação ao grupo que só recebeu zymosan. Os antiinflamatórios diclofenaco sódico e lumiracoxibe apresentaram diferença significativa entre si ( $p < 0,01$ ).

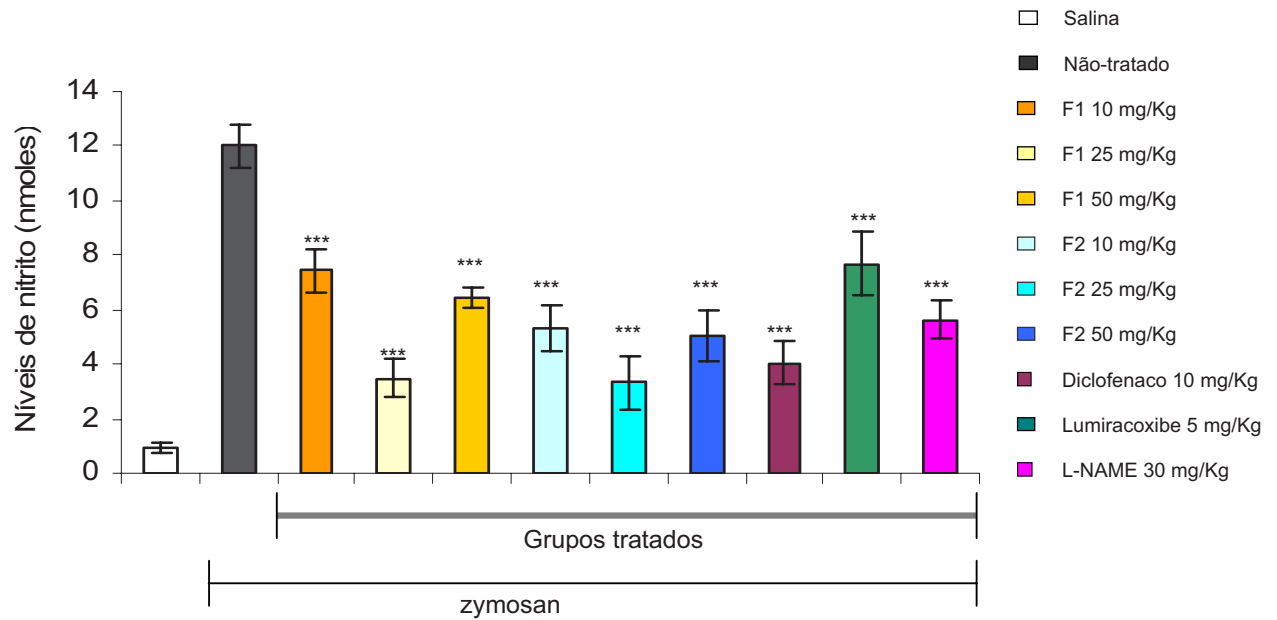


FIGURA 9- Efeito da fração F1 (10, 25 e 50 mg/Kg i.p), F2 (10, 25 e 50 mg/Kg i.p), diclofenaco sódico (10 mg/Kg i.p), lumiracoxibe (5 mg/Kg v.o) e L-NAME (30 mg/Kg i.p) no nível de nitrito, no modelo de artrite induzida por zymosan em ratos Wistar – controle positivo: zymosan (grupo não-tratado); controle negativo: salina. \*\*\* $P < 0,001$  em relação ao grupo zymosan (ANOVA univariada seguida de teste de Tukey).



#### 4.4 EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM A FRAÇÃO 2 - 25 MG/KG SOBRE O INFLUXO DE LEUCÓCITOS E NÍVEL DE NITRITO NO LAVADO ARTICULAR.

Em relação à redução do influxo de leucócitos no lavado articular, a fração 2 na dose de 25 mg/Kg demonstrou melhor resultado tomando como base o valor absoluto de leucócitos, apresentando uma média de leucócitos em torno de 4.800/mm<sup>3</sup> (FIGURA 8). De forma semelhante à redução do influxo de leucócitos, a fração 2 na dose de 25 mg/Kg também demonstrou melhor resultado na redução da produção de óxido nítrico, em torno de 3,3 nmoles (FIGURA 9) no fluido sinovial, em relação as demais doses e compostos testados. Com base nesses resultados, verificamos se F2 25 mg/Kg também produziria os mesmos efeitos se aplicado antes (intervenção profilática) da indução da artrite pelo zymosan. A fração 2 - 25 mg/Kg foi administrada 30 minutos antes da indução da artrite, ou seja, os ratos receberam uma injeção intra-articular de zymosan no joelho direito após a aplicação intra-peritoneal da fração 2. A figura 10 mostra que o pré-tratamento com a F2 25 mg/Kg reduziu o número de leucócitos em relação ao grupo que recebeu apenas zymosan, contudo, esta redução foi menor do que quando administrada após a artrite induzida.

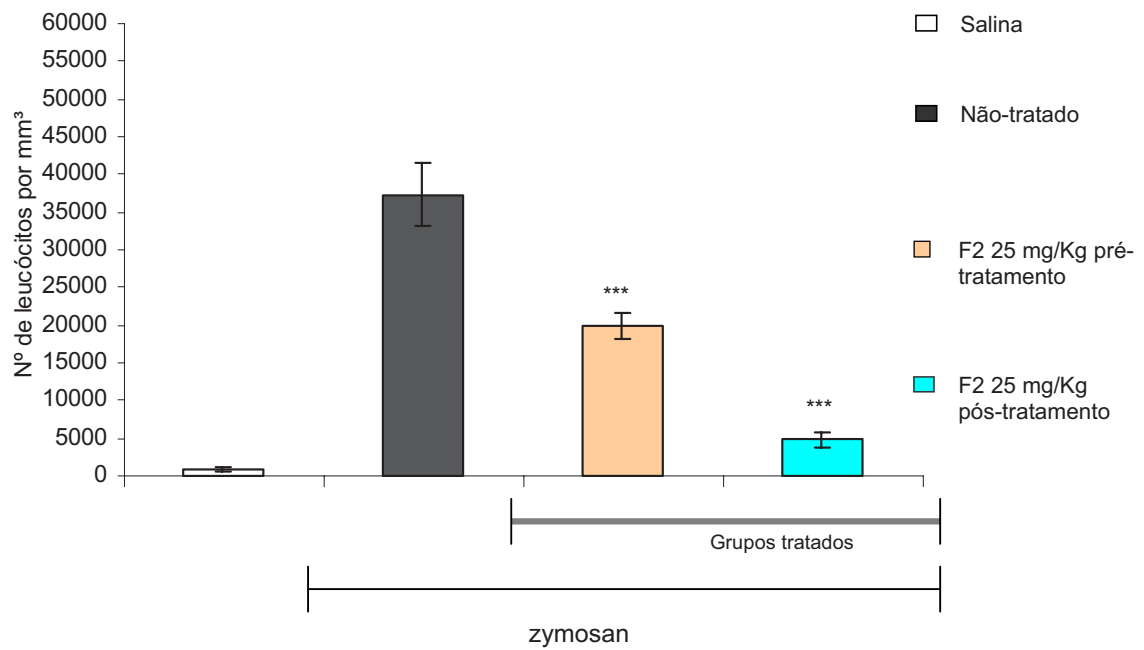


FIGURA 10 - Efeito da fração F2 (25 mg/Kg i.p) aplicada antes da indução do zimosan e após indução, no influxo celular, no modelo de artrite induzida por zimosan em ratos Wistar – controle positivo: zimosan (grupo não-tratado); controle negativo: salina. \*\*\*P < 0,001 em relação ao grupo zimosan (ANOVA univariada seguida de teste de Tukey).

Na figura 11, nota-se também que após a 6ª hora da indução da artrite, a F2 25 mg/Kg aplicada profilaticamente provocou uma redução bastante significativa nos níveis de nitrito ( $p < 0,001$ ) e não apresentou diferença significativa com a aplicada terapêuticamente ( $p > 0,05$ ).

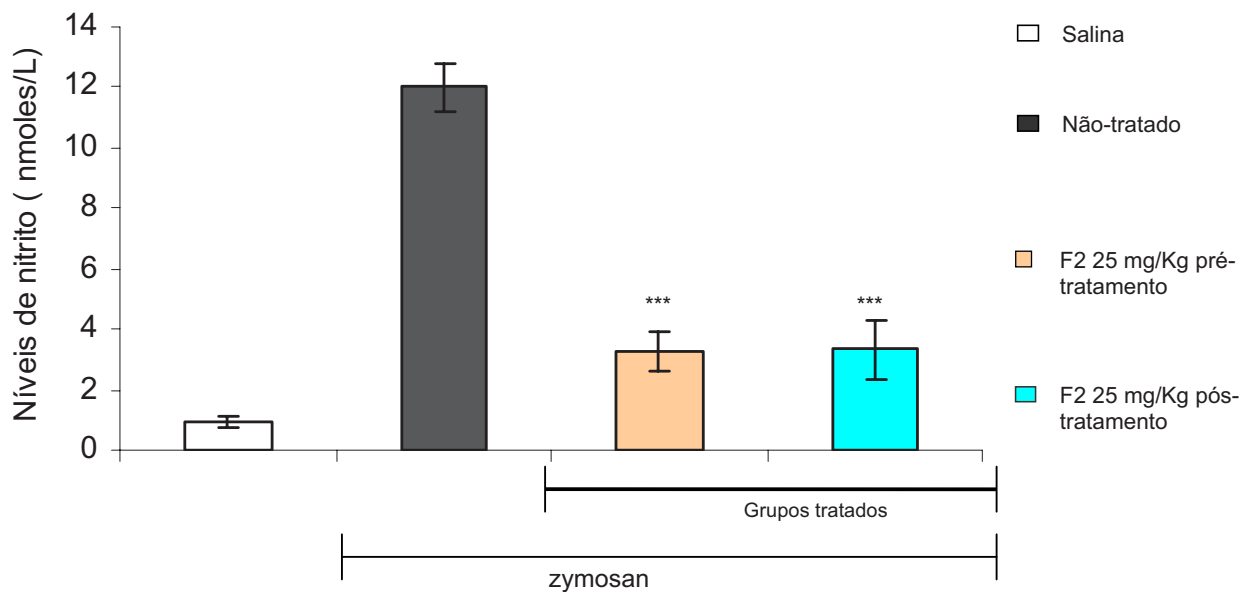


FIGURA 11 - Efeito da fração F2 (25 mg/Kg i.p) aplicada antes da indução do zymosan e após indução, no nível de nitrito, no modelo de artrite induzida por zymosan em ratos Wistar – controle positivo: zymosan (grupo não-tratado); controle negativo: salina. \*\*\* $P < 0,001$  em relação ao grupo zymosan (ANOVA univariada seguida de teste de Tukey).

#### 4.5 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DAS SINÓVIAS

As análises histológicas das sinovias foram realizadas com o objetivo de avaliar o processo inflamatório e verificar a ação dos compostos neste processo.

Para todos os polissacarídeos testados, assim como, controles positivo (zymosan) e negativo (salina) foram atribuídos valores de escore (QUADRO 1 – ver métodos), baseados em: exsudato inflamatório, comprometimento do exsudato inflamatório (perivascular, intersticial e epitélio sinovial), depósitos fibrinóides e necrose.

- Grupo controle negativo

Após 6 horas da injeção intraarticular de solução salina, as sinóvias coradas com hematoxilina-eosina (H&E) não apresentaram anormalidades e reação inflamatória, assim os parâmetros histopatológicos estavam ausentes (FIGURA 12).

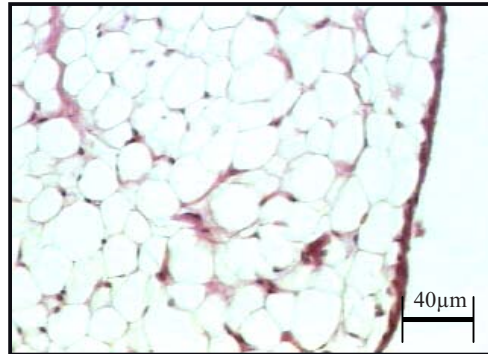


FIGURA 12 - **Representação histopatológica da sinóvia de ratos** que receberam apenas solução salina intraarticular (H&E, x 200)

- Grupo controle positivo

As visualizações das lâminas após a 6<sup>a</sup> hora da aplicação do zymosan apresentaram um intenso influxo leucocitário (escore 3) na sinóvia (FIGURA 13). Observamos também alterações na membrana sinovial decorrentes da ação deste composto.

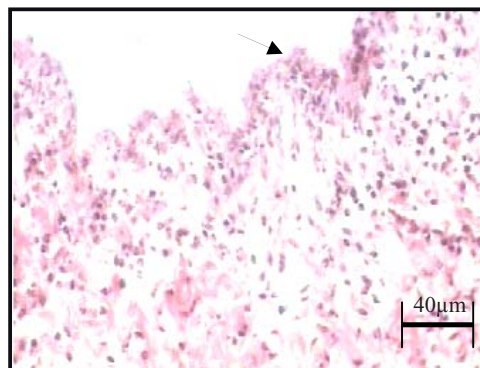


FIGURA 13 - **Representação histopatológica da sinóvia de ratos** que receberam zymosan intraarticular e não foram tratados (H&E, x 200). As setas indicam presença de leucócitos na sinóvia.

- Grupos tratados com fração 1 - 25 mg/Kg (FIGURA 14) e 50 mg/Kg (FIGURA 15)

Após 1 hora da indução da artrite, os animais receberam o tratamento e na 6<sup>a</sup> hora ocorreu o sacrifício. Analisando a figura 14 observa-se um exsudato inflamatório de polimorfonucleares na sinóvia (escore 1), sendo os demais parâmetros ausentes (escore 0). Na figura 15 nota-se presença de influxo de polimorfonucleares na sinóvia (escore 2). Os resultados mostram que a fração F1 exerceu uma ação antiinflamatória nas duas doses testadas. Observa-se ainda, que a fração de 25 mg/Kg apresentou maior efeito antiinflamatório.

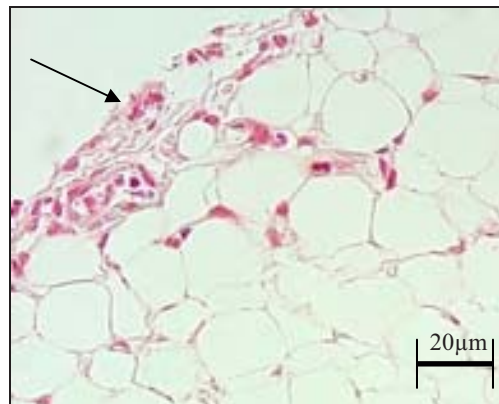


FIGURA 14 - **Representação histopatológica da sinóvia de ratos** que receberam zymosan intraarticular e foram tratados com a fração 1 (25 mg/Kg) (H&E, x 400). A seta indica presença de leucócitos na sinóvia.

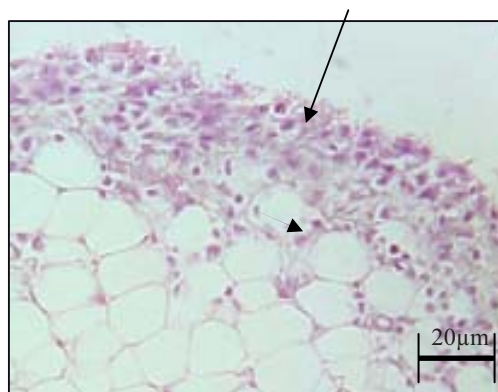


FIGURA 15 - **Representação histopatológica da sinóvia de ratos** que receberam zymosan intraarticular e foram tratados com a fração 1 (50 mg/Kg) (H&E, x 400). As setas indicam presença de leucócitos na sinóvia.

- Grupos tratados com fração 2 - 25 mg/Kg (FIGURA 16) e - 50 mg/Kg (FIGURA 17)

Os animais receberam Zy intraarticular, após 1 hora foram tratados com a fração 2 e após 6 horas ocorreu o sacrifício. Foi visto uma resposta antiinflamatória melhor no grupo tratado com F2 25 mg/Kg em relação ao grupo tratado com F2 50 mg/Kg. Observa-se na figura 17 um exsudato inflamatório de polimorfonucleares na sinóvia (escore 2) o que é notado também na figura 16, porém com menos intensidade (escore 1).

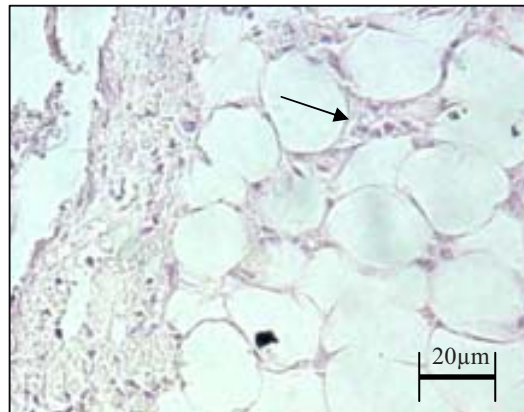


FIGURA 16 - **Representação histopatológica da sinóvia de ratos** que receberam zymosan intraarticular e foram tratados com a fração 2 (25 mg/Kg) (H&E, x 400). A seta indica presença de leucócitos na sinóvia.

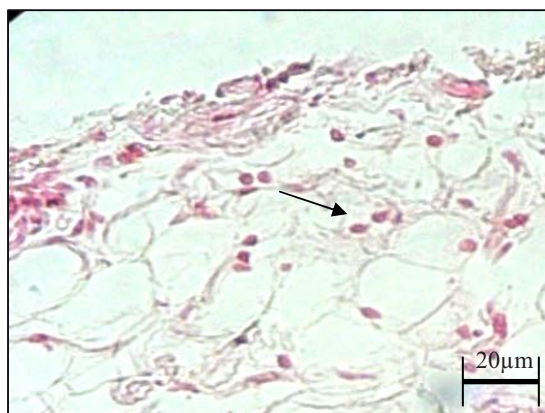


FIGURA 17 - **Representação histopatológica da sinóvia de ratos** que receberam zymosan intraarticular e foram tratados com a fração 2 (50 mg/Kg) (H&E, x 400). A seta indica presença de leucócitos na sinóvia.

- Grupos tratados com diclofenaco sódico 10 mg/Kg (FIGURA 18), lumiracoxibe 5 mg/Kg (FIGURA 19) e L-NAME 30 mg/Kg (FIGURA 20)

A visualização da lâmina dos animais que receberam diclofenaco sódico 10 mg/Kg mostrou uma boa resposta inflamatória, classificando-se em escore 1 (FIGURA 18). Analisando as figuras 19 e 20, observa-se uma infiltração de polimorfonucleares na sinóvia (escore 1) com ausência dos outros parâmetros (escore 0).

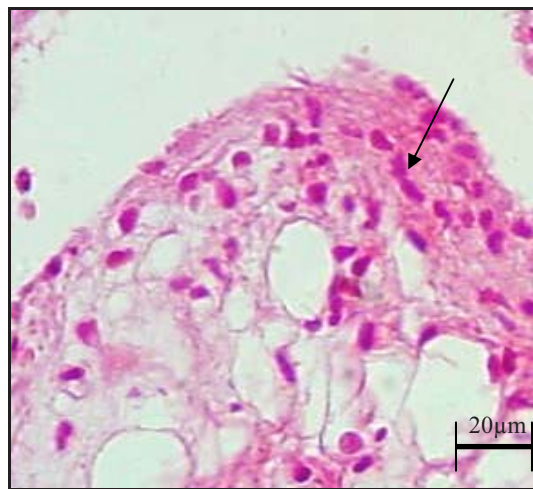


FIGURA 18 - **Representação histopatológica da sinóvia de ratos** que receberam zymosan intraarticular e foram tratados com diclofenaco sódico (10 mg/Kg) (H&E, x 400). A seta indica presença de leucócitos na sinóvia.



FIGURA 19 - **Representação histopatológica da sinóvia de ratos** que receberam zymosan intraarticular e foram tratados com lumiracoxibe (5 mg/Kg) (H&E, x 400). A seta indica presença de leucócitos na sinóvia.



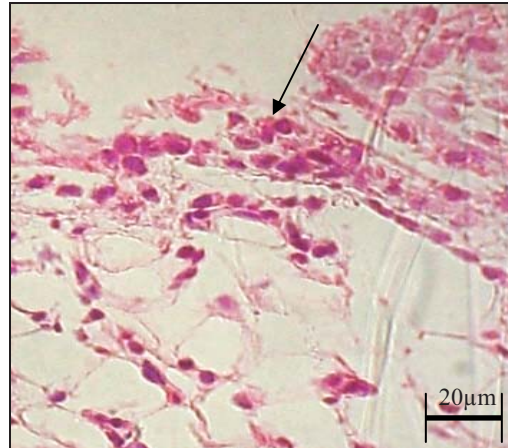


FIGURA 20 - **Representação histopatológica da sinóvia de ratos** que receberam zymosan intraarticular e foram tratados com L-NAME (30 mg/Kg) (H&E, x 400). A seta indica presença de leucócitos na sinóvia.

- Grupo tratado de forma profilática com F2 25 mg/Kg (FIGURA 21)

Observa-se na figura 21 um pequeno influxo de polimorfonucleares na sinóvia (score 1).

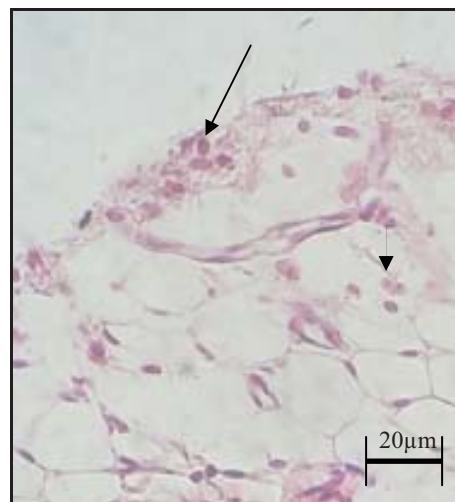


FIGURA 21 - **Representação histopatológica da sinóvia de ratos** que receberam zymosan intraarticular e foram tratados profilaticamente com F2 (25 mg/Kg) (H&E, x 400). As setas indicam presença de leucócitos na sinóvia.

## 5 DISCUSSÃO

Neste trabalho, utilizamos o fracionamento com acetona, haja visto termos obtido bons resultados empregando-se esse tipo de fracionamento em análises prévias. Esse processo de fracionamento é simples, pouco oneroso e é relatado em diversos estudos (ALVES, 2000; CARVALHO, 2001; SANTOS, 2004). O objetivo do fracionamento foi obter frações homogêneas, a partir da fucoídiana total, para os testes biológicos a serem realizados, tendo em vista que a maioria dos trabalhos descritos anteriormente usou a fucoídiana comercial (fucoídiana total) que é uma mistura de polissacarídeos sulfatados de *Fucus vesiculosus* obtida comercialmente. Conforme mencionado nos resultados, as frações F1 e F2 apresentaram melhor rendimento, a fração F1 (52,3%) demonstrou um rendimento quase cinco vezes maior em relação à F3 (10,7%) e F2 (36,7%) apresentou um rendimento quase quatro vezes maior que F3. Devido ao rendimento, as frações F1 e F2 foram utilizadas nos experimentos com animais. As frações obtidas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose em tampão 1, 3 diaminopropano acetato (PDA). No tampão PDA, os compostos interagem com a diamina em função da conformação e da distribuição de cargas, os polissacarídeos que mais interagem apresentam uma menor mobilidade eletroforética. Observamos na figura 7 que os compostos apresentaram uma baixa polidispersividade que pode ser devido ao acentuado grau de pureza, já que se trata de uma fucoídiana comercial a qual é semipurificada, é importante também destacar que as frações demonstraram diferentes migrações eletroforéticas. As dosagens químicas foram realizadas com o intuito de caracterizar as frações quanto ao teor de sulfato, proteínas e açúcares totais. Os percentuais de açúcares totais e sulfato foram bastante significantes para F1 (45,3% e 55%), F2 (55,3% e 45%) e F3 (41,5% e 26%) respectivamente. Os dados também mostraram

baixos teores de proteínas que revelam uma baixa contaminação com essa classe de macromolécula. Esses polímeros, então, apresentaram diferentes mobilidades eletroforéticas e diferenças no percentual de sulfato em sua composição. Várias algas possuem dois ou mais tipos de fucoidanas (DIETRICH *et al.*, 1995; SILVA *et al.*, 2005; ALBUQUERQUE *et al.*, 2004), a alga marrom *Spatoglossum schroederi* apresenta duas fucoidanas com características estruturais bem distintas, enquanto que a de menor mobilidade demonstra uma estrutura central formada por ácidos glucurônicos, com ramificações de tetrassacarídeos de xilose e fucose 4 sulfato (LEITE *et al.*, 1998), a outra fucoidana apresenta uma estrutura central formada por galactose 3 sulfato, substituída por tri ou tetrassacarídeos de xilose e fucose 3 sulfato (ROCHA *et al.*, 2005).

Os efeitos das frações F1 e F2 sobre os parâmetros avaliados (influxo celular e dosagem de óxido nítrico), bem como a análise das ações de compostos já conhecidos (diclofenaco, lumiracoxibe e L-NAME) no modelo de artrite induzida por zymosan, contribuem para a investigação da relação estrutura-atividade dos polímeros mencionados. A fração F1 provocou uma redução do número de leucócitos em todas as doses testadas e demonstrou também um efeito dose não-dependente, supõe-se que ocorre uma saturação nos receptores da fração F1 quando utiliza-se uma dose maior que a supostamente ideal, nesse caso a F1 50 mg/Kg acarretou essa saturação. A fração F2, ao contrário da F1, na dose de 10 mg/Kg não provocou redução do influxo celular de modo significativo, porém, F2 nas doses de 25 e 50 mg/Kg apresentou redução bastante significativa na contagem celular. Apesar de F2 nas doses de 25 e 50 mg/Kg não apresentar diferença significativa entre si, considera-se um efeito dose não-dependente, tendo em vista que F2 50 mg/Kg tende a apresentar um maior número de leucócitos em

comparação à F2 25 mg/Kg. Esses resultados estão de acordo com os de Xavier (2005) onde a fucoídiana total (comercial) provocou uma redução de forma dose não-dependente do influxo de leucócitos no lavado articular de ratos. Esses achados suportam a idéia de que realmente pode ocorrer uma saturação nos receptores desses polímeros, quando a dose administrada é maior que a necessária. Em relação às doses testadas, a dose de 25 mg/Kg demonstrou resultados mais satisfatórios nas duas frações, apresentando um menor valor absoluto de leucócitos em comparação as demais doses avaliadas. Ao comparar, as frações F1 e F2 na mesma dose de 25 mg/Kg, considera-se F2 a mais eficaz em termos de valor absoluto de leucócitos. Os três compostos analisados (diclofenaco, lumiracoxibe, L-NAME) não apresentaram diferenças significantes entre si ( $p > 0,05$ ). O lumiracoxibe demonstrou um maior valor absoluto de leucócitos em relação aos demais compostos, apesar de ser um inibidor seletivo da ciclooxigenase 2 que é induzida por estímulos pró-inflamatório e mitogênico (CAPONE *et al.*, 2003), sendo considerado um agente efetivo no tratamento da artrite reumatóide (NOGUCHI *et al.*, 2005). Contudo, a via de administração utilizada para o lumiracoxibe foi a via oral e para os demais compostos foi a via intraperitoneal, sabe-se que essa última apresenta um efeito rápido, já a via oral produz uma resposta mais lenta principalmente porque o composto administrado oralmente pode sofrer o efeito da primeira passagem (metabolismo hepático). A redução do influxo leucocitário vista no grupo F2 25 mg/Kg apresentou diferença significativa quando comparada aos grupos diclofenaco e lumiracoxibe, mas não foi significativa ( $p > 0,05$ ) em relação ao grupo L-NAME. O diclofenaco sódico e o lumiracoxibe diminuíram o número de leucócitos no lavado articular através da inibição da ciclooxigenase de forma não-seletiva e seletiva, respectivamente. O L-NAME apesar de agir na via do óxido

nítrico, inibidor não-seletivo da óxido nítrico sintase, promoveu uma diminuição do número de leucócitos no lavado, pois, o óxido nítrico não só pode provocar um quadro inflamatório como também estimula a atividade enzimática da ciclooxigenase, assim aumenta a produção de prostaglandinas, algumas dessas estão envolvidas no aumento da permeabilidade vascular (por exemplo, a prostaglandina E<sub>2</sub>) e conseqüentemente facilitam a diapedese de leucócitos (SALVEMINI *et al.*, 1993; SALVEMINI, 1997). Vários trabalhos têm demonstrado que a fucoidana comercial foi capaz de inibir o rolamento de leucócitos *in vitro* e *in vivo* devido a sua propriedade de se ligar a P e L selectinas, essa propriedade se dá devido à capacidade do fucoidan total competir com o ligante natural das selectinas, o Sialil Lewis X (Sle<sup>x</sup>) que é um tetrassacarídeo fucosilado (PATANKAR *et al.*, 1993; LINNEMANN *et al.*, 2000; RITTER; COPELAND; McDONAGH, 1998; SHIMAOKA *et al.*, 1996), acredita-se então que esse seja o mesmo mecanismo apresentado pelas fucoidanas F1 e F2. As análises químicas das fucoidanas F1 e F2 demonstraram que esses se diferenciam principalmente pelo percentual de grupos sulfato que se encontram em suas estruturas, contudo essa diferença não se refletiu na atividade inibitória da rolagem de leucócitos. A redução do influxo de leucócitos no lavado articular foi confirmada pelas análises histopatológicas que demonstraram uma diminuição na infiltração de polimorfonucleares na sinóvia.

A diminuição do influxo celular apresentou uma forte correlação com a quantidade de óxido nítrico encontrada no lavado. Observa-se que a F2 10 mg/Kg, ao contrário do que foi visto no efeito sobre o número de leucócitos, apresentou uma redução significativa dos níveis de nitrito. Sabe-se que os neutrófilos participam da destruição de microorganismos através de alguns fatores, dentre eles, a produção de quantidades significantes de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, tais como

os íons superóxido e óxido nítrico (FIALKOW; WANG; DOWNEY, 2007). Então, a F2 na dose de 10 mg/Kg pode ter provocado uma redução do número de leucócitos a qual foi suficiente para diminuir de forma significativa a produção de óxido nítrico ou provocou a redução do óxido nítrico através de outros mecanismos ainda não esclarecidos. Por outro lado, a diminuição propriamente dita do influxo leucocitário não foi significativa em relação ao grupo controle positivo, tomando como base o número de células. O lumiracoxibe apresentou diferença significativa em relação ao diclofenaco na dosagem de óxido nítrico, fato que pode ser justificado pelas distintas vias de administração utilizadas em cada um, como já foi dito. O diclofenaco e o L-NAME não apresentaram diferença significativa entre si, porém, o L-NAME apesar de agir diretamente na via do óxido nítrico apresentou tendência a uma maior concentração de níveis de nitrito que o diclofenaco. Alguns estudos demonstraram que o L-NMMA (N<sup>G</sup>-monometil-L-arginina), inibidor da óxido nítrico sintase, reduziu a inflamação da pata quando administrado profilaticamente (CONNOR *et al.*, 1995) mas não de forma terapêutica (FLETCHER *et al.*, 1998; McCARTNEY-FRANCIS *et al.*, 2001), no modelo de artrite induzida por adjuvante em ratos. ROCHA *et al* (2003) observaram que o L-NAME reduziu o influxo celular quando administrado como pré-tratamento, mas não inibiu esse parâmetro quando dado 2 horas após a indução da artrite por zymosan. Em nossos estudos, o L-NAME apresentou resposta satisfatória quando administrado terapêuticamente, mas poderia ter apresentado melhores resultados na forma profilática.

Baseado nesses resultados, observamos que as frações obtidas da fucoidana comercial de *Fucus vesiculosus* são diferentes entre si e que as frações F1 e F2 apresentaram respostas distintas. A fração F2 na dose de 25 mg/Kg apresentou os melhores resultados, em termos de valor absoluto, tanto para o influxo celular como

para a produção de óxido nítrico em relação aos demais compostos, incluindo a fração F1 e a F2 em outras doses. Avaliamos, então, se o efeito terapêutico da F2 25 mg/Kg se reproduziria ou não de forma profilática, o que auxiliaria na elucidação de qual ou de quais vias essas fucoidanas atuam. Observou-se que em relação ao influxo celular houve diferença significativa entre o tratamento profilático e o terapêutico, no entanto, para os níveis de nitrito não foi vista diferença significativa entre os tratamentos. Esses achados sugerem que a F2 atua de forma mais eficaz na inibição do rolamento de leucócitos quando o processo inflamatório já está estabelecido ou a fração pode sofrer ação do metabolismo com conseqüente diminuição de seu efeito ao iniciar a inflamação, estudos posteriores sobre a farmacocinética desse polímero são necessários para que auxiliem no esclarecimento do seu mecanismo de ação. Em relação ao óxido nítrico, supõe-se que a F2 iniba a síntese de óxido nítrico não só proveniente de leucócitos como também de outras células, como os sinoviócitos, daí porque ocorre uma redução significativa do óxido nítrico em ambos os tratamentos e não há diferença significativa entre os mesmos.

Nosso estudo sugere que o mecanismo antiinflamatório destas fucoidanas não está só relacionado com o bloqueio das selectinas, mas também com a inibição da síntese de óxido nítrico.

## **6 CONCLUSÕES**

1- Obteve-se três populações de polissacarídeos da fucoidana comercial de *Fucus vesiculosus*, denominadas de F1, F2 e F3.

2- As frações F1 (10, 25 e 50 mg/Kg) e F2 (25 e 50 mg/Kg) administradas de forma terapêutica inibiram de forma significativa os parâmetros avaliados neste modelo experimental.

3- A fração F2 25 mg/Kg administrada profilaticamente também demonstrou efeitos inibitórios sobre os parâmetros avaliados.



## REFERÊNCIAS

- ABRAMSON, S. B. *et al.* The role of nitric oxide in tissue destruction. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v.15, n.5, p.831-845, 2001.
- ACR Clinical Guidelines Committee. Guidelines for the management of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, v.39, p.713-722, 1996.
- ALBERS, J. M. C. *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.
- ALBUQUERQUE, I. R. L. *et al.* Heterofucans from *Dictyota menstrualis* have anticoagulant activity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.37, p.167-171, 2004.
- ALVES, L. G. **Polissacarídeos presentes no folíolo, talo e flutuador da alga *Sargassum vulgare***. Natal, RN, Brasil, 2000. (Dissertação – Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte).
- ARTHRITIS FOUNDATION. **Artrite Reumatóide**. [S.L.], 2000. Disponível em: <http://www.reumatologia.com.br/images/artrite2.pdf> Acesso em: 04 jan 2007
- BAHIA, L.; SIMMER, E.; OLIVEIRA, D. C. Cobertura de planos privados de saúde e doenças crônicas: notas sobre utilização de procedimentos de alto custo. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.9, n.4, p.921-929, 2004.
- 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, n.6, 2003.
- BERTOLINI, A.; OTTANI, A.; SANDRINI, M. Dual acting anti-inflammatory drugs: a reappraisal. **Pharmacological Research**, v.44, n.6, 2001.
- BEZERRA, M. M. *et al.* Reactive nitrogen species scavenging, rather than nitric oxide inhibition, protects from articular cartilage damage in rat zymosan-induced arthritis. **British Journal of Pharmacology**, v.141, p.172-182, 2004.
- BHAT, A. S. *et al.* Interaction between inhibitors of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase in Brewer's yeast-induced pyrexia in mice: An isobolographic study. **Eur. J. Pharmacol.**, v.511, p.137-142, 2005.

- BILAN, M. I. *et al.* Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus evanescens* C. Ag. **Carbohydr. Res.**, v.337, p.719-730, 2002.
- BRESALIER, R. S. *et al.* Cardiovascular Events Associated with Rofecoxib in a Colorectal Adenoma Chemoprevention Trial. **N. Engl. J. Med.**, v.352, p.1092-1102, 2005.
- BRUNE, K.; HINZ, B. Selective cyclooxygenase-2 inhibitors: similarities and differences. **Scand J Rheumatol.**, v.33, p.1-6, 2004.
- CALIM, A.; ELSWOOD, J.; KLOUDA, P. T. Destructive arthritis, rheumatoid factor and HLA-DR4: susceptibility versus severity, a case-control study. **Arthritis Rheum.**, v.32, p.1221-1225, 1989.
- CAPONE, M. L. *et al.* Clinical pharmacology of selective COX-2 inhibitors. **Int. J. Immunopathol. Pharmacol.**, v.16, p.49-58, 2003.
- CARVALHO, L. C. M. **Efeitos de frações de fucanas de *Fucus vesiculosus* na proliferação celular.** Natal, RN, Brasil, 2001. (Dissertação –Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte).
- CHATHAM, W. W. *et al.* Degradation of human articular cartilage by neutrophils in synovial fluid. **Arthritis and Rheumatism**, v.36, p.51-58, 1993.
- 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. *et al.* Study of fucoidan from the brown seaweed *Chorda filum*. **Carbohydr. Res.**, v.320, p.108-119, 1999.
- CHOY, E. H.; PANAYI, G. S. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. **N. Engl. J. Med.**, v.344, p.907-916, 2001.
- CLANCY, R. *et al.* Nitric oxide attenuates cellular hexose monophosphate shunt response to oxidants in articular chondrocytes and acts to promote oxidant injury. **Journal of Cellular Physiology**, v.172, p.183-191, 1997.
- CONCHIE, J.; PERCIVAL, E. G. V. Fucoidin . Part II. The hydrolysis of a methylated fucoidin prepared from *Fucus vesiculosus*. **J. Chem. Soc.**, p.827-832, 1950.

CONNOR, J. R. *et al.* Suppression of adjuvant-induced arthritis by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. **Eur J Pharmacol**, v.273, p.15-24, 1995.

CRILLY, A. *et al.* 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.

CROSS, S. S.; BURY, J. P. Molecular biology in diagnostic histopathology: Part II-cell adhesion molecules. **Current Diagnostic Pathology**, v.9, p.313-321, 2003.

DAVIS, D. *et al.* Anaemia of chronic disease in rheumatoid arthritis: in vivo effects of tumour necrosis factor alpha blockade. **Br. J. Rheumatol.**, v.36, n.9, p.950-956, 1997.

DENG, G. M. *et al.* Intra-articularly localized bacterial DNA containing CpG motifs induces arthritis. **Nat. Med.**, v.5, p.702-705, 1999.

DENG, G. M.; LENARDO, M. The role of immune cells and cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Drug Discovery Today**, v.3, n.2, p.163-168, 2006.

DERBOCIO, A. M. *et al.* The hemodynamic effects of zymosan in the perfused rat liver. **Vascular Pharmacology**, v.43, p.75-85, 2005.

DE VITA, S. *et al.* Efficacy of selective B cell blockade in the treatment of rheumatoid arthritis: evidence for a pathogenetic role of B cells. **Arthritis Rheum.**, v.46, p.2029-2033, 2002.

DIETRICH, C. P.; DIETRICH, S. M. C. Electrophoretic behavior of acidic mucopolysaccharides by agarose gel electrophoresis. **J. Chromatogr.**, v.130, p.299-304, 1977.

DIETRICH, C. P. *et al.* A new approach for characterization of polysaccharides from algae: presence of four main acidic polysaccharides in three species of the class Phaeophyceae. **Plant Science**, v.108, p.143-153, 1995.

DOAN, T.; MASSAROTTI, E. Rheumatoid arthritis: An overview of new and emerging therapies. **Journal of Clinical Pharmacology**, v.45, p.751-762, 2005.

DODGSON, K. S.; PRICE, R. G. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. **Biochem. J.**, v.84, p.106-110, 1962.

DUARTE, M. E. R. *et al.* Structural studies on fucoidans from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum*. **Carbohydr. Res.**, v.333, p.281-293, 2001.

DUBOIS, M. *et al.* Colorimetric method for determination of sugars, and related substances. **Anal. Chem.**, v.28, p.350-356, 1956.

DUDHGAONKAR, S. P. *et al.* Interaction of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 inhibitors in formalin-induced nociception in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v.492, p.117-122, 2004.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.39, n.4, p.343-350, 2003.

EDWARDS, S. W. Biochemistry and Physiology of the Neutrophil. **Cambridge University Press**, p.299, 1994.

EDWARDS, S. W.; HALLETT, M. B. Seeing the wood for the trees: the forgotten role of neutrophils in rheumatoid arthritis. **Immunol. Today**, v.18, p.320-324, 1997.

EDWARDS, S. W. The O<sub>2</sub><sup>-</sup> generating NADPH oxidase of phagocytes: structure and methods of detection. **Methods: Companion Methods Enzymol.**, v.9, p.563-577, 1996.

FABRICIO, A. S. C. *et al.* The effects of selective and nonselective cyclooxygenase inhibitors on endothelin-1-induced fever in rats. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v.288, p.R671-R677, 2005.

FARKOUH, M. E. *et al.* Comparison of lumiracoxib with naproxen and ibuprofen in the therapeutic arthritis research and gastrointestinal event trial (TARGET), cardiovascular outcomes: randomised controlled trial. **The Lancet**, v.364, p.675-684, 2004.

FELDMANN, M. *et al.* Cytokine production in the rheumatoid joint: implications for treatment. **Ann. Rheum. Dis.**, v.49, p.480-486, 1990.

FELDMANN, M.; BRENNAN, F. M.; MAINI, R. N. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. **Annu. Rev. Immunol.**, v.14, p.397-440, 1996.

FELDMANN, M.; MAINI, R. N. TNF defined as a therapeutic target for rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. **Nat. Med.**, v.9, p.1245-1250, 2003.

FERRANTE, A. **Artrite Reumatóide**. Disponível em:  
<http://www.geocities.com/aferrante.geo/AR.htm>. Acesso em: 15 mar 2007

FIALKOW, L.; WANG, Y.; DOWNEY, G. P. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. **Free Radical Biology & Medicine**, v.42, p.153-164, 2007.

FIRESTEIN, G. S. Etiology and Pathogenesis of the Rheumatoid Arthritis. In: KELLEY, W. N.; RUDDY, S.; HARRIS Jr., E. D.; SLEDGE, G. B. **Textbook of Rheumatology**. 5 ed. W. B. Saunders, 1997. p.851-897.

FLETCHER, D. S. *et al.* Therapeutic administration of a selective inhibitor of nitric oxide synthase does not ameliorate the chronic inflammation and tissue damage associated with adjuvant –induced arthritis in rats. **J Pharmacol Exp Ther**, v.284, p.714-721, 1998.

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

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

GRANGER, D. L. *et al.* Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction. **Methods Enzymol.**, v.268, p.142-151, 1996.

GUIDE FOR THE CARE AND USE OF LABORATORY ANIMALS. (DREW Publication), Bethesda, MD. USA, 1980.

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

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

HERMANN, M. Cyclooxygenase-2 and Nitric Oxide. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v.47, p.S21-S25, 2006.

HILBERT, N. *et al.* Cartilage degradation by stimulated human neutrophils: elastase is mainly responsible for cartilage damage. **Bioorganic Chemistry**, v.30, p.119-132, 2002.

HIRAI, Y. *et al.* Effects of nitric oxide on matrix metalloproteinase-2 production by rheumatoid synovial cells. **Life Science**, v.68, p.913-920, 2001.

HOOZEMANS, J. J. *et al.* Interleukin-1 beta induced cyclooxygenase 2 expression and prostaglandin E2 secretion by human neuroblastoma cells: implications for Alzheimer's disease. **Exp. Gerontol.**, v.36, p.559-570, 2001.

JONSSON, T.; VALDIMARSSON, H. Is measurement of rheumatoid factor isotypes clinically useful? **Annals of the Rheumatic Diseases**, v.52, p.161-164, 1993.

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

KAPOOR, M. *et al.* The role of antioxidants in models of inflammation: emphasis on L-arginine and arachidonic acid metabolism. **Inflammopharmacology**, v.12, n.5-6, p.505-519, 2005.

KHURANA, R.; BERNEY, S. M. Clinical aspects of rheumatoid arthritis. **Pathophysiology**, v.12, p.153-165, 2005.

KINNE, R. W. *et al.* Macrophages in rheumatoid arthritis. **Arthritis Res.**, v.2, p.189-202, 2000.

KITSIS, E.; WEISSMANN, G. The role of the neutrophil in rheumatoid arthritis. **Clin. Orthop.**, v.265, p.63-72, 1991.

KLOAREG, B.; QUATRANO, R. S. Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. **Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.**, v.26, p.259-315, 1988.

KOURI, T. *et al.* Antibodies to synthetic peptides from Epstein-Barr nuclear antigen-1 in sera of patients with early rheumatoid arthritis and in preillness sera. **J. Rheumatol.**, v.17, n.11, p.1442-1449, 1990.

LANDER, H. M. *et al.* Activation of human peripheral blood mononuclear cells by nitric oxide-generating compounds. **Journal of Immunology**, v.150, p.1509-1516, 1993.

LAURINDO, I. M. M. *et al.* Consenso brasileiro para o diagnóstico e tratamento da artrite reumatóide. **Rev Bras Reumatol**, v.42, n.6, 2002.

LEITE, E. L. *et al.* Structure and pharmacological activities of a sulfated xylofucanglucuronan from the algae *Spatoglossum scroederi*. **Plant Science (Limerick)**, 1998.

LEY, K. *et al.* Lectin – like cell adhesion molecule 1 mediates leukocyte rolling in mesenteric venules in vivo. *Blood*, v.77, p.2553-2555, 1991.

LINNEMANN, G. *et al.* The effects of inhibiting leukocyte migration with fucoidin in a rat peritonitis model. **Intensive Care Med.**, v.26, p.1540-1546, 2000.

LUI, P-W.; LEE, C-H. Preemptive effects of intrathecal cyclooxygenase inhibitor or nitric oxide synthase inhibitor on thermal hypersensitivity following peripheral nerve injury. **Life Sciences**, v.75, p.2527-2538, 2004.

MCCARTNEY-FRANCIS, N. L. *et al.* Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase exacerbates erosive joint disease. **J Immunol**, v.166, p.2734-2740, 2001.

MCGREGOR, A. J. Classification criteria for rheumatoid arthritis. **Baillieres Clin. Rheumatol.**, v.9, n.2, p.287-304, 1995.

MARLETTA, M. A. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. **Cell**, v.78, p.927-930, 1994.

MARTINEZ, L. L.; OLIVEIRA, M. A.; FORTES, Z. B. Influence of Verapamil and Diclofenac on leukocyte migration in rats. **Hypertension**, v.34, p.997-1001, 1999.

MANGOLD, J. B. *et al.* Pharmacokinetics and metabolism of lumiracoxib in healthy male subjects. **Drug Metab. Dispos.**, v.32, p.566-571, 2004.

MATSUOKA, N. *et al.* Phenotypic characteristics of T cells interacted with synovial cells. **J. Rheumatol.**, v.18, p.1137-1142, 1991.

MEAGER, A. Cytokine regulation of cellular adhesion molecule expression in inflammation. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v.10, p.27-39, 1999.

MedStudents. **Imagens em Reumatologia**. Disponível em:  
<http://www.medstudents.com.br/image/reumat/imgerh19.htm>. Acesso: 15 mar 2007.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **N. Engl. J. Med.**, v.329, p.2002-2012, 1993.

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

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

MOURA, M. R. L.; REYES, F. G. R. Interação fármaco-nutriente: uma revisão. **Rev. Nutr.**, v.15, n.2, p.223-238, 2002.

MUKHERJEE, D. Selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors and potential risk of cardiovascular events. **Biochemical Pharmacology**, v.63, p.817-821, 2002.

NEEDLEMAN, P.; MANNING, P. T. Interactions between the inducible cyclooxygenase (COX-2) and nitric oxide synthase (iNOS) pathways: Implications for therapeutic intervention in osteoarthritis. **Osteoarthritis Cartilage**, v.7, p.367-370, 1999.

NOGUCHI, M. *et al.* Effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, on the pathophysiology of adjuvant arthritis in rat. **European Journal of Pharmacology**, v.513, p.229-235, 2005.

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

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

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

PILLINGER, M. H.; ABRAMSON, S. B. The neutrophil in rheumatoid arthritis. **Rheum. Dis. Clin. North Am.**, v.21, p.691-714, 1995.

PISETSKY, D. S.; ST CLAIR, E. W. Progress in the treatment of rheumatoid arthritis. **JAMA**, v.286, n.22, p.2787-2790, 2001.

RAMOS, A. M. O. **Artrite experimental induzida por zymosan: caracterização citológica, histopatológica e imuno-histoquímica da sinóvia e estudos histoquímico e bioquímico dos glicoconjugados da matriz condróide**. São Paulo, SP, Brasil, 2000. (Tese-Doutorado, Universidade Federal de São Paulo).

RAMOS, A. M. O. *et al.* Artrite induzida por zymosan em ratos: estudo histopatológico, histoquímico e bioquímico dos glicoconjugados da cartilagem articular. **Rev Bras Reumatol**, v.41, n.4, 2001.



RAZA, K. *et al.* Treating very early rheumatoid arthritis. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v.20, n.5, p.849-863, 2006.

RITTER, L. S.; COPELAND, J. G.; McDONAGH, P. F. Fucoidin reduces coronary microvascular leukocyte accumulation early in reperfusion. **Ann. Thorac. Surg.**, v.66, n.6, p.2063-2071, 1998.

ROCHA, F. A. C. *et al.* Efeito de inibidores da sintase de óxido nítrico na dor inflamatória articular e influxo celular da artrite induzida por zymosan em ratos. **Rev. Bras. Reumatol.**, v.43, n.4, p.206-217, 2003.

ROCHA, F. A. C. *et al.* PAF modulates eicosanoid and TNF release in immune complex arthritis in rats. **J. Lipid. Mediat. Cell Signal.**, v.16, p.1-10, 1997.

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

ROCHA, H. A. O. *et al.* **Natural sulfated polysaccharides as antithrombotic compounds.** In: Verli H., editor. *Insights into Carbohydrate Structure and Biological Function: Transworld Research Network*; 2006: 100-116.

ROCHA, H. A. O. *et al.* Structural and haemostatic activities of a sulfated galactofucan from the brown alga *Spatoglossum schroederi*. An ideal antithrombotic agent? **J. Biol. Chem.**, v.10, p.1-14, 2005.

ROCHA, P. N.; PLUMB, T. J.; COFFMAN, T. M. Eicosanoids: lipid mediators of inflammation in transplantation. **Springer Semin Immunopathol.**, v.25, p.215-227, 2003.

ROSEN, S. D.; BERTOZZI, C. R. The selectins and their ligands. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v.6, p.663-673, 1994.

SALVEMINI, D. *et al.* Dual inhibition of nitric oxide and prostaglandin production contributes to the antiinflammatory properties of nitric oxide synthase inhibitors. **J. Clin. Invest.**, v.96, p.301-308, 1995.

SALVEMINI, D. *et al.* Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.90, p.7240-7244, 1993.

SALVEMINI, D. Regulation of cyclooxygenase enzymes by nitric oxide. **Cell Mol Life Sci**, v.53, p.576-582, 1997.

SANTOS, M. G. L. Propriedades imunomoduladoras das fucoidanas purificadas de *Fucus vesiculosus*. Natal, RN, Brasil, 2004. (**Dissertação-Mestrado**, Universidade Federal do Rio Grande do Norte).

SCHIFF, M. Emerging Treatments for Rheumatoid Arthritis. **Am J Med.**, v.102, p.11S-15S, 1997.

SCHNITZER, T. J. *et al.* Comparison of lumiracoxib with naproxen and ibuprofen in the therapeutic arthritis research and gastrointestinal event trial (TARGET), reduction in ulcer complications: randomised controlled trial. **The Lancet**, v.364, p.665-674, 2004.

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

SEWELL, K. T.; TRENTHAM, D. E. Pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Lancet**, v.341, p.283-286, 1993.

SHIMAOKA, M. *et al.* Fucoidin, a potent inhibitor of leukocyte rolling, prevents neutrophil influx into phorbol-ester-induced inflammatory sites in rabbit lungs. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v.153, p.307-311, 1996.

SHMERLING, R. H.; DELBANCO, T. L. The rheumatoid factor: an analysis of clinical utility. **American Journal of Medicine**, v.91, p.528-534, 1991.

SHORT, C. L. The antiquity of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, v.17, p.193-205, 1974.

SILVA, T. M. A. *et al.* Characterization partial and anticoagulant activity of a heterofucan from the brown seaweed *Padina gymnospora*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.38, p.523-533, 2005.

SPECTOR, 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.**, v.86, p.142-143, 1978.

STAMLER, J. S.; SINGEL, D. J.; LOSCALZO, J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. **Science**, v.258, p.1898-1902, 1992.

STEFANOVIC-RACIC, M. *et al.* Comparison of the nitric oxide synthase inhibitors methylarginine and aminoguanidine as prophylactic and therapeutics agents in rat adjuvant arthritis. **J. Rheumatol.**, v.22, n.10, p.1922-1928, 1995.

STEFANOVIC-RACIC, M. *et al.* N-monomethyl arginine, an inhibitor of nitric oxide synthase, suppresses the development of adjuvant arthritis in rats. **Arthritis Rheum.**, v.37, p.1062-1069, 1994.

STOOLMAN, L. M.; ROSEN, S. D. Possible for cell-surface carbohydrate binding molecules in lymphocyte recirculation. **J.Cell. Biol.**, v.96, p.722, 1987.

SZABÓ, T. *et al.* Biochemical properties of the ligand-binding 20-Kda subunit of the  $\beta$ -glucan receptors on human mononuclear phagocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v.270, n.5, p.2145-2151, 1995.

SZEKANECZ, Z.; KOCH, A. E. Therapeutic inhibition of leukocyte recruitment in inflammatory diseases. **Current Opinion in Pharmacology**, v.4, p.423-428, 2004.

TASKIRAN, D. *et al.* Nitric oxide mediates suppression of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin-1. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.200, p.142-148, 1994.

TAYLON, P. R. *et al.* 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.

TARNER, I. H. *et al.* The different stages of synovitis: acute vs chronic, early vs late and non-erosive vs erosive. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v.19, n.1, p.19-35, 2005.

TARRANT, T. K.; PATEL, D. D. Chemokines and leukocyte trafficking in rheumatoid arthritis. **Pathophysiology**, v.13, p.1-14, 2006.

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

TEDESCO, L. S. *et al.* Therapeutic administration of nitric oxide synthase inhibitors reverses hyperalgesia but not inflammation in a rat model of polyarthritis. **Pain**, v.95, p.215-223, 2002.

TEGEDER, I. *et al.* Effects of selective and unselective cyclooxygenase inhibitors on prostanoid release from various rat organs. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.292, n.3, p.1161-1168, 2000.

TEH, J. *et al.* Power Doppler ultrasound of rheumatoid synovitis: quantification of therapeutic response. **Br. J. Radiol.**, v.76, n.912, p.875-879, 2003.

TORIYABE, M. *et al.* Contribution of interaction between nitric oxide and cyclooxygenases to the production of prostaglandins in carrageenan-induced inflammation. **Anesthesiology**, v.101, p.983-990, 2004.

VAN DEN WORM, E. *et al.* Effects of methoxylation of apocynin and analogs on the inhibition of reactive oxygen species production by stimulated human neutrophils. **European Journal of Pharmacology**, v.433, p.225-230, 2001.

VAN'T HOF, R. J. *et al.* Nitric oxide is a mediator of apoptosis in the rheumatoid joint. **Rheumatology (Oxford)**, v.39, p.1004-1008, 2000.

VAN VENROOIJ, W. J.; VOSSENAAR, E. R.; ZENDMAN, A. J. Anti-CCP antibodies: the new rheumatoid factor in the serology of rheumatoid arthritis. **Autoimmun. Rev.**, v.3, p.S17-S19, 2004.

VEENA, C. K. *et al.* Beneficial role of sulfated polysaccharides from edible seaweed *Fucus vesiculosus* in experimental hyperoxaluria. **Food Chemistry**, v.100, p.1552-1559, 2007.

VEENA, C. K. *et al.* Renal peroxidative changes mediated by oxalate: The protective role of fucoidan. **Life Sciences**, v.79, p.1789-1795, 2006.

VEIHELMANN, A. *et al.* Differential function of nitric oxide in murine antigen-induced arthritis. **Rheumatology**, v.41, p.509-517, 2002.

VOULGARI, P. V. *et al.* Role of cytokines in the pathogenesis of anemia of chronic disease in rheumatoid arthritis. **Clin. Immunol.**, v.92, n.2, p.153-160, 1999.

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

WILLIAMS, R. O. Rodent models of arthritis: relevance for human disease. **Clin. Exp. Immunol.**, v.114, n.3, p.330-332, 1998.

WILLMENT, J. A. *et al.* 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.

YANG, J. W. *et al.* Bifunctional effects of fucoidan on the expression of inducible nitric oxide synthase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.346, p.345-350, 2006.

YUSUF-MAKAGIANSAR, H. *et al.* Inhibition of LFA-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 as a therapeutic approach to inflammation and autoimmune diseases. **Med. Res. Rev.**, v.22, p.146-167, 2002.

XAVIER, C. A. C. Efeito do fucoidam de *Fucus vesiculosus* em um modelo experimental de artrite reumatóide. Natal, RN, Brasil, 2005. (**Dissertação-Mestrado**, Universidade Federal do Rio Grande do Norte).

ZEILHOFER, H. U.; BRUNE, K. Analgesic strategies beyond the inhibition of cyclooxygenases. **TRENDS in Pharmacological Sciences**, v.27, n.9, p.467-474, 2006.

ZHANG, Q. *et al.* Effects of fucoidan on chronic renal failure in rats. **Planta Medica**, v.69, n.6, p.537-541, 2003.

ZHANG, Q. *et al.* Fucoidan inhibits the development of proteinuria in active Heymann nephritis. **Phytotherapy Research**, v.19, n.1, p.50-53, 2005.