

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Natalia Kelmer da Silva

Polissacarídeos sulfatados da alga *Ulva lactuca* L.: Efeitos na modulação de fatores pro-inflamatórios em modelos experimentais e na translocação do Fator Nuclear NF - kB em RAW264.7

Juiz de Fora
2018

Natalia Kelmer da Silva

Polissacarídeos sulfatados da alga *Ulva lactuca* L.: Efeitos na modulação de fatores pro-inflamatórios em modelos experimentais e na translocação do Fator Nuclear NF - kB em RAW264.7

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produtos Naturais.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Valquíria Pereira de Medeiros

Co-orientador: Prof. Dr^º. Jair Adriano Kopke de Aguiar

Juiz de Fora

2018

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Silva, Natalia Kelmer da.

Polissacarídeos sulfatados da alga *Ulva lactuca* L. : Efeitos na modulação de fatores pro- inflamatórios em modelos experimentais e na translocação do Fator Nuclear NF - kB em RAW264.7 / Natalia Kelmer da Silva. -- 2018.

107 p.

Orientadora: Valquíria Pereira de Medeiros

Coorientador: Jair Adriano Kopke de Aguiar

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2018.

1. *Ulva lactuca* L.. 2. polissacarídeos sulfatados. 3. anti-inflamatório. I. Medeiros , Valquíria Pereira de , orient. II. Aguiar, Jair Adriano Kopke de , coorient. III. Título.

Polissacarídeos sulfatados da alga *Ulva lactuca* L. Efeitos na modulação de fatores pro-inflamatórios em modelos experimentais e na translocação do Fator Nuclear NF - kB em RAW264.7

Natalia Kelmer da Silva

ORIENTADOR (A): Prof.^a Dr.^a Valquíria Pereira de Medeiros

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

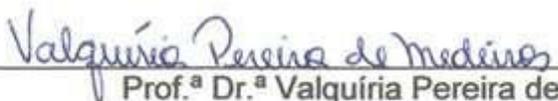
Aprovada em 31/07/2018



Prof.^o Dr.^o Hugo Alexandre de Oliveira Rocha



Prof.^a Dr.^a Ana Paula Ferreira



Prof.^a Dr.^a Valquíria Pereira de Medeiros

AGRADECIMENTOS

À Deus, por tudo que tenho.

Aos meus amados pais, Marcia e Waldir, pelo apoio incondicional. Agradeço todo o carinho e cuidado. Essa conquista também é de vocês.

Meus familiares por estarem ao meu lado. A Inês, por estar sempre presente me apoiando e incentivando.

À minha orientadora, Prof. Dra. Valquíria Medeiros, por ter aceitado me orientar e pelos ensinamentos e oportunidades durante todo o tempo de trabalho. Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Jair Adriano Knopke, pelo auxílio na realização da pesquisa.

Aos queridos amigos, Bruna, Gena e Isa, amigas de longa data, aos nojinhos, Cecília, Renata, Anselmo, Aline, Sandra, Flaviane, Guilherme e Nathalia companheiros da faculdade e ao hardcore, Hariane, Carol, Nathalia e Paola, pelo companheirismo, apoio e incentivo. Vocês tornam a vida mais leve.

À todos do Laboratório de Glicoconjugados, ao técnico Arthur, pelo apoio na realização dos testes e companhia no laboratório.

À Prof. Dra. Patrícia Eliane Almeida e a Mestre Ana Luíza, do laboratório de Biologia Celular, pelo suporte na realização dos ensaios com células primárias.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e a CAPES pela oportunidade e bolsa concedida.

RESUMO

Atualmente tem sido estudada a atividade biológica de diferentes espécies de algas. A espécie *Ulva lactuca*, conhecida popularmente como alface do mar, é rica em ulvanas, um polissacarídeo sulfatado que tem sido relacionado com diversas atividades biológicas. O objetivo do trabalho foi a extração de polissacarídeos sulfatados da alga verde *U. lactuca* L. e a avaliação da atividade anti-inflamatória desses polissacarídeos sulfatados em macrófagos estimulados com LPS. A alga seca foi triturada, delipidada e submetida a proteólise. O cru de polissacarídeos foi submetido a precipitação com quantidades crescentes de acetona, obtendo-se quatro frações denominadas U30, U50, U70 e U100. As frações foram caracterizadas por dosagem químicas, análise do peso molecular em gel de agarose, cromatografia em gel filtração, eletroforese de carboidratos por fluoróforo (FACE) para análise da composição monossacarídica e ressonância magnética nuclear (RMN). A capacidade de redução do MTT foi avaliada por meio do ensaio de MTT em cultura de macrófagos RAW 264.7. Com o intuito de investigar o potencial anti-inflamatório das frações foi avaliada em cultura celular de macrófagos RAW 264.7 e macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 a produção de óxido nítrico, a atividade e a expressão das metaloproteinase 2 e 9 por zimografia e western blot, a produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 por ELISA, a translocação do fator nuclear kB, a biogênese de corpúsculos lipídicos e a peroxidação lipídica em macrófagos. As frações apresentaram conteúdo de açúcar entre 4,15 e 6,96 mg/mL; conteúdo de sulfato entre 2,50 e 3,40 mg/mL e urônicos entre 0,74 e 2,86 mg/mL. Não foram detectados fenólicos e proteínas. A avaliação da composição monossacarídica demonstrou a presença de raminose, glicose, galactose e ácidos urônicos. Pela análise do RMN, as frações são formadas pelo ácido ulvanobiurônico tipo A e B. As frações não alteraram a capacidade de macrófagos RAW 264.7 em reduzir o MTT. Nos ensaios anti-inflamatórios, a fração U50 reduziu em 17% e 21% a produção de óxido nítrico nas concentrações 12,5 e 25 μ g/mL, enquanto a fração U70 reduziu a produção de óxido nítrico em 58 e 70% nas concentrações 12,5 e 25 μ g/mL. A fração U70 diminui a atividade da MMP-9 na concentração de 25 μ g/mL em 69% e a fração U50 nas concentrações 12,5 e 100 μ g/mL em 40% e 33%, respectivamente. Ambas as frações, U50 e U70, em 100 μ g/mL reduziram a produção de IL-6 em 26% e TNF- α em 18% e 26%, respectivamente. A fração U70 foi capaz de reduzir a translocação de NF-kB na concentração 100 μ g/mL quando comparada ao controle. A biogênese de corpúsculos lipídicos em macrófagos RAW 264.7 e primários incubados com a fração U70 e estimulados com LPS foi reduzida quando comparada com os

macrófagos apenas estimulados. A fração U70 foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica entre 33 e 55% nas concentrações entre 12,5 e 200 µg/mL. Os resultados sugerem que a fração U70 possui atividade anti-inflamatória potencial *in vitro*, sendo necessária a investigação de seus mecanismos de ação bem como sua aplicação em modelos animais e celulares para doenças inflamatórias crônicas.

Palavras-chave: *Ulva lactuca* L.; polissacarídeos sulfatados; anti-inflamatório.

ABSTRACT

Nowadays, have been studying the biological activity of different seaweed species. The specie *Ulva lactuca*, popularly known as sea' lettuce, is a green algae rich in ulvanes, a sulfate polysaccharide that has been relacionated with diverse biological activities. The objective of the work was the extraction of sulfate polysaccharides of *Ulva lactuca* L. and evaluation of its anti-inflammatory activity in macrophages stimulated with LPS. The seaweed dried was rasured, delipidated and submitted to proteolysis. The crude polysaccharides was submitted to precipitation by increase amounts of acetone, obtaining four fractions denominated U30, U50, U70 and U100. These compounds were caracterizated by chemical dosages, molecular weigth estimation by agarose gel, gel filtration chromatography, *fluorophore assisted carbohydrate electrophoresis* (FACE) for monosaccharide composition analyses and nuclear magnetic ressonance (NMR). The capacity of reduce MTT was evaluate by MTT assay in macrophage cell line RAW 264.7. Also investigated the fractions anti-inflammatory activity in macrophages RAW 264.7 and peritoneal macrophage in mice C57BL/6 through production of nitric oxide by Griess method, MMP-2 and 9 activity by zimogram and expression by western blot, production of pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-6 to ELISA assay, the translocation of nuclear factor kB, the number of lipid droplets in cells and lipid peroxidation in macrophages. The fraction showed sugar content between 4,15 and 6,96 mg/mL, sulfate between 2,50 and 3,40 mg/mL and uronic between 0,74 e 2,86 mg/mL. Phenolic or protein content were not observed. The fractions were composed by rhamnose, glucose, galactose and uronic acid monosaccharides. For NMR analyzes, the fractions U50 e U70 are formed by ulvanobiuronic acids. No one fractions reduce the capacity of macrophages RAW 264.7 in reduce MTT. In the anti-inflammatory assay, the fraction U50 reduced in 17% and 21% the NO production in 12,5 and 25 μ g/mL, still U70 fraction reduced the NO production in 58 and 70% in 12,5 e 25 μ g/mL concentration. The fraction U70 decreased the activity of MMP-9 in 69% in 25 μ g/mL concentration and the fraction U50 in 40 and 33% in 12,5 e 100 μ g/mL concentrations. Both fractions, U50 and U70, in 100 μ g/mL reduced IL-6 in 26% and TNF- α in 18% and 26%, respectively. The fraction U70 markedly reduced the NF-kB translocation in 100 μ g/mL concentration when compared with the control. The lipid droplets biogenesis in macrophages RAW 264.7 and peritoneal stimulated and incubated with U70 were reduced when compare with stimulated standard. The U70 fraction reduced the lipid peroxidation between 33 and 55% in the concentrations between 12,5 and 200 μ g/mL. The results suggest that U70 fraction have potencial anti-inflammatory

activity *in vitro*, being necessary the investigation of action mechanisms, thus the application in animals and cellular models for inflammatory chronic diseases.

Key words: *Ulva lactuca* L.; sulfate polysaccharides; anti-inflammatory.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Imagem da espécie de alga <i>Ulva lactuca</i> L.	23
Figura 2. Estrutura química da unidade dimérica do ácido ulvanobiurônico tipo A das ulvanas	24
Figure 3. Ilustração da resposta inflamatória inicial a injúria ou infecção	27
Figura 4. Ação das MMPs no processo inflamatório decorrente de injúria tecidual	31
Figura 5. Ativação dos TLRs e da cascata de sinalização	33
Figura 6. Estrutura do corpúsculo lipídico	35
Figura 7. Esquema da extração dos polissacarídeos sulfatados de <i>U. lactuca</i> L.	42
Figura 8. Esquema dos modelos da dosagem de óxido nítrico após estímulo por 30 minutos	49
Figura 9. Eletroforese em gel de agarose em tampão PDA pH 9,0.....	57
Figura 10. Peso molecular das frações em gel de agarose em tampão TBE pH 8,3	58
Figura 11. Gráficos da dosagem de açúcar das frações eluídas de U30, U50, U70 e U100 após cromatografia em coluna de gel filtração Q-Sephadex G-200	59
Figura 12. Eletroforese em gel de agarose em tampão PDA pH 9,0 após gel filtração.....	60
Figura 13. Eletrofluorograma no sistema Tris-Glicina-Borato da composição monossacarídeos das frações	60
Figura 14. RMNs fração U50	62
Figura 15. RMNs fração U70	63
Figura 16. Avaliação da redução do MTT em macrófagos da linhagem RAW 264.7 após incubação com as frações U30, U50, U70 e U100	65
Figura 17. Dosagem de óxido nítrico com e sem estímulo com LPS em macrófagos da linhagem RAW 264.7 incubados com as frações U30, U50, U70 e U100	66
Figura 18. Dosagem de óxido nítrico com e sem estímulo com LPS em macrófagos da linhagem RAW 264.7 incubados com as frações U50 e U70	67
Figura 19. Dosagem de óxido nítrico com e sem estímulo com LPS em macrófagos da linhagem RAW 264.7 por um período de 24 horas incubados com as frações U50 e U70	68
Figura 20. Dosagem de óxido nítrico em dois modelos com indução por 30 minutos	69
Figura 21. Dosagem de óxido nítrico em dois modelos com indução por 24 horas	70
Figura 22. Avaliação do efeito da fração U50 sobre a atividade das metaloproteinases 2 e 9.....	71

Figura 23. Avaliação do efeito da fração U70 sobre a atividade das metaloproteínas 2 e 9	72
Figura 24. Avaliação do efeito da fração U70 sobre a expressão das metaloproteínas 2 e 9 por western blot	73
Figura 25. Dosagem de IL-6 e TNF- α em sobrenadante por ELISA	74
Figura 26. Translocação do NF-kB após estímulo com LPS e incubação com a fração U70	75
Figura 27. Avaliação da peroxidação lipídica pelo método do TBARS para os controles DMEM e estimulado com LPS nos tempos de 30 minutos, 2 horas e 6 horas de incubação ..	77
Figura 28. Avaliação da peroxidação lipídica pelo método do TBARS com e sem estímulo com LPS em macrófagos da linhagem RAW 264.7 incubados com as frações U70	78
Figura 29. Biogênese de corpúsculos lipídicos em macrófagos da linhagem RAW 264.7 em condições basais e após estímulo	80
Figura 30. Dosagem de óxido nítrico com e sem estímulo com LPS em macrófagos peritoneais de C57BL/6 após estímulo por 24 e 48 horas	81
Figura 31. Avaliação do efeito da fração U70 sobre a atividade das metaloproteínas 2 e 9 em macrófagos peritoneais após 24 horas	82
Figura 32. Avaliação do efeito da fração U70 sobre a atividade das metaloproteínas 2 e 9 em macrófagos peritoneais após 48 horas	83
Figura 33. Biogênese de corpúsculos lipídicos em macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 em condições basais e após estímulo com LPS por 24h	85
Figura 34. Biogênese de corpúsculos lipídicos em macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 em condições basais e após estímulo com LPS por 48h	87
Figura 35. Avaliação do efeito da fração U70 sobre a expressão de PPAR γ em macrófagos peritoneais por western blot	88
Figura 36. Estrutura do ácido ulvanobiurônico tipo A e B	91
Figura 37. Via de ativação do NF-kB a partir do receptor TLR4 e produção de óxido nítrico em macrófagos por estímulo com LPS	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Localização na célula e ligantes dos TLRs presentes em humanos	32
Tabela 2. Concentrações obtidas nas dosagens químicas, relações entre seus constituintes e rendimento da extração dos polissacarídeos de <i>U. lactuca</i> L para as frações U30, U50, U70 e U100	56
Tabela 3. Dados espectroscópicos de RMN (400 MHz, BBO) para as frações U50 e U70	64
Tabela 4. Resumo das atividades da fração U70 sobre os mediadores inflamatórios avaliados em nosso estudo	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% - Porcento

°C - Graus celsius

μL - Microlitro

AINES - Anti-inflamatórios não-esteroidal

AMAC - 2-aminoacridona

AP-1 - Proteína-1 ativadora

CaCl₂ - Cloreto de cálcio

CL - Corpúsculos lipídicos

CO₂ - Dióxido de carbono

COX-2 - Ciclooxigenase 2

CS - Condroitim sulfato

CT - Tempo de coagulação

DAPI - 4,6-diamino-2-phenylindole

DMBA - 7,12-dimetilbenzotraceno

DMEM - Dulbecco's modified eagle's medium

DMSO - Dimetilsufóxido

DNA - Ácido deoxiribonucleico

DS - Dermatam sulfato

eNOS - Óxido nítrico sintase endotelial

ERK1/2 - Quinase sinal-reguladora extracelular

FACE - Eletroforese de carboidrato por fluoróforo

GAG - Glicosaminoglicano

H₃PO₄ - Ácido fosfórico

HCl - Ácido clorídrico

HS - Heparan sulfato

ICAM-1 - Molécula de adesão intercelular-1

IκBs - Inibidor quinase beta do fator nuclear kappa beta

IKK- Complexo inibidor quinase do fator nuclear kappa beta

IL-10 - Interleucina 10

IL-1β - Interleucina 1 beta

IL-6 - Interleucina 6

iNOS - Óxido nítrico sintase induzível

IRAK - Receptores IL-1 associados a quinase
IRAK-4 - Receptores IL-1 associados a quinase 4
JNK - Quinase JUN N-terminal
kDa - Kilodaltons
LPS - Lipopolissacarídeo
M - Molar
mA - Miliampere
MAL - Adaptador do tipo MyD88
MAPK - Proteína quinase mitógena-ativada
mg - Miligrama
min - Minuto
mL - Mililitro
μM - Micromolar
MMP - Metaloproteinase de matriz
MTT - (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)
MyD88 - Proteína 88 de resposta de diferenciação mielóide primária
NaOH - Hidróxido de sódio
NF-κβ - Fator nuclear kappa beta
ng - Nanograma
nm - Nanomolar
nNOS - Óxido nítrico sintase neuronal
NO - Óxido nítrico
(NO₃⁻) - Nitrato
(NO₂⁻) - Nitrito
NOS - Óxido nítrico sintase
ORO - Oil red O
PAF - Fator de ativação plaquetária
PBS - Tampão fosfato salino
PCR - Reação em cadeia da polimerase
PDA - Tampão 1,3-diaminopropano acetato
PM - Peso molecular
PPARγ - Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama
PS - Polissacarídeo sulfatado

PS-U70 - Polissacarídeo sulfado de *Ulva lactuca* L. U70

RE - Retículo endoplasmático

RMN – Ressonância magnética nuclear

Rpm - Rotações por minuto

RPMI - Roswell park memorial institute 1640

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SFB - Soro fetal bovino

SO₄⁻ - Sulfato

TAK1 - Fator transformador de crescimento β-ativado quinase 1

TBARS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TBE - Tris-borato-EDTA

TLR – Receptor do tipo toll

TNF-α - Fator de necrose tumoral α

TRAF6 - Receptores TNF associados ao fator 6

U30 - Fração de polissacarídeos de *U. lactuca* L obtido com precipitação com 0,3v de acetona

U50 - Fração de polissacarídeos de *U. lactuca* L obtido com precipitação com 0,5v de acetona

U70 - Fração de polissacarídeos de *U. lactuca* L obtido com precipitação com 0,7v de acetona

U100 - Fração de polissacarídeos de *U. lactuca* L obtido com precipitação com 1,0v de acetona

v - Volume

V - Volts

ZnCl₂ - Cloreto de Zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 ESPÉCIE DE ALGA VERDE <i>Ulva lactuca</i>	23
2.2 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS PS DE <i>U. lactuca</i>	24
2.3 PROCESSO INFLAMATÓRIO	26
2.3.1 Resposta inflamatória	26
2.3.2 Medicamentos anti-inflamatórios	28
2.4 COMPONENTES RELACIONADOS AO PROCESSO INFLAMATÓRIO	29
2.4.1 Óxido nítrico	29
2.4.2 Metaloproteinases de matriz	30
2.4.3 Receptores do tipo toll	31
2.4.4 NF-κB	34
2.4.5 Citocinas	34
2.4.6 Corpúsculos lipídicos	35
3 OBJETIVO	37
3.1 OBJETIVO GERAL	37
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	37
4 MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 MATERIAL	38
4.1.1 <i>U. lactuca</i> L. – Descrição taxonômica	38
4.1.2 Cultura de células	38
4.1.3 Camundongos	38
4.1.4 Reagentes	39
4.1.5 Equipamento	40
4.2 MÉTODOS	40
4.2.1 Extração dos polissacarídeos sulfatados	40
4.2.1.1 <i>Coleta da alga</i>	40
4.2.1.2 <i>Obtenção do pó cetônico</i>	41
4.2.1.3 <i>Proteólise</i>	41
4.2.1.4 <i>Fracionamento dos extratos brutos com acetona PA</i>	41
4.2.2 Eletroforese	42
4.2.2.1 <i>Eletroforese em gel de agarose em tampão 1,3-diaminopropano acetato (PDA)</i>	42

4.2.2.2	<i>Peso molecular em gel de agarose 1%</i>	43
4.2.2.3	<i>Eletroforese de carboidrato por fluoróforo (FACE)</i>	44
4.2.2.3.1	<i>Derivatização dos monossacarídeos</i>	44
4.2.2.3.2	<i>Preparo dos Géis de Poliacrilamida e Eletroforese</i>	44
4.2.3	Dosagens químicas	45
4.2.3.1	<i>Dosagem de açúcares totais</i>	45
4.2.3.2	<i>Dosagem de sulfato</i>	45
4.2.3.3	<i>Dosagens de ácidos urônicos</i>	45
4.2.3.4	<i>Dosagem de proteínas</i>	46
4.2.3.5	<i>Dosagem de compostos fenólicos</i>	46
4.2.4	Cromatografia	46
4.2.4.1	<i>Cromatografia de gel filtração Sephadex G-200</i>	46
4.2.5	Ressonância Magnética Nuclear	47
4.2.6	Ensaio biológico	47
4.2.6.1	<i>Teste de redução do MTT</i>	47
4.2.6.2	<i>Dosagem de óxido nítrico por Griess</i>	47
4.2.6.3	<i>Dosagem de óxido nítrico em dois modelos de estímulo nos tempos de 30 minutos e 24 horas</i>	48
4.2.6.4	<i>Avaliação da atividade das metaloproteinases por zimografia</i>	49
4.2.6.4.1	<i>Cultura de células</i>	49
4.2.6.4.2	<i>Dosagem de proteínas pelo método BCA</i>	49
4.2.6.4.3	<i>Zimografia</i>	50
4.2.6.5	<i>Dosagem de citocinas por ELISA</i>	50
4.2.6.6	<i>Translocação do fator de transcrição NF-κB por imunohistoquímica</i>	51
4.2.6.7	<i>Avaliação da expressão de proteínas por western blot</i>	51
4.2.6.7.1	<i>Obtenção do lisado celular e sobrenadante</i>	51
4.2.6.7.2	<i>Corrida</i>	52
4.2.6.7.3	<i>Revelação</i>	52
4.2.6.8	<i>Biogênese de corpúsculo lipídicos</i>	52
4.2.6.8.1	<i>Linhagem celular RAW 264.7</i>	53
4.2.6.8.2	<i>Macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6</i>	53
4.2.6.8.3	<i>Coloração por Oil red O</i>	53
4.2.6.9	<i>Avaliação da peroxidação lipídica pelo método das substância reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)</i>	54

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	55
6 RESULTADOS	56
6.1 DOSAGENS QUÍMICAS DAS FRAÇÕES DE <i>U. lactuca</i> L.	56
6.2 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE EM TAMPÃO PDA PH 9,0	56
6.3 DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR DAS FRAÇÕES DE <i>U. lactuca</i> L. POR ELETROFORESE EM TAMPÃO TBE E CROMATOGRAFIA DE GEL FILTRAÇÃO Q- SEPHADEX G-200	57
6.4 COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES DE <i>U. lactuca</i> L.	60
6.5 RESSONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	60
6.6 ENSAIOS BIOLÓGICOS EM MACRÓFAGOS DA LINHAGEM RAW 264.7	64
6.6.1 As frações de <i>U. lactuca</i> L. não interferem na capacidade dos macrófagos da linhagem RAW 264.7 em reduzir o MTT	64
6.6.2 Atividade das frações de <i>U. lactuca</i> L. sobre a produção de óxido nítrico por meio de estímulo com LPS em macrófagos da linhagem RAW 264.7	65
6.6.3 Avaliação da atividade da fração U70 sobre a produção de óxido nítrico em dois modelos de estímulo nos tempos de 30 minutos e 24 horas	68
6.6.4 Ação das frações U50 e U70 de <i>U. lactuca</i> L. sobre a atividade das metaloproteinases 2 e 9	70
6.6.5 Avaliação da expressão das metaloproteinases 2 e 9 por western blot	72
6.6.6 Redução da produção de citocinas inflamatórias em macrófagos da linhagem RAW 264.7 pelas frações U50 e U70 <i>U. lactuca</i> L. após estímulo com LPS	73
6.6.7 Efeito da fração U70 sobre a translocação do NF-kB após estímulo com LPS	74
6.6.8 Avaliação da peroxidação lipídica em macrófagos da linhagem RAW 264.7 pelo método do TBRAS	76
6.6.9 Atividade da fração U70 <i>U. lactuca</i> L. em reduzir o número de corpúsculos lipídicos em macrófagos da linhagem RAW 264.7 após estímulo com LPS	78
6.7 ENSAIOS BIOLÓGICOS EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS C57BL/6.....	81
6.7.1 Atividade da fração U70 de <i>U. lactuca</i> L. sobre a produção de óxido nítrico com estímulo com LPS em macrófagos peritoneais em dois tempos de exposição.....	81
6.7.2 Ação da fração U70 de <i>U. lactuca</i> L. sobre a atividade das metaloproteinases 2 e 9 em macrófagos peritoneais	82

6.7.3 Atividade da fração U70 de <i>U. lactuca</i> L. em diminuir o número de corpúsculos lipídicos em macrófagos peritoneais após estímulo com LPS em dois tempos de exposição	83
6.7.4 Avaliação da expressão de PPARγ por western blot em macrófagos peritoneais ..	87
7 DISCUSSÃO	89
8 CONCLUSÃO	99
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100

1 INTRODUÇÃO

A costa marítima é um habitat que abriga uma diversidade de organismos marinhos. Esses organismos marinhos são fontes de biomateriais, incluindo ácidos graxos poli-insaturados, polissacarídeos sulfatados (PS), minerais essenciais, vitaminas, enzimas e peptídeos bioativos (ALMEIDA et al., 2011). Os biomateriais de organismos marinhos podem ser utilizados como fontes para descobertas de novos medicamentos e como matéria-prima na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética (ARAÚJO et al., 2016; WIJESEKARA, PANGESTUTI, KIM, 2011).

Entre os organismos marinhos existentes, pode-se citar as algas. As algas são divididas em 2 grupos, macroalgas e microalgas. As macroalgas são classificadas dependendo de seus pigmentos e composição química em três filos: Chlorophyta (algas verdes); Rhodophyta (algas vermelhas); Phaeophyta (algas pardas) (COURA, 2011). Já as microalgas estão classificadas em 11 divisões distintas, de acordo com natureza e localização de pigmentos, carboidratos de reserva, entre outras características (FRANCESCHINI et al., 2010).

Atualmente tem sido estudada a atividade biológica de diferentes PS de espécies de algas, sendo sua ação relacionada a presença e a posição de grupos sulfatos, a composição de açúcar, o tipo de ligação glicosídica, o peso molecular e sua conformação estrutural (HE et al., 2016). Os PS são descritos como macromoléculas bioativas que possuem radical sulfato em sua estrutura (PÉREZ-RECALDE et al., 2014). As algas marinhas são a maior fonte não animal de PS (COSTA et al., 2010). A atividade anticoagulante é uma das propriedades dos PS mais estudadas, sendo as heparinas de baixo peso molecular os PS mundialmente utilizados como fármaco anticoagulante (COSTA et al., 2010). Além disso, outras modulações das respostas biológicas por PS já foram descritas como: controle da trombose, da nocicepção, da inflamação, da artrite, do câncer, entre outras doenças (COSTA et al., 2010; ARAÚJO et al., 2016).

Estruturalmente, os PS variam entre classes de polímeros e espécies de algas, possuem uma alta densidade de radicais éster sulfato em sua estrutura, o que permite sua interação com proteínas, assim como, com componentes celulares, modulando sistemas biológicos. Além disso, os PS apresentam baixa toxicidade, o que torna atrativo o seu estudo (LI et al., 2008; ALMEIDA et al., 2011).

A *Ulva lactuca* L. é uma alga verde encontrada na costa brasileira e em outros países do mundo. Desperta grande interesse nutricional por seu conteúdo de fibras dietéticas, esse pode corresponder a até 50% do peso seco da alga (KAEFFER et al., 1999). Possui uma

parede celular rica em ulvanas, um PS presente em algas verdes, contendo resíduos de raminose e ácidos urônicos, esses PS já foram relacionados com diversas atividades biológicas, como por exemplo antioxidante (YAICH et al., 2015), analgésica e anti-inflamatória (ARAÚJO et al., 2016).

A inflamação é uma resposta imune benéfica ativada para restaurar danos ao tecido ou contra patógenos. A resposta imune compreende uma série de eventos envolvendo células, incluindo macrófagos e linfócitos, e mediadores, tais como citocinas. Após a destruição do patógeno e/ou reparo tecidual, a inflamação é finalizada e o estado homeostático reestabelecido (LANDSKRON et al., 2014).

Entre os mediadores inflamatórios podem-se destacar as citocinas, estas são predominantemente liberadas por células imunes, incluindo monócitos, macrófagos e linfócitos. As citocinas podem desempenhar papel tanto pro-inflamatório, facilitando a inflamação, quanto anti-inflamatório, inibindo o desenvolvimento da mesma. O fator de necrose tumoral- α (TNF- α) é um exemplo de citocina pró-inflamatória, que tem como célula alvo macrófagos, estimulando a ativação de células fagocíticas e o choque endotóxico. Por outro lado, a interleucina-10 (IL-10), que tem como células alvo macrófagos e células B, inibindo a produção de citocinas e a função de células mononucleares, tem ação anti-inflamatória. O tipo de resposta imune (pró ou anti-inflamatória, mediada por células ou humoral) realizada pelas células imunes depende das citocinas inicialmente liberadas em resposta a injúria ou invasão por patógenos. Citocinas inflamatórias podem ser diferentemente classificadas como interleucinas, fatores estimuladores de colônia, fator de necrose tumoral, interferon e quimiocinas, e são produzidas por células primariamente para recrutar leucócitos para o sítio de infecção ou injúria. No entanto, a produção excessiva de citocinas podem levar a dano tecidual, mudanças hemodinâmicas, falhas dos órgãos, até a morte. Dessa forma, o entendimento da ação das citocinas e como controlá-las podem auxiliar no tratamento das doenças inflamatórias (ALVINE et al., 2015; TURNER et al., 2014; CHEN et al., 2018).

Enquanto a resposta inflamatória aguda é responsável pela proteção do organismo frente a patógenos/injúria, a desregulação da resposta inflamatória, pode levar ao desenvolvimento de um estado inflamatório crônico, ocasionando dano tecidual e incapacidade (LANDSKRON et al., 2014; FERRAZ, 2016; YI, 2018). As doenças inflamatórias crônicas mais prevalentes são a artrite reumatoide, a doença de Crohn e a colite ulcerativa. Os pacientes acometidos por essas doenças têm impacto no seu trabalho e vida social, pois elas causam sérios problemas de saúde pelas recidivas frequentes e formas clínicas de alta gravidade. Além disso, sua expectativa de vida é significativamente diminuída

quando em comparação com a população em geral (GOELDNER et al., 2011; FERRAZ, 2016; SAIREJI, COLLINS, EVANS, 2017; LUBRANO, 2018; MEYER et al., 2018).

A prevalência de doenças inflamatórias crônicas e os efeitos pouco significativos dos fármacos anti-inflamatórios atualmente disponíveis para o tratamento dessas condições, faz necessário o estudo de novos compostos com atividade anti-inflamatória (SUBASH et al., 2016).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ESPÉCIE DE ALGA VERDE *Ulva lactuca*

A espécie *Ulva lactuca* é um membro da ordem das Ulvales, família Ulvaceae e gênero *Ulva*, também conhecida popularmente como alface do mar (Figura 1). Essa espécie cresce abundantemente em zonas ricas em nutrientes, já tendo sido encontrada na Europa, América do Norte e Sul, Ilha Caribenhas, África, Ilhas do Oceano Índico, China, Ilhas do Pacífico, Austrália e Nova Zelândia (TIAN et al., 2015).



Figura 1. Imagem da espécie de alga *Ulva lactuca* L. Fonte: AlgaeBase. Disponível em: http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=39 A

A *U. lactuca* é rica em ulvanas, um heteropolissacarídeo sulfatado solúvel em água, que correspondem de 8 a 29% do peso seco da alga. As ulvanas são os PS mais abundantes e estudados nas algas do filo Chlorophyta, algas verdes (FREITAS, 2014).

A composição química das ulvanas é complexa, podendo ser afetada pela estação do ano, condições de crescimento, origem, etc. Porém, regularmente os polissacarídeos são constituídos por resíduos de raminose, xilose, glicose, ácidos urônicos e grupamentos sulfato, apresentando-se predominantemente resíduos de raminose (TIAN et al., 2015; THANH et al., 2016). Esses PS são formados por polissacarídeos estruturalmente agrupados em dois principais dissacarídeos repetitivos, os ácidos ulvanobiorônicos tipo A [(→4)-β-D-GlcA-(1→4)-α-L-Rha 3S-(1→)] e tipo B [(→4)-α-L-IdoA-(1→4)-α-L-Rha 3S-(1→)], o tipo A (Figura 2) apresenta um resíduo de ácido glucurônico ligado a um resíduo de raminose por ligação α-1,4 e o tipo B um resíduo de ácido idurônico ligado a um resíduo de raminose por ligação α-1,4 (FREITAS, 2014).

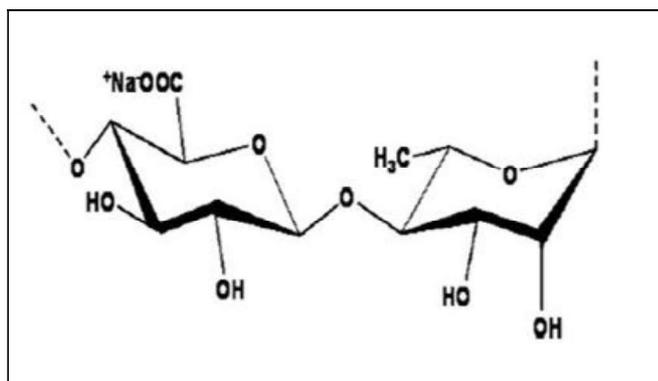


Figura 2. Estrutura química da unidade dimérica do ácido ulvanobiurônico tipo A das ulvanas. Representada a ligação dimérica entre o resíduo de ácido glucurônico e o de raminose. Fonte: Adaptada de WIJESEKARA, PANGESTUTI, KIM, 2011.

2.2 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS PS DE *U. lactuca*

Já foram descritas na literatura diversas atividades relacionadas aos PS de *U. lactuca*. Entre elas, Kaeffer et al. (1999), estudaram as propriedades biológicas de ulvanas, com diferentes conteúdos de sulfatos e ácidos urônicos, em células epiteliais normais e cancerosas. Foram avaliadas a adesão, proliferação e diferenciação das células em cultura. As ulvanas modificaram a fase de adesão e a proliferação normal de células HT-29 (células de adenocarcinoma de colo humano), destacou-se as ulvanas reduzidas que apresentaram forte inibição da adesão de HT-29, sugerindo que a redução de ácidos urônicos aumentou a acessibilidade dos receptores celulares aos resíduos de sulfato e com isso a ulvana tornou-se tóxica. Ademais, o polissacarídeo bruto inibiu a proliferação celular e diferenciação de Caco-2 (células de adenocarcinoma de colo humano). Outro estudo também avaliou a atividade antitumoral de PS de *U. lactuca*, o estudo foi realizado *in vitro* com células MCF-7 e *in vivo* em ratos Wistar após a estímulo de câncer mamário, observou-se a atividade dos PS em prevenir as lesões relacionadas ao câncer de mama, aumentar da expressão de p-53, proteína que regula a apoptose, prevenir a peroxidação lipídica e a redução da atividade de enzimas antioxidantes, condições observadas no desenvolvimento de câncer de mama. Assim como, a redução de citocinas inflamatórias e óxido nítrico (ABD-ELLATEF et al., 2017).

El-Baky, Baz e Baroty (2009), avaliaram a atividade biológica de PS de *U. lactuca* L. extraídos por métodos distintos. Foram pesquisadas atividades antioxidante *in vitro*, anticoagulante por determinação do tempo de coagulação (CT), antiviral contra herpes vírus tipo 1 e atividade antiproliferativa com as linhagens celulares cancerígenas MCF-7 e HepG2. Os PS de *U. lactuca* L. apresentaram atividade antioxidante *in vitro*, atividade anticoagulante

com prolongamento do CT, porém foram necessárias altas doses dos extratos para obter atividade similar a heparina, atividade antiproliferativa dose-dependente nas duas linhagens estudadas e atividade antiviral dose-dependente moderada.

Outro estudo avaliou o efeito de PS de *U. lactuca* sobre enzimas relacionadas com a diabetes e a obesidade. Os PS exibiram inibição potencial de enzimas relacionadas com a digestão e absorção (α -amilase e maltase) de amido no plasma e intestino, diminuindo significativamente a taxa de glicose no sangue. Conjuntamente, inibiu enzimas chave no metabolismo e absorção lipídica, como a lipase, o que levou a notável redução dos níveis de LDL-colesterol e triglicérides no sangue. Também foi observada significativa proteção das funções do rim e do fígado (BELHADJ et al., 2013). No estudo de Sathivel et al. (2008), também foi avaliada a atividade antiperoxidativa e anti-hiperlipidêmica dos polissacarídeos de *U. lactuca*. O pré-tratamento com os polissacarídeos levou ao aumento do HDL-colesterol e VLDL-colesterol com inibição dos níveis de LDL-colesterol quando comparados com os animais induzidos com D-galactosamina. Os ratos intoxicados com D-galactosamina apresentaram níveis agudos de peroxidação lipídica com concomitante depleção de glutatona reduzida/oxidada. Por outro lado, os animais tratados com os polissacarídeos não apresentaram esses sinais agudos. Igualmente, os PS protegeram contra a perda de grupos tióis de proteínas, fenômeno crítico para a injúria celular no estresse oxidativo agudo, sendo identificada atividade protetora do fígado em ratos com dano induzidos por D-galactosamina. Foi apresentado em outro trabalho, que a administração intragástrica de polissacarídeos de *U. lactuca* em ratos hipercolesterolêmicos causou diminuição dos níveis de lipídeos totais, triglicérides, colesterol total, LDL-colesterol, VLDL-colesterol, com aumento da concentração de HDL-colesterol (HASSAN et al., 2011).

Polissacarídeos de algas têm demonstrado possuir um importante papel como sequestrador de radicais livres *in vitro*, atuando como antioxidantes e prevenindo o dano oxidativo (ZHANG et al., 2010). He et al. (2016), avaliaram a atividade antioxidante de quatro polissacarídeos de algas, entre eles os polissacarídeos de *U. lactuca* L., que apresentaram atividade antioxidante *in vitro* de maneira dose-dependente.

Alves, Sousa e Reis (2012), avaliaram a citotoxicidade de polissacarídeos extraídos de *U. lactuca*, por meio do ensaio de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium), dosagem de DNA e proteínas totais. Nesse estudo, os polissacarídeos de *U. lactuca* demonstraram-se não-citotóxicos, quando comparados a uma substância não-tóxica estabelecida, o ácido hialurônico, sendo então os polissacarídeos de *U. lactuca* considerados não-tóxicos nas concentrações estudadas.

No estudo de Chiu, Chan e Wu (2012) foi demonstrado que os PS extraídos de *U. lactuca* podem inibir o vírus da encefalite Japonesa em células Vero. Os polissacarídeos também diminuíram a expressão da citocina pró-inflamatória TNF- α nas células da glia infectadas pelo vírus da encefalite Japonesa.

Araújo et al. (2016), observaram atividade analgésica e anti-inflamatória de PS de *U. lactuca in vivo*. Foram realizados testes já estabelecidos para avaliação dessas atividades biológicas em animais, como teste da formalina e da placa quente, para avaliar atividade analgésica e estímulo de edema de pata, por meio de substâncias irritantes como carragenana e dextran, para avaliar a atividade anti-inflamatória. A atividade anti-inflamatória também foi avaliada em modelo de colite aguda induzida por DSS em animais, por meio da administração de nanopartículas de selênio associadas com PS de *U. lactuca*, o selênio já possui atividade anti-inflamatória estudada, porém a associação auxiliou na redução potencial da colite, pela redução do processo inflamatório, sendo observada redução da produção de citocinas inflamatórias e da ativação do NF- κ B (ZHU et al., 2017).

Outro estudo avaliou a atividade antiangiogênica de nanopartículas construídas com polímeros de *U. lactuca* contendo uma substância anticâncer já estudada, Ru(POP), demonstrando uma aplicação distinta para os polissacarídeos dessa alga. Esse complexo anticâncer apresentou forte efeito supressivo sobre o fator de crescimento do endotélio vascular e formação de tubo (estágio final da angiogênese) *in vitro* e *in vivo* (YANG et al, 2018).

2.3 PROCESSO INFLAMATÓRIO

A inflamação é a resposta dos tecidos vascularizados a estímulos nocivos, tais como injúria, patógenos ou agentes irritantes. O processo inflamatório envolve uma complexa alteração de fatores biológicos e patológicos, como ativação enzimática, liberação de mediadores inflamatórios, diapedese, dano e reparo tecidual, etc. Os processos inflamatórios são necessários para a proteção contra infecção, reparação e regeneração após lesão, porém a resposta inflamatória excessiva ou desregulada é causa de inúmeras doenças, como artrite reumatoide, psoríase e doença inflamatória intestinal. Além disso, a inflamação está envolvida na patogênese de doenças como câncer, diabetes e doenças vasculares (SUBASH et al., 2016).

2.3.1 Resposta inflamatória

A inflamação é desencadeada pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos e padrões moleculares associados a injúria de tecidos durante a resposta imune inata, sendo refinada e prolongada durante a resposta imune adaptativa. A resposta inicial é mediada por macrófagos e mastócitos residentes, levando à produção de uma variedade de mediadores inflamatórios, que podem ser de origem tissular, como as aminas vasoativas, fator de ativação plaquetária (PAF), eicosanoides, citocinas, radicais livres superóxidos, óxido nítrico e neuropeptídeos, ou de origem plasmática, como os sistemas da coagulação, do complemento e das cininas (Figura 3). O efeito imediato desses mediadores é a formação de um exsudato inflamatório local, permitindo que proteínas plasmáticas e leucócitos que são normalmente restritos aos vasos sanguíneos acessem os tecidos extravasculares no local de infecção ou injúria. Quando esses leucócitos alcançam o tecido são ativados e tentam matar o agente invasor por meio de liberação de conteúdo tóxico de seus grânulos, por exemplo espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, proteinase 3, catepsina G e elastase (MEDZHITOV, 2008; COURA, 2011).

Se houver sucesso na eliminação do patógeno, segue-se para a fase de reparo do dano, por meio da mudança de liberação de mediadores inflamatórios para outros anti-inflamatórios. Porém em alguns casos, a resposta inicial não é suficiente para a eliminação do patógeno, ocorrendo o desenvolvimento de uma resposta adaptativa, principalmente pela ativação de linfócitos B e T. Ocorre um conjunto de reações específicas contra o invasor, ao mesmo tempo que as ações das células e dos mediadores que participam da resposta inata tornam-se mais eficazes (RANG et al., 2007; MEDZHITOV, 2008).

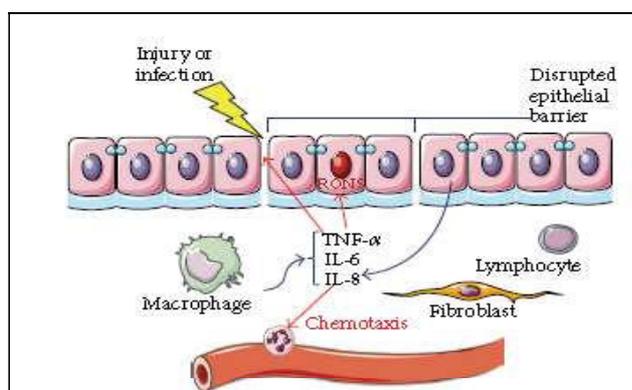


Figura 3. Ilustração da resposta inflamatória inicial a injúria ou infecção. Durante a injúria ao tecido ou infecção, uma resposta imune é ativada. A expressão de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-6 e IL-8, por macrófagos e neutrófilos, leva ao rompimento da barreira epitelial, estímulo da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e promove a infiltração de outras células inflamatórias. Fonte: Adaptada de LANDSKRON et al., 2014.

Quando as células que respondem ao ambiente inflamatório não são capazes de eliminar os patógenos ou restabelecer a injúria, a inflamação aguda pode torna-se crônica, envolvendo a formação de granulomas e tecido linfoide terciário. Em adição a inflamação local e sistêmica, esta fase crônica é caracterizada pela manutenção da infiltração leucocitária com injúria tecidual. Esse fenômeno pode ser observado em infecções crônicas, doenças autoimunes e câncer. Conseqüentemente, todas essas doenças são caracterizadas pela persistência de antígenos que induzem uma inflamação sustentada concomitante com uma diferenciação marcada da imunidade adaptativa, principalmente por linfócitos T. Estas células altamente diferenciadas contribuem com a perpetuação do processo por indução da produção de citocinas pró-inflamatórias (MORO-GARCIA et al., 2018).

2.3.2 Medicamentos anti-inflamatórios

Os principais grupos de fármacos que são usados nos distúrbios inflamatórios são os glicocorticoides e os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES). Os glicocorticoides são muito utilizados na terapia das doenças autoimunes e na prevenção e/ou tratamento da rejeição de transplantes, suas ações anti-inflamatórias se devem, principalmente à inibição da transcrição do gene da ciclooxigenase-2 (COX-2) e ao estímulo da produção de lipocortina, a qual inibe a enzima fosfolipase A2. Porém, a toxicidade associada à terapia crônica com os glicocorticoides limita o seu uso. Já os AINES são fármacos que possuem um amplo espectro de indicações terapêuticas, apresentando três principais efeitos: anti-inflamatório, analgésico e antipirético. Sua ação terapêutica é devido a inibição da COX, enzima que atua na conversão do ácido araquidônico nos eicosanoides (PGD₂, PGE₂, PGI₂, TXA₂), que são mediadores do processo inflamatório, que também atuam no controle da temperatura no sistema nervoso central e diminuem o limiar de excitação dos nociceptores. Entre os principais efeitos adversos dos AINES estão efeitos gastrointestinais, hepatotóxicos e processos alérgicos (RANG et al., 2007; COURA, 2011).

Apesar dos estudos nas últimas décadas, algumas doenças inflamatórias como artrite reumatoide, aterosclerose e pleurites, ainda possuem limitações no tratamento. Os fármacos são caros, alguns promovem apenas alívio temporário e têm efeitos adversos indesejáveis. Dessa forma, a busca por fármacos de origem natural que são mais baratos e apresentam menores reações adversas é interessante (SUBASH et al., 2016).

2.4 COMPONENTES RELACIONADOS AO PROCESSO INFLAMATÓRIO

O processo inflamatório ocorre por meio de uma série de ações mediadas pela produção de mediadores inflamatórios, como a produção de quimiocinas, eicosanoides e citocinas. Esses mediadores atuam principalmente no recrutamento de células do sistema imune que vão atuar na eliminação do patógeno e recuperação da injúria. Outros componentes já foram apresentados na literatura como tendo relação com o desenvolvimento da inflamação, demonstrando o aumento de sua produção durante o estado inflamatório, por exemplo o óxido nítrico, metaloproteinasas, radicais livres e até componentes lipídicos. Dessa forma, estudar a ação de substâncias potencialmente anti-inflamatórias sobre a produção desses mediadores e componentes relacionados com a inflamação é importante para confirmar sua atividade e elucidar o possível mecanismo de ação. Além disso, permite avaliar uma ação sinérgica das substâncias, com atuação sobre mais de um desses componentes (ALVINE et al., 2015).

2.4.1 Óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) é uma molécula sinalizadora ubíqua que tem a habilidade de se difundir através das membranas celulares. Está envolvido na modulação de diferentes respostas fisiológicas como: manutenção de pressão sanguínea no sistema cardiovascular; estimulação do sistema imune; regulação da transmissão neural no cérebro; agregação plaquetária; inflamação, entre outras (KUMAR, SINGHC, BHARDWAJA, 2017).

A síntese do NO ocorre a partir da oxidação do aminoácido L-Arginina por uma família de enzimas chamadas de óxido nítrico sintase (NOS). As NOS apresentam três isoformas distintas: duas isoformas constitutivas, uma delas expressa nos neurônios (nNOS/NOS₁) e outra expressa nas células endoteliais (eNOS/NOS₃), além dessas, a isoforma induzível (iNOS/NOS₂), expressa por células do sistema imune, como por exemplo pelos macrófagos. A isoforma iNOS é ativada por diversos estímulos como fator nuclear kappa B (NF- κ B), fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina-6 (IL-6), lipopolissacarídeo (LPS), bactérias e vírus (BURKE et al., 2013; SOUFLI et al., 2016). As isoformas variam quanto a quantidade de NO produzido, a iNOS leva a produção micromolar de NO por um período de horas a dias, enquanto as isoformas constitutivas uma produção nanomolar de NO por um curto período de segundos a minutos (SOUFLI et al., 2016; KUMAR, SINGHC, BHARDWAJA, 2017).

A liberação de NO é importante para a manutenção de diversas respostas inflamatórias, porém a liberação de grandes quantidades de NO pode levar a efeitos deletérios, como na resposta inflamatória durante sepsis. Os elétrons não pareados do NO reagem com moléculas inorgânicas, por exemplo oxigênio e superóxido, formando espécies reativas de nitrogênio, podem também reagir com ácido deoxiribonucleico (DNA), grupos prostéticos e até proteínas. Além disso, já foi demonstrado na literatura aumento na expressão e atividade da iNOS e eNOS em pacientes com osteoartrite e doenças intestinais inflamatórias (KUMAR, SINGHC, BHARDWAJA, 2017; SOUFLI et al., 2016; BURKE et al., 2013).

2.4.2 Metaloproteinases de matriz

Metaloproteinases de matriz (MMPs) são enzimas proteolíticas que apresentam como funções a degradação e renovação da matriz extracelular, também atuando na ativação de quimiocinas e citocinas e na secreção de proteínas ligantes. Pertencem a uma extensa família de enzimas, incluindo colagenases, gelatinases, estromelinas e matrilisinas, sendo classificadas de acordo com a estrutura e especificidade dos substratos sob os quais atuam. O grupo das gelatinases inclui principalmente as MMP-2 e MMP-9 (YANG, ROSENBERG, 2015; CHENG et al., 2017).

As MMPs possuem um sítio catalítico contendo um sítio de ligação de zinco e uma porção peptídica, contendo cerca de 80 aminoácidos, que possui resíduos de cisteína, da qual o grupo tiol está interagindo com o íon zinco do sítio catalítico na forma inativa da enzima. Podem ser secretadas ou permanecerem ancoradas a membrana celular, a ancoragem pode ocorrer por um domínio transmembrana, um glicosilfosfatidilinositol ou um amino N-terminal (PARKS, WILSON, LOPEZ-BOADO, 2004). As MMPs são secretadas na forma latente e uma vez ativada são inativadas por uma série de mecanismos, principalmente por inibidores teciduais de metaloproteinases (YANG, ROSENBERG, 2015; CHENG et al., 2017).

Podem ser classificadas como enzimas constitutivas, como a MMP-2 e a MMP-14, e enzimas induzíveis, como a MMP-3 e a MMP-9 (Figura 4). Geralmente as enzimas constitutivas são ativadas de uma maneira específica e atuam próximo ao sítio de ação, prevenindo o crescimento descontrolado da matriz extracelular. Por outro lado, as enzimas induzíveis, são ativadas a partir de um estímulo, como a presença de um processo inflamatório, pela ação de radicais livres e outras enzimas. As enzimas induzíveis após a ativação promovem um dano tecidual mais extenso que as enzimas constitutivas, por agir em locais distintos daquele onde ocorre a ativação (YANG, ROSENBERG, 2015).

Ao longo dos anos têm sido estudado a relação entre os níveis de MMPs e doenças inflamatórias ou associadas com inflamação, tais como artrite reumatóide e câncer, sendo observado aumento ou desregulação dos níveis de certas MMPs na maioria dessas doenças. Apesar do mecanismo de ação das MMPs na inflamação não ser totalmente elucidado, é clara a participação destas no desenvolvimento de um processo inflamatório (PARKS, WILSON, LOPEZ-BOADO, 2004).

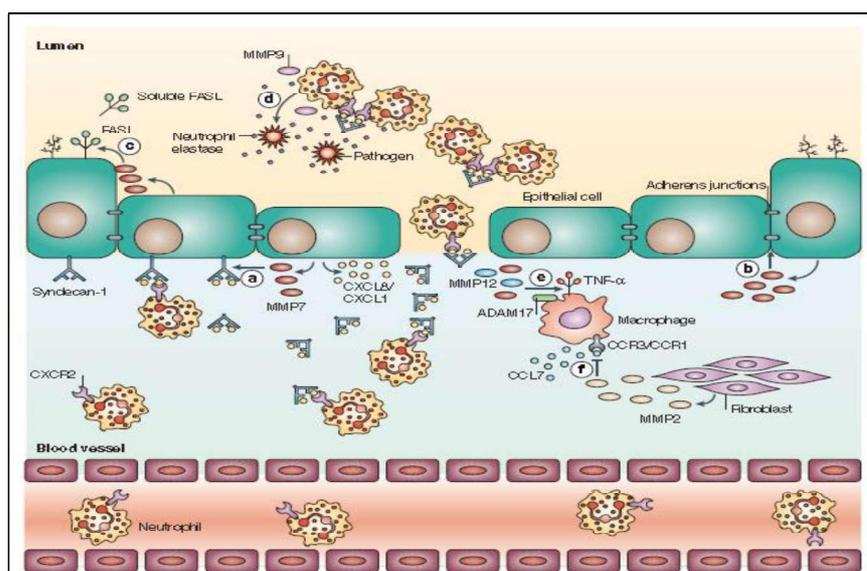


Figura 4. Ação das MMPs no processo inflamatório decorrente de injúria tecidual. A injúria desencadeia uma série de respostas com objetivo de reparar o tecido e defendê-lo contra infecção. As MMPs produzidas pelas células teciduais tem atividades específicas nesse processo. As células epiteliais, que produzem quimiocinas, responsáveis pela ativação dos neutrófilos, também liberam MMP-7, que facilita o gradiente de quimiocinas favorecem assim o influxo e ativação de neutrófilos (a). Após a ativação, neutrófilos liberam muitas proteases, entre elas a elastase, que possui atividade antimicrobiana. Esses neutrófilos também liberam MMP-9, que degrada um potente inibidor da elastase de neutrófilos (1-antiproteinase) (d). A ativação da forma latente de TNF na superfície de células como macrófago é devido a proteólise mediada por MMPs (e). MMPs também podem atuar diretamente em quimiocinas, tanto aumentando quanto reduzindo suas atividades. Por exemplo, a MMP-2, que é produzida por células mesenquimais, pode clivar e inativar ligantes de quimiocina 7 (f). Fonte: PARKS, WILSON, LOPEZ-BOADO, 2004.

2.4.3 Receptores do tipo toll

Os receptores do tipo toll (TLRs) são proteínas de domínio transmembrana tipo I com uma estrutura tripartite, consistem em um domínio extracelular amino (N)-terminal contendo repetições ricas em leucina que se dobram em estrutura de ferradura e é responsável pelo reconhecimento do ligante, uma única região de abrangência transmembrana e um receptor

citoplasmático globular carboxil C-terminal Toll/interleucina-1 (TIR). Os TLRs podem ser divididos em dois grupos, os localizados na membrana plasmática e ativados por lipídeos da membrana microbiana ou proteínas bacterianas e aqueles ativados por ácidos nucleicos de microorganismos e localizados nos compartimentos endolisossômicos acidificados (NARDO, 2015). Na Tabela 1, estão apresentados os principais TLRs humanos, suas localizações e seus respectivos ligantes.

Tabela 1. Localização na célula e ligantes dos TLRs presentes em humanos

TLRs	Localização	Ligantes
TLR1	Membrana plasmática	Lipoproteínas
TLR2	Membrana plasmática	Lipoproteínas, zimosan, manoproteínas, peptideoglicano, ácido lipoteicoico
TLR3	Membrana endolisossomal	dsRNA viral
TLR4	Membrana plasmática e membrana endolisossomal	LPS
TLR5	Membrana plasmática	Flagelina
TLR6	Membrana plasmática	Lipoproteínas, ácido lipoteicoico, zimosan
TLR7	Membrana endolisossomal	ssRNA viral e bacteriano
TLR8	Membrana endolisossomal	ssRNA viral e bacteriano
TLR9	Membrana endolisossomal	CpG DNA viral e bacteriano, DNA:RNA híbridos
TLR10	Membrana plasmática	Desconhecida

Na maioria dos casos, a ligação dos TLRs com seus ligantes causa dimerização do receptor, no entanto, os TLRs endossômicos (TLR7, TLR8 e TLR9) têm sido apresentados como dímeros pré-formados. A dimerização dos TLRs na presença do ligante resulta em mudança de conformação nos domínios TIR, estabilizando o complexo receptor e levando ao

recrutamento de domínios TIR adaptadores para iniciar a cascata de sinalização (NARDO, 2015).

Por exemplo, para o TLR4 após a ligação do LPS, a dimerização de dois complexos TLR4/MD2 ocorre, resultando em mudança de conformação do homodímero de TLR4 que induz o recrutamento de proteínas contendo domínios TIR. Esses adaptadores se associam com o TLR4 por meio de interações homofílicas entre os domínios TIR no TLR4 e aqueles presentes no adaptador (MOLTENI, GEMMA, ROSSETTI, 2016).

A proteína 88 de resposta mielóide primária (MyD88) é um desses adaptadores. O sinal MyD88-mediado ocorre principalmente no plasma da membrana e envolve um rápido recrutamento de proteínas MyD88 e adaptador do tipo MyD88 (MAL). A ligação desses adaptadores moleculares estimulam o recrutamento e ativação dos componentes da cascata por meio da fosforilação de receptores IL-1 associados a quinase (IRAKs), a associação de receptores TNF associados ao fator 6 (TRAF6) e a ativação do fator transformador de crescimento β -ativado quinase 1 (TAK1). O TAK1 por sua vez ativa a proteína quinase mitógena-ativada (MAPKs), quinase JUN N-terminal (JNK), p38, quinase sinal-reguladora extracelular (ERK1/2) e o I κ B complexo quinase (IKK), levando a ativação de importantes fatores de transcrição, como o fator nuclear kappa B (NF- κ B) e proteína-1 ativadora (AP-1), que promovem a produção de citocinas pró-inflamatórias (Figura 5) (MOLTENI, GEMMA, ROSSETTI, 2016).

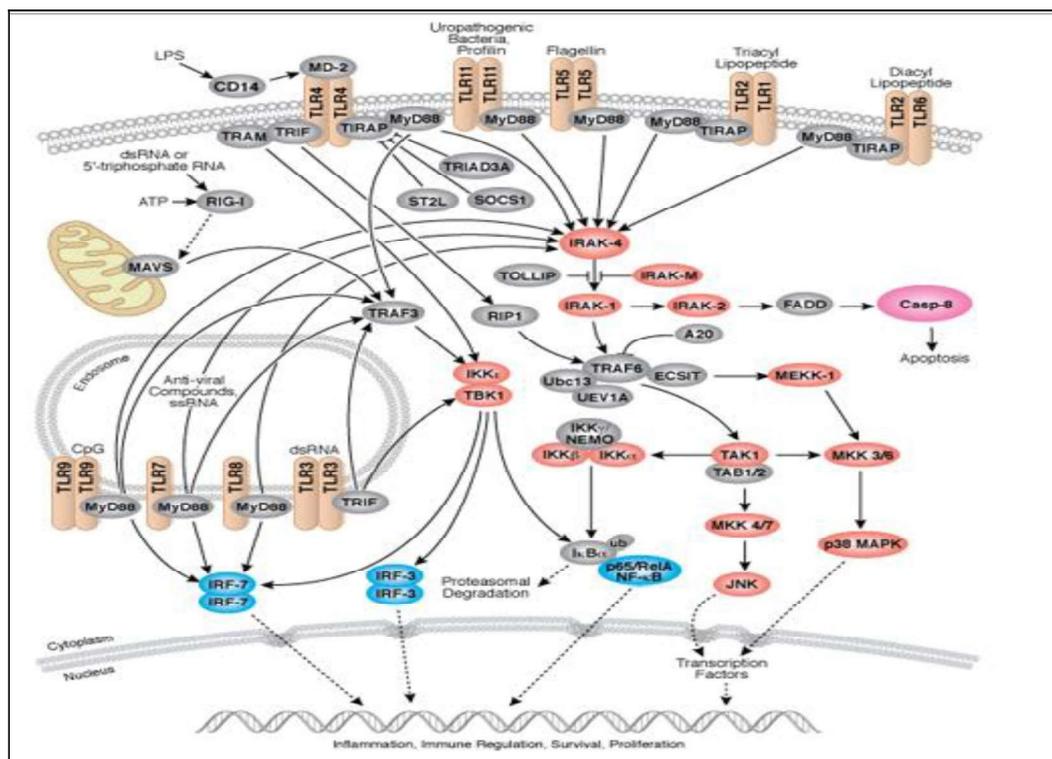


Figura 5. Ativação dos TLRs e da cascata de sinalização. Os TLRs 1 são ativados por patógenos, os 5 por flagelina, os 2 e 6 por lipopeptídeos e os 4 por LPS, sendo necessária a co-ativação do CD14. De maneira geral, após a ativação dos TLRs, o MyD88 recruta receptores IL-1 associados a quinase 4 (IRAK-4), esses ativam IRAK-1 por fosforilação, o que leva a sua associação com o TRAF6, ativando o complexo IKK e levando a ativação de quinases da via do MAPK e do NF- κ B. As quinases degradam o I κ B e liberam o NF- κ B, esse então é translocado para o núcleo onde atua sobre a transcrição de fatores inflamatórios, proliferativos e imunes. Existem ainda TLRs (3, 7 e 9) presentes em endossomos no citoplasma celular, que da mesma forma atuam na cascata via IRAK-4. Fonte: [https://www.cellsignal.com/contents/science-cst-pathways-immunology-and-inflammation/toll-like-receptors-\(tlrs\)-interactive-pathway/pathways-tlr](https://www.cellsignal.com/contents/science-cst-pathways-immunology-and-inflammation/toll-like-receptors-(tlrs)-interactive-pathway/pathways-tlr)

2.4.4 NF- κ B

O NF- κ B é um fator de transcrição presente em todas as células do corpo, responsável pelo controle da expressão de genes envolvidos no ciclo celular, diferenciação celular e tecidual, reparo de DNA e resposta imune, sendo a ação sobre a resposta imunológica uma das principais atividades descritas. Pode ser induzido por uma variedade de estímulos como antígenos virais e bacterianos, células T e B, citocinas, radicais livres, entre outros (PANDAY et al., 2016).

No estado inativo, o NF- κ B está localizado no citoplasma formando um complexo com o inibidor de NF- κ B, os I κ Bs, que são proteínas que bloqueiam a entrada do NF- κ B para o núcleo. Após a ativação do complexo IKK por um estímulo externo, ocorre a fosforilação do I κ B, ocorrendo a degradação do mesmo e a consequente liberação do NF- κ B que pode então ser translocado para o núcleo e atuar, por exemplo, induzindo a expressão de genes inflamatórios (ZHANG, LENARDO, BALTIMORE, 2017).

A ativação do NF- κ B tem um papel crítico na inflamação pela regulação da expressão de genes responsáveis pela resposta inflamatória a vários estímulos, como agentes infecciosos e radicais livres. O NF- κ B está relacionado com a produção de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas, principalmente TNF- α , IL-6 e interleucina-1 β (IL-1 β), quimiocinas e moléculas de adesão. Dessa forma, diversos estudos têm buscado inibidores do NF- κ B como possíveis agentes anti-inflamatórios (WANG et al., 2014).

2.4.5 Citocinas

As citocinas são proteínas de baixo peso molecular que medeiam a comunicação intracelular e são produzidas por muitos tipos de células, principalmente as células do sistema

imune, como macrófagos e linfócitos. Essas estão associadas com diversos processos como regulação da inflamação local e sistêmica, proliferação celular, reparação de tecido, sendo a função primária a regulação da inflamação, tanto aguda quanto crônica. Cada citocina liga-se a um receptor celular de superfície específico para gerar uma cascata de sinalização celular que influencia a função da célula (DUQUE, DESCOTEAUX, 2014).

As citocinas apresentam diversas funções, algumas apresentando funções similares, em tipos celulares distintos e até mesmo funções opostas sobre as mesmas células, como por exemplo, as citocinas pró-inflamatórias - IL-1, IL-6 e TNF- α - e anti-inflamatórias – interleucina 10 (IL-10), fator transformador de crescimento β (TGF- β). Já foram observadas em estudos altas concentrações das citocinas TNF- α e IL-6 durante o desencadeamento de estados inflamatórios. As citocinas também foram associadas com várias doenças como obesidade, alzheimer, diabetes, artrite reumatoide e aterosclerose. As ações das citocinas nos processos inflamatórios podem estar relacionadas com a ativação de genes como os de MMPs, elevação da síntese de proteína C reativa e de moléculas de adesão, como a molécula de adesão intercelular -1 (ICAM-1), responsável pelo recrutamento de células imunes (CHEN et al, 2017; TURNER et al., 2014).

2.4.6 Corpúsculos lipídicos

Corpúsculos lipídicos (CLs) são organelas citoplasmáticas formadas por um core lipídico neutro (fosfolípidos e ésteres de colesterol) cercado por uma monocamada de fosfolípidos que apresenta uma diversidade de proteínas associadas (Figura 6) (BOZZA, VIOLLA, 2010; HERKER, OTT, 2012).

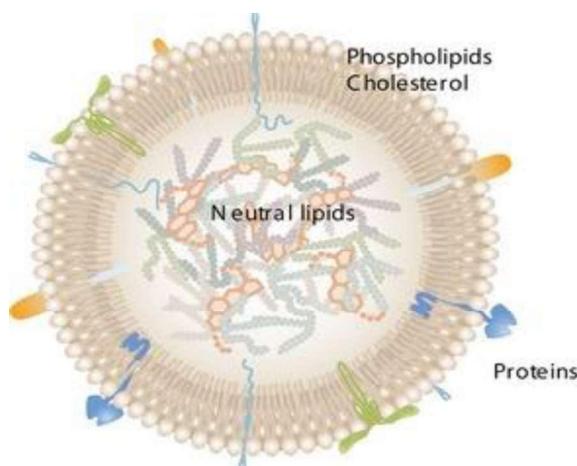


Figura 6. Estrutura do corpúsculo lipídico. Fonte: BOREN et al. (2013).

Durante um longo período os CLs foram considerados organelas específicas de determinados tipos celulares, como hepatócitos e adipócitos, e sua presença associada apenas com o armazenamento intracelular de lipídeos, no entanto com o avanço dos estudos foram observadas a presença de CLs em outras células, por exemplo leucócitos, no qual são sítios de mediadores inflamatórios (MURPHY et al, 2011). Além disso, diversas funções têm sido associadas aos CLs, tais como ativação e sinalização celular e transporte de lipídeos e proteínas. Igualmente têm sido relacionados com a patogênese de diversas doenças, incluindo aterosclerose, diabetes, obesidade e câncer (ROBENEK, 2006; MURPHY et al, 2011).

O modelo predominante sobre a formação dos CLs descreve que estes são originados do retículo endoplasmático (RE). O CL em formação apresenta conteúdo lipídico e a monocamada fosfolipídica derivada do RE originário e o processo para a ligação das proteínas a membrana do CL depende do tipo de proteína, podendo envolver vias de transporte mediadas por vesículas, difusão lateral com a membrana do RE, entre outros (BOZZA, VIOLLA, 2010, HERKER, OTT, 2012).

Os CLs estão relacionados com o processo inflamatório sendo responsáveis pelo armazenamento e sinalização para a formação de eicosanoides. Os eicosanoides pertencem a família do ácido araquidônico e são sinalizadores lipídicos que atuam na ativação, migração e proliferação celular. Além disso, diferentes enzimas envolvidas no metabolismo do ácido araquidônico, que tem como produto os eicosanoides, foram encontradas nos CLs, ratificando a participação destes na produção de mediadores inflamatórios (BOZZA, VIOLLA, 2010). Ademais, os CLs têm sido identificados abundantemente em células participantes de processos inflamatórios e degenerativos (PACHECO et al., 2002).

A regulação sobre inibidores da formação dos CLs têm sido estudada como estratégia para redução de sua formação e conseqüentemente terapia para as patogêneses com que estão associados. Um dos alvos bastante estudados é o receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR γ), tendo sua inibição em macrófagos já sido relacionada com a redução do número de CLs e o aumento da destruição de patógenos (BOZZA, VIOLLA, 2010).

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

A extração e caracterização química parcial de polissacarídeos sulfatados da alga verde *U. lactuca* L., bem como a avaliação da atividade anti-inflamatória destes em linhagem de macrófagos RAW 264.7 e macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 estimulados com LPS.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter os PS por fracionamento com volumes crescentes de acetona;
- Caracterizar quimicamente os PS das frações obtidas (açúcares totais, sulfato, ácidos urônicos, proteínas e fenólicos);
- Caracterizar físico-quimicamente (eletroforese em tampão PDA, peso molecular por eletroforese em tampão TBE e coluna de gel-filtração);
- Determinar a composição monossacarídica de cada fração por FACE;
- Analisar as frações por RMN (RMN ¹³C; RMN ¹H; RMN 2D HSQC; RMN 2D COSY);
- Analisar a citotoxicidade dos PS em macrófagos da linhagem RAW 264.7;
- Avaliar a atividade dos PS sobre a produção indireta de óxido nítrico com estímulo com LPS em cultura de macrófagos RAW 264.7 e em macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6;
- Avaliar ação dos PS sobre o atividade das MMP 2 e 9 em macrófagos RAW 264.7 e em macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6;
- Avaliar o efeito dos PS sobre a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos RAW 264.7 e em macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6;
- Avaliar a atividade dos PS sobre a produção de citocinas, TNF- α e IL-6 em macrófagos RAW264.7.
- Analisar a translocação do NF-kB após estímulo com LPS e incubação com o PS de *U. lactuca* L.;
- Avaliar a peroxidação lipídica pelo ensaio do TBARS;

- Avaliar a expressão de MMP-2 e 9 e PPAR γ por western blot.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 *U. lactuca* L. – Descrição taxonômica

A descrição taxonômica da alga verde *U. lactuca* L., a qual teve os polissacarídeos sulfatados investigados em nosso estudo, é:

Reino: Plantae

Filo: Chlorophyta

Classe: Ulvophyceae

Ordem: Ulvales

Family: Ulvaceae

Gênero: *Ulva*

Espécie: *Ulva lactuca* Linnaeus

4.1.2 Cultura de células

As células da linhagem de macrófago RAW 264.7, provenientes de camundongos *Mus musculus* em macrófagos com leucemia induzida por Abelson leukemia virus, foram mantidas em nitrogênio líquido (criopreservação) em solução de congelamento composta por 90% de soro fetal bovino (SFB) e 10% de DMSO. Para os ensaios, as células foram descongeladas e cultivadas em placas de petri de 100x20 mm, contendo 10 mL do meio de cultura DMEM com antibiótico penicilina/estreptomicina 0,1% e suplementado com 10% de SFB, e mantidas a 37 °C na atmosfera de 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado em dias alternados até a realização do experimento.

Os macrófagos peritoneais foram obtidos a partir de lavado peritoneal de camundongos da linhagem isogênica C57BL/6. A lavagem peritoneal foi realizada com meio RPMI gelado e suplementado com antibiótico penicilina/estreptomicina 0,1% e 2% de SFB, sendo as células mantidas à 4°C até o plaqueamento.

4.1.3 Camundongos

Os camundongos C57BL/6 foram fornecidos pelo Centro de Biologia da Reprodução da UFJF com projeto aprovado pelo comitê de Ética/UFJF - protocolo 016/2016 CEUA/UFJF. Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Biologia Celular,

Instituto de Ciências Biológicas, UFJF. Para a realização dos experimentos os camundongos tinham de 4 a 6 semanas e peso em torno de 26 gramas.

4.1.4 Reagentes

- Acetona da Proquímicos (Bogotá, Colômbia);
- Ácido bórico da Vetec Química Fina Ltda. (Duque de Caxias, RJ, Brasil);
- Ácido isobutílico, ácido sulfúrico e coomassie G-250 foram obtidos da Vetec Química Fina Ltda. (Duque de Caxias, RJ, Brasil);
- Acrilamida da Ludwig Biotecnologia Ltda. (Porto Alegre, RS, Brasil) e Bisacrilamida da Neon Comercial Ltda. (São Paulo, SP, Brasil);
- Albumina bovina obtida da INLAB (São Paulo, Brasil);
- ALCALASE® (*Bacillus licheniformis*) obtida da Merck Millipore (Darmstadt, Alemanha);
- Agarose Bio-Rad Laboratories Inc. (Richmond, CA, EUA);
- Anti-MMP9 ab38898 obtido da abcam (Cambridge, Reino Unido);
- Anti-MMP2 sc-13594 obtido da Santa Cruz (Texas, EUA);
- Anti-mouse sc-2314 obtido da Santa Cruz (Texas, EUA);
- Azul de toluidina obtido da Vetec Química Fina Ltda (Duque de Caxias, RJ, Brasil);
- Benzina adquirida da ISOFAR Indústria e Comércio de Produtos Químicos Ltda. (Duque de Caxias, RJ, Brasil);
- Brometo de cetiltrimetilamônio (CETAVLON) da Merck (Darmstadt, Alemanha);
- Cianoborohidreto de sódio e 2-aminoacridona (AMAC) foram adquiridos de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA);
- Carbazol e tetraborato de sódio foram obtidos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA);
- EDTA sol dissodico da Exodo Científica (São Paulo, Brasil);
- Gelatina Difco obtida da Interlab Distribuidora de Produtos Científicos (São Paulo, SP, Brasil);
- Meio Dulbecco MEM adquirido da Cultilab (São Paulo, Brasil);
- Meio RPMI-1640 obtido da LGC Biotecnologia (São Paulo, Brasil);
- N,N,N,N-tetrametiletlenodiamina (TEMED) obtido da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA);
- Padrões monossacarídeos obtidos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA);
- Padrões dextram sulfato (8 kDa) e dextram (60-90 kDa e 100-200 kDa) foram obtidos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA);
- Persulfato de amônio (APS) da Vetec Química Fina Ltda. (Duque de Caxias, RJ, Brasil);
- Pierce® BCA Protein Assay kit obtido da Thermo Scientific (Waltham, MA, EUA);
- PPAR γ (E-8): sc-7196 obtido da Santa Cruz (Texas, EUA);
- *Sephadex* G-200 da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA);
- Soro fetal bovino inativado e estéril da Cultilab (São Paulo, Brasil);
- Sulfamilamida e N-(1-Naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride (NED) da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA);
- SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate obtido da Thermo Scientific (Waltham, MA, EUA);

- SuperSignal West Pico PLUS obtido da Thermo Scientific (Waltham, MA, EUA);
- Thiazole blue tetrazolium bromide (MTT) obtido da Amresco (Texas, EUA).

4.1.5 Equipamentos

- Banho ultrassônico Ultra Sonic Cleaner modelo USC-2800 adquirido da Unique (Idaiatuba, São Paulo, Brasil);
- Centrífugador Excelsa Baby da Fanem Ltda (São Paulo, Brazil);
- Câmara de eletroforese em gel de agarose horizontal foi adquirido da técnica Permatron Ltda. (Joinvile, SC, Brasil);
- Centrífuga refrigerada 5810 R da Eppendorf (Hamburgo, Alemanha);
- Cuba de eletroforese horizontal DIGEL da Dongfang Equipment CO Ltd. (China, República Popular);
- Estufa de secagem e esterilização Modelo 315 da Fanem (São Paulo, Brasil);
- Fluxo laminar modelo 1300 series A2 obtido da Thermo Scientific Waltham, MA, EUA);
- Fonte de corrente contínua regulável Electrophoresis Power Supply Model 494 da Instrumentation Specialties Company (USA);
- Incubadora de células modelo 3111 da Thermo Scientific (Waltham, MA, USA);
- Sistema de eletroforese vertical Mini-PROTEAN® Tetra Cell da Bio-Rad Laboratories Inc. (Richmond, CA, EUA);
- Sistema de aquisição de imagem GelDoc-It Imaging System e Câmara Scientific Grade CCD GelCam 310, obtidos da UVP (Upland, California, EUA);
- Espectrofotômetro SP-22, Biospectro (Curitiba, PR, Brasil);
- Espectrofotômetro Multiskan GO (Leitor de Microplaca), Thermo Scientific (Waltham, MA, USA);
- Microscópio Olympus BX53 (Shinjuku, Tóquio, Japão);
- Microscópio Axio Observer.A1 equipado com AxioCam MRc e software AxioVision, da Carl Zeiss MicroImaging GmbH (Jena, Alemanha);
- Ultrassom Ultra Cleaner 800 da Unique (Idaiatuba, São Paulo, Brasil).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Extração dos polissacarídeos sulfatados

4.2.1.1 Coleta da alga

A alga verde *U. lactuca* L. foi coletada no mês de agosto de 2016, na praia Pirambúzios, município de Nísia Floresta, Rio Grande do Norte. A alga foi coletada em maré baixa, retirada com auxílio de material cortante, lavada em alga corrente para eliminação completa de resíduos, seca em estufa a 30°C e triturada manualmente até a obtenção de pó.

4.2.1.2 Obtenção do pó cetônico

Cerca de 20 g da alga seca foram pesados e submetidos ao processo de deslipidação, por meio da adição de 4 volumes de acetona. A solução foi deixada em repouso por 24h a temperatura ambiente. Após esse período, o material foi filtrado e o processo foi repetido por 3 vezes para a completa eliminação dos pigmentos. O resíduo obtido foi denominado como pó cetônico de *U. lactuca* L., esse foi seco em temperatura ambiente, pesado e submetido à posterior extração (Figura 7).

4.2.1.3 Proteólise

O pó cetônico (19,2 g) obtido foi submetido a proteólise para eliminação de proteínas do material. Dessa forma, foram adicionados ao pó cetônico 8 partes de NaCl pH 8 e 194 μ L de Alcalase®, uma endoprotease que hidrolisa ligações peptídicas dentro de uma molécula de proteína. A solução foi deixada por cerca de 16 horas a 50 °C. Após esse período, a enzima foi inativa por aquecimento a 100 °C por 15 minutos. O sobrenadante foi filtrado com auxílio de gaze e centrifugado a 3000 rpm por 30 minutos em temperatura ambiente (Figura 7).

4.2.1.4 Fracionamento dos extratos brutos com acetona PA

O sobrenadante obtido após a proteólise foi medido e submetido a fracionamento com volumes crescentes de acetona PA (0,3v; 0,5 v; 0,7 v; 1,0 v). A precipitação com acetona PA foi realizada sob agitação e o precipitado mantido entre 2 e 8 °C por cerca de 16 horas. Após esse período, o material foi centrifugado a 3000 rpm, por 30 minutos, o sobrenadante foi medido e utilizado para nova precipitação com acetona PA. Os precipitados obtidos foram submetidos a secagem em dessecador, pesados, e denominados U30, U50, U70 e U100 (Figura 7).

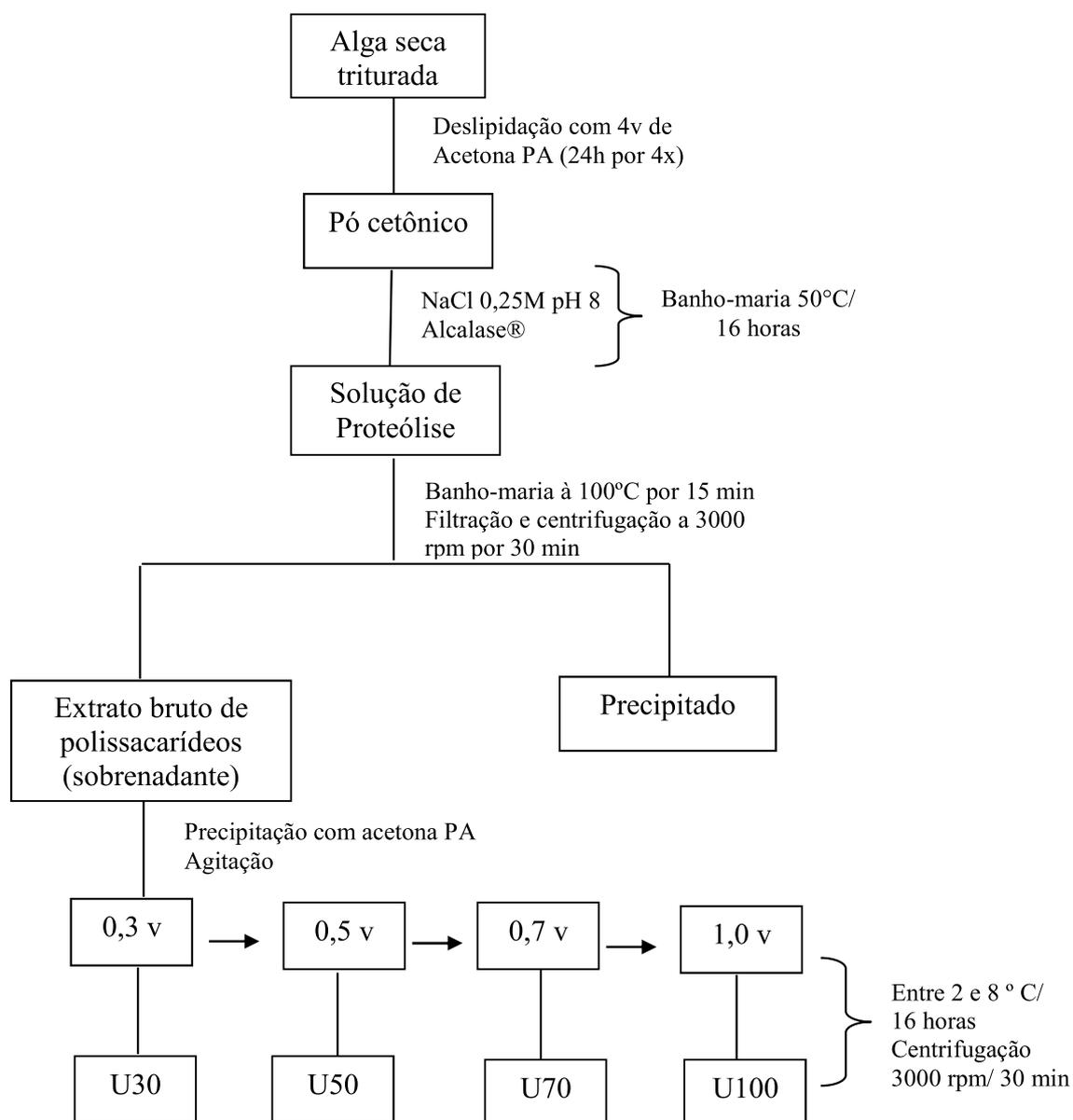


Figura 7. Esquema da extração dos polissacarídeos sulfatados de *U. lactuca L.* O pó cetônico obtido, cerca de 19,40g, foi submetido a proteólise com a enzima alcalase por cerca de 16 horas. Após esse período, a enzima foi neutralizada e o material filtrado e centrifugado a 3000 rpm por 30 min. O sobrenadante obtido foi denominado de extrato bruto de polissacarídeos, esse foi então medido e submetido a fracionamento com 0,3 v de acetona PA, sob agitação e o material mantido entre 2° e 8° por cerca de 16 horas. O material obtido após o fracionamento foi centrifugado e o sobrenadante submetido ao fracionamento com 0,5 v de acetona PA. O método foi repetido até o fracionamento com 1,0 v de acetona.

4.2.2 Eletroforese

4.2.2.1 Eletroforese em gel de agarose em tampão 1,3-diaminopropano acetato (PDA)

Foi realizada a eletroforese em gel de agarose para avaliar o perfil de migração de cada uma das frações, a migração ocorre de acordo com a interação das cargas negativas da amostra com o PDA. A eletroforese foi realizada segundo a metodologia de Dietrich & Dietrich (1976). Alíquotas de 3 a 5 μL obtidas a partir de solução 10 mg/mL das frações de polissacarídeos foram secas e ressuspendidas em 5 μL de água destilada, sendo então analisadas por eletroforese em gel de agarose (0,5%) em tampão PDA 0,05 M, pH 9,0. A corrida eletroforética foi realizada em cuba horizontal, refrigerada com gelo, submetida a uma diferença de potencial de 100 V por aproximadamente 1 hora e 30 minutos. Após a corrida eletroforética, os PS foram precipitados no gel com solução de CETAVLON 0,1% por duas horas. Em seguida, o gel foi seco em corrente de ar quente e os polissacarídeos corados com azul de toluidina 0,1%, ácido acético 1% e etanol 50% por 20 minutos. O excesso de corante foi removido com solução de ácido acético 1% e etanol 50%. A mudança de cor do corante de azul para violáceo, fenômeno denominado metacromasia, indica a presença de sulfato nos PS analisados. Uma mistura padrão de glicosaminoglicanos (GAG) (5 μL), contendo condroitim sulfato, dermatam sulfato e heparam sulfato, na concentração de 1 mg/ml cada, foi aplicada no gel como padrão de migração e para acompanhar a corrida eletroforética.

4.2.2.2 Peso molecular em gel de agarose 1%

A determinação do peso molecular modal (PM) de cada fração baseou-se na metodologia descrita por Bhilocha et al. (2011). O PM das frações U30, U50, U70 e U100 foram estimados por eletroforese em gel de agarose (1%) em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE - 100 mM de Tris, 100 mM de ácido bórico e 1 mM de EDTA) pH 8,3. As frações (100 μg) foram secas à vácuo e ressuspensas em 5 μL de tampão de amostra (solução azul de bromofenol 0,2%, glicerol 40% em tampão TBE). A corrida eletroforética foi realizada em cuba horizontal DIGEL, submetida a uma diferença de potencial de 40 V por aproximadamente 3 horas, com o gel submerso em tampão TBE. Após a corrida, o gel foi removido da placa e corado com azul de toluidina 0,1% em ácido acético 1% por 20 minutos, em seguida, o excesso de corante foi removido com solução ácido acético 1% deixado por cerca de 16 horas. Foram utilizados como padrões de PM: 100 μg de dextram sulfato (8 kDa), condoitim-4-sulfato (26 kDa) e condoitim-6-sulfato (67 kDa). O PM modal dos compostos foi obtido por análise do padrão de migração utilizando o programa TotalLab TL120 1D v 2009 (Nonlinear Dynamics Ltd.).

4.2.2.3 Eletroforese de carboidrato por fluoróforo (FACE)

A composição monossacarídica das frações U30, U50, U70 e U100 foi avaliada por FACE como descrito por Cunha et al. (2015), com modificações.

4.2.2.3.1 Derivatização dos monossacarídeos

Inicialmente as frações dos polissacarídeos obtidos foram hidrolisadas com HCl 6 M, em capilar, a 100 °C por 2 horas. Após hidrólise, alíquotas correspondentes a 80 µg de açúcar de cada fração foram secos e neutralizados a vácuo sob NaOH PA. Em seguida, as frações foram derivatizadas com 5 µL de solução de 2-aminoacridona (AMAC) 50 mM, preparada previamente em DMSO: ácido acético (85:15). Após 15 minutos em temperatura ambiente, foram adicionados 5 µL de solução recém preparada de cianoborohidreto de sódio 1 M. As frações foram incubadas em banho a 37 °C por 16 horas e, em seguida, foram adicionados 5 µL de glicerol 60%. As soluções dos padrões de monossacarídeos (2 µg) foram secas e derivatizadas com AMAC e cianoborohidreto. As frações e padrões derivatizados foram armazenados a -80 °C.

4.2.2.3.2 Preparo dos géis de poliacrilamida e eletroforese

A FACE foi realizada em sistema de eletroforese vertical com lâminas de 7,2 cm com espaçadores de 0,75 mm. A corrida eletroforética foi realizada em gel de acrilamida-bisacrilamida 25%, preparados em sistema-tampão tris-borato pH 7,0 e 6,8 e a corrida em tampão tris-glicina-borato pH 8,3.

Em cada poço foram aplicados 2 µL das amostras e padrões. A corrida eletroforética foi realizada sob uma diferença de potencial de 100 V por cerca de 20 minutos, em seguida, aumentada para 220 V até o fim da corrida. A migração dos monossacarídeos foi acompanhada utilizando luz UV 320-400nm (luz negra). Após a corrida, as imagens foram digitalizadas em GelDoc-It Imaging System (transluminador UV com filtro em 365 nm e Câmara Scientific Grade CCD GelCam 310), em diferentes tempos de exposição. As imagens obtidas foram densitometradas utilizando o programa TotalLab TL120 1D v 2009 (Nonlinear Dynamics Ltd.).

4.2.3 Dosagens químicas

4.2.3.1 *Dosagem de açúcares totais*

O método para dosagem de açúcares totais foi realizado segundo Dubois et al. (1956). Alíquotas de 10 μL das frações U30 e U100 e alíquotas de 5 μL das frações U50 e U70 obtidas a partir de solução 10 mg/mL de cada fração foram adicionadas em tubos de ensaio e o volume completado para 1000 μL com água destilada. Em seguida, foram adicionados 25 μL de fenol 80% e 2,5 mL de ácido sulfúrico PA, rápido e diretamente sobre a amostra. Os tubos foram deixados em repouso por 10 minutos, agitados e incubados na temperatura de 37 °C por 30 minutos. A leitura da absorbância foi realizada em 490 nm no espectrofotômetro SP-22. Os valores de açúcares totais foram calculados por meio de curva padrão da fucose.

4.2.3.2 *Dosagem de sulfato*

O método para dosagem de sulfato baseou-se na metodologia descrita por Dodgson (1961). Inicialmente, alíquotas de 10 μL de soluções 10 mg/mL de cada fração de polissacarídeos (100 μg) foram hidrolisadas com HCl 8M, em capilar, a 100 °C por 6 horas. Após hidrólise, as frações foram transferidas para tubos de 5 mL, secas e neutralizadas no dessecador à vácuo sob NaOH PA. Em seguida, as frações secas foram ressuspensas em 1,5 mL de água e adicionados 0,5 mL do reagente de gelatina-cloreto de bário (0,5% gelatina e 0,5% cloreto de bário). As soluções foram homogeneizadas e as leituras de absorbância foram realizadas a 500 nm no espectrofotômetro SP-22. Os valores de sulfato inorgânico foram calculados por meio da curva padrão de sulfato de sódio com concentrações entre 10 e 50 $\mu\text{g/mL}$, submetido as mesmas condições de hidrólise ácida das frações de polissacarídeos.

4.2.3.3 *Dosagens de ácidos urônicos*

O método para dosagem de ácidos urônicos baseou-se na metodologia descrita por Di Ferrante (1956). Alíquotas de 10 μL das frações obtidas a partir de solução 10 mg/mL foram adicionadas em tubos de ensaio e o volume completado para 250 μL com água destilada. Em seguida, foram adicionados, cuidadosamente pela parede, 2,5 mL do reagente borato (tetraborato de sódio 0,4% em ácido sulfúrico) e 100 μL de carbazol (0,1% em metanol 95%). Os tubos foram agitados cuidadosamente em vórtex e aquecidos em banho à 100°C por 15 minutos. A leitura da absorbância das amostras foi realizada em 525 nm no espectrofotômetro

SP-22. A concentração de ácidos urônicos foi calculada por meio de curva padrão de ácido glucurônico, com concentrações entre 5 e 40 $\mu\text{g/mL}$.

4.2.3.4 *Dosagem de proteínas*

O método para dosagem de proteínas baseou-se na metodologia descrita por Bradford (1976). Alíquotas de 10 μL obtidas a partir de solução 10 mg/mL de cada fração foram adicionadas em tubos de ensaio e o volume completado para 100 μL com água destilada. Em seguida, foram adicionados 2,9 mL do reagente de Bradford. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro SP-22 em 595 nm. Para a obtenção da curva padrão foi utilizada uma solução de albumina 1 mg/mL em água destilada, sendo testado um intervalo de 5 a 50 μg de albumina.

4.2.3.5 *Dosagem de compostos fenólicos*

O método para dosagem de compostos fenólicos baseou-se na metodologia descrita por Reicher, Sierakowski e Correa (1981), com adaptações. Cada fração foi testada na concentração de 0,5 mg/mL em água. A cada tubo de ensaio foi adicionado 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu 1:10 e 0,5 mL de solução tampão de carbonato de sódio 10%. Após repouso por 60 minutos em temperatura ambiente os tubos foram centrifugados a 3000 rpm por 5 minutos. A determinação do conteúdo total de fenólicos foi realizada a partir da curva padrão de ácido tânico. Para a obtenção da curva padrão foi utilizada uma solução estoque de ácido tânico (1 mg/mL), sendo obtidas concentrações de 1 a 20 $\mu\text{g/mL}$ de ácido tânico. A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro SP-22 em 760 nm. O teste foi realizado em triplicata e o teor de fenóis totais foi expresso em μg de ácido tânico/mL de amostra.

4.2.4 **Cromatografia**

4.2.4.1 *Cromatografia de gel filtração Sephadex G-200*

O peso molecular modal das frações também foi estimado por cromatografia de gel filtração em *Sephadex G-200*, a qual possui limite de detecção de 1-200 kDa. As frações (10 mg) foram diluídas em 1 mL de ácido acético 0,05 M e aplicadas na coluna de gel filtração contendo cerca de 70 mL de resina. Após aplicação da fração, as mesmas foram eluídas com ácido acético 0,05M em 70 frações de 1 mL. Os padrões condroitim sulfato (26 kDa), dextran

sulfato (67kDa), dextran (60-90 kDa) e dextran (100-200 kDa) (10 mg/mL) foram aplicados à coluna de *Sephadex* G-200 e eluídos da mesma forma como as amostras. Posteriormente, as frações recolhidas das amostras e padrões foram analisadas por dosagem de açúcar total descrita por Dubois et al. (1956) e eletroforese em PDA.

4.2.5 Ressonância Magnética Nuclear

A ressonância magnética nuclear (RMN) 1D e 2D (¹H, ¹³C, HSQC e COSY) foi realizada usando um espectrômetro Bruker Avance III 400 MHz. As frações U50 e U70 (40–50 mg) foram dissolvidas em D₂O e os deslocamentos químicos ¹H e ¹³C foram expressos em ppm relativos ao TMS-*d*₄ (2,2,3,3-tetradeterium-3-trimethylsilylpropionate; $\delta = 0$ para ¹³C e ¹H) a 70 °C. Os ensaios foram realizados no laboratório pertencente ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná, Paraná.

4.2.6 Ensaios biológicos

4.2.6.1 Teste de redução do MTT

O método para avaliar a redução do MTT baseou-se na metodologia descrita por Mosmann (1983). Em placa de 96 poços, foram plaqueadas 1×10^4 células RAW 264.7 por poço e submetidas a adesão por 24 horas. Em seguida, as células foram incubadas com as frações U30, U50, U70 e U100 nas concentrações de 50 e 100 µg/mL. As células ficaram em contato com as amostras por um período de 44 horas, foram então adicionados 20 µL de sal de tetrazolium MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl. Após 4 horas, a viabilidade celular foi medida pela conversão do sal de tetrazolium em cristais de formazan (coloração azul), os cristais são solubilizados em DMSO PA e a absorbância medida em leitor de microplacas em 570 nm.

4.2.6.2 Dosagem de óxido nítrico por Griess

A dosagem de óxido nítrico produzido pelos macrófagos RAW 264.7 e por macrófagos peritoneais de camundongos da linhagem C57BL/6 em condições basais e com estímulo com LPS 0,1 µg/mL foi realizada por meio do Método de Griess e baseou-se na metodologia descrita por Green et al. (1982). Para os macrófagos RAW 264.7, foram plaqueadas 8×10^4 células por poço e submetidas a adesão por 24 horas. Em seguida, as

células foram incubadas com as frações U30, U50, U70 e U100 nas concentrações de 12,5, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$. As células ficaram incubadas com as amostras e LPS por um período de 24 e 48 horas. O sobrenadante foi recolhido e o óxido nítrico determinado de forma indireta por meio da conversão de nitrato (NO_3^-) a nitrito (NO_2^-), pela ação da enzima nitrato-redutase e o nitrito quantificado pela reação de Griess. Para a reação de Griess adicionou-se a 100 μL de sobrenadante, 100 μL do reagente de Griess (sulfonilamida em H_3PO_4 5%/ N-1-naftil-etilenodiamina dihidroclorato em água destilada) e após 10 minutos a absorbância foi lida em leitor de microplaca a 560 nm. A concentração de nitrito foi determinada usando uma curva padrão de nitrato de sódio (500 a 8,7 ng/mL) e expressos em μM de NO_2^- .

Para o ensaio com os macrófagos peritoneais, foram plaqueadas 1×10^6 células por poço e submetidas a adesão por 16 horas. Em seguida, as células foram incubadas com a fração U70 nas concentrações 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ e realizado estímulo com LPS 0,1 $\mu\text{g/mL}$. O procedimento para dosagem do nitrito foi o mesmo descrito anteriormente para os macrófagos RAW 264.7.

4.2.6.3 Dosagem de óxido nítrico em dois modelos de estímulo nos tempos de 30 minutos e 24 horas

Também foi avaliada em macrófagos RAW 264.7 a produção de óxido nítrico por dois modelos de estímulo. Para o tempo de 30 minutos, no modelo 1 buscou-se avaliar uma ação preventiva, incubando as células com a fração U70 nas concentrações 12,5, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ por um período de 30 minutos, em seguida o sobrenadante foi recolhido e as células estimuladas com LPS 0,1 $\mu\text{g/mL}$ também por 30 minutos. Após tratamento e/ou estímulo as células foram incubadas com meio DMEM suplementado com SFB 2% por 48 horas (Figura 8A). Já no modelo 2, buscou-se avaliar uma ação curativa, no qual as células foram estimuladas com LPS 0,1 $\mu\text{g/mL}$ por 30 minutos, em seguida o sobrenadante foi recolhido e as células incubadas com a fração U70 por 30 minutos. Após tratamento e/ou estímulo as células foram incubadas com meio DMEM SFB 2% por 48 horas (Figura 8B).

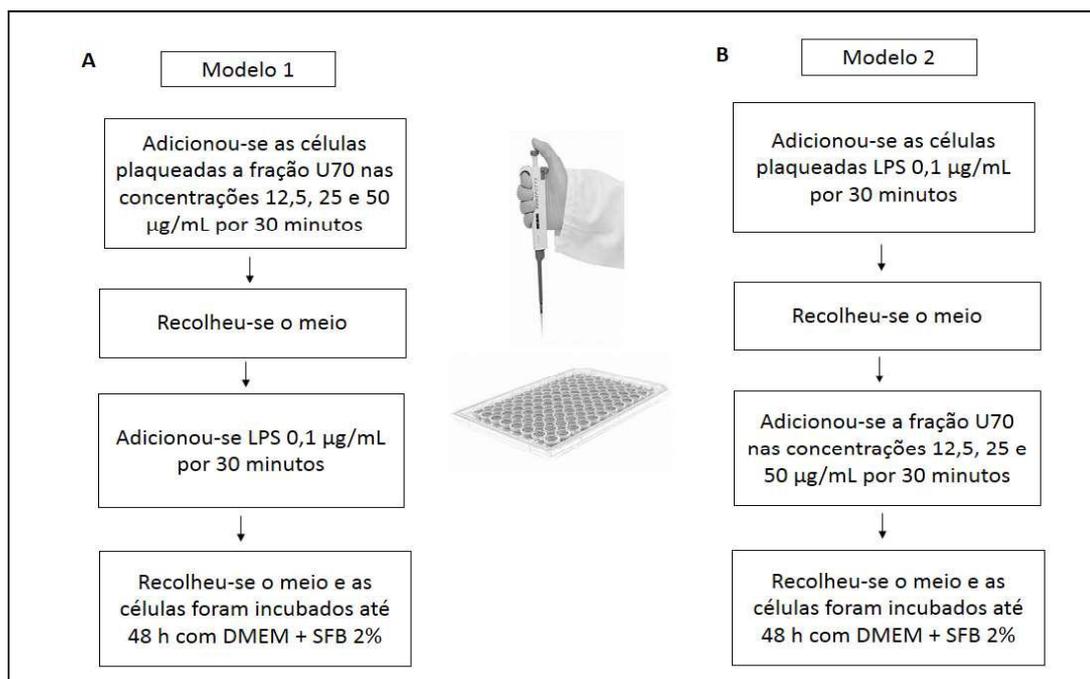


Figura 8. Esquema dos modelos da dosagem de óxido nítrico após estímulo por 30 minutos. A. Modelo 1. B. Modelo 2.

Para o tempo 24 h, no modelo 1 as células foram incubadas com a fração U70 por 24h nas concentrações 12,5, 25 e 50 µg/mL e estimuladas por mais 24 h com o LPS 0,1 µg/mL e dá mesma maneira para o modelo 2, 24 h de estímulo com LPS 0,1 µg/mL e mais 24h de incubação com a fração U70 nas concentrações 12,5, 25 e 50 µg/mL.

O procedimento de plaqueamento e quantificação de nitrito foi realizado como descrito anteriormente.

4.2.6.4 Avaliação da atividade das metaloproteinases por zimografia

4.2.6.4.1 Cultura de células

Em placa de 96 poços, foram plaqueadas 8×10^4 células RAW 264.7 por poço e esperado 24 horas para adesão das células. Em seguida, as frações U50 e U70 foram aplicadas nas concentrações de 12,5, 25, 50 e 100 µg/mL e o estímulo foi realizado com LPS 0,1 µg/mL em DMEM suplementado com SFB 2%. As células ficaram em contato com as amostras e LPS por um período de 48 horas. O sobrenadante foi recolhido para ser utilizado para a dosagem.

4.2.6.4.2 Dosagem de proteínas pelo método BCA

Foi realizada a dosagem de proteínas no sobrenadante utilizando-se o kit Pierce® BCA Protein Assay Kit. Em placa de 96 poços, foi adicionado 5 µL de sobrenadante e o volume completado para 25 µL. Em seguida, adicionou-se 200 µL do reagente de trabalho (50 partes de BCA reagente A + 1 parte de BCA reagente B). A dosagem de proteínas foi realizada por meio da curva padrão de albumina (1 mg/mL), para tal foram adicionados 25 µL de albumina com concentração entre 2000 a 25 mg/mL e 200 µL do reagente de trabalho. A placa foi então incubada a 37°C por 30 minutos e a leitura realizada em leitor de microplacas a 540 nm.

4.2.6.4.3 Zimografia

A zimografia foi realizada em sistema de eletroforese vertical Mini-PROTEAN Tetra Cell com lâminas de 7,2 cm com espaçadores de 0,75 mm. A corrida eletroforética foi realizada em gel de acrilamida-bisacrilamida 7,5 %, preparados em sistema-tampão tris-glicina (250µM/1,92M) pH 8,3 contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) 1 %. Para análise da atividade das metaloproteinases foi adicionado gelatina 2,5 % como substrato ao gel (gelatina sem sabor Royal®).

Volumes equivalentes a 10 µg de proteína de cada amostra, previamente quantificadas, foram aplicadas ao gel para migração eletroforética (30 mA à 4 °C) em tampão de Tris-glicina (25mM/192mM). Após a migração, os géis foram lavados com 100 mL de Triton X-100 2% e incubados com 100 mL de tampão de incubação (50 mM Tris-HCl, pH 8.2, 5mM CaCl₂ e 1µM ZnCl₂) por 24 horas à 37 °C. Em seguida, os géis foram corados com Coomassie Blue R250 (0,5% de corante, 30% de metanol e 10% ácido acético) e descorados com solução descorante (30% de metanol e 10% ácido acético). A atividade das gelatinases foi evidenciada pela presença de regiões claras nos géis. Para medir a intensidade dessas bandas foi utilizado o programa TotalLab TL120 1D v 2009 (Nonlinear Dynamics Ltda).

4.2.6.5 Dosagem de citocinas por ELISA

Para quantificação de citocinas pró-inflamatórias produzidas pela célula RAW 264.7, as células foram estimuladas com LPS 0,1 µg/mL, e concomitante, incubadas com as frações U50 e U70 nas concentrações de 50 e 100 µg/mL por 48 horas. A dosagem das citocinas, TNF-α e IL-6 presentes nos sobrenadantes da cultura celular foi realizada pelo método de

ELISA do tipo sanduíche, de acordo com as instruções do fabricante dos kits (Duo Set Kit, R & D Systems, Minneapolis, MN, EUA).

4.2.6.6 Translocação do fator de transcrição NF- κ B por imunohistoquímica

As células RAW 264.7 (50.000 células) foram plaqueadas sobre lamínulas estéreis, após 12 horas as células foram incubadas com a fração U70 e estimuladas com LPS 0,1 μ g/mL. Depois de 30 minutos, as células foram lavadas com HBSS⁺⁺ e fixadas com paraformaldeído 4% por 15 minutos. Foi adicionado metanol -20°C por 15 minutos e em seguida glicina 0,1M por 30 minutos em banho de gelo. As lamínulas foram então incubadas com solução de bloqueio (albumina 1%, triton x-100 0,1% em HBSS⁺⁺) por 1 hora.

As células foram então incubadas com anticorpo primário anti-p65 NF- κ B 1:800 (SC8008 –Santa Cruz) por overnight em 4 °C. Após lavagem com solução de bloqueio, incubadas com anticorpo secundário Alexa Fluor 488-conjugated 1:250 por 1 hora. O núcleo foi corado com DAPI 1:5000 em tampão de bloqueio por 30 minutos. As lamínulas foram montadas em lâminas usando Prolong Gold. As imagens foram capturadas por microscopia confocal, microscópio Axio Observer.A1 equipado com AxioCam MRc e software AxioVision, da Carl Zeiss Microimaging GmbH (Jena, Alemanha) em laboratório multiusuário da INFAR, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo.

A porcentagem da área do núcleo celular na qual o NF- κ B (fluorescência verde) estava presente após a translocação foi calculada utilizando-se o programa Image-J 1.46 (Fiji).

4.2.6.7 Avaliação da expressão de proteínas por western blot

4.2.6.7.1 Obtenção do lisado celular e sobrenadante

Para obtenção do lisado celular foram plaqueadas 2 x 10⁶ células RAW 264.7 ou células peritoneais por placa de petri 35x10 mm, esperado um período de 24 horas para adesão das células RAW 264.7 e 12 horas para os macrófagos peritoneais. Em seguida, a fração U70 foi aplicada na concentração de 100 μ g/mL e o estímulo foi realizado com LPS 0,1 μ g/mL. As células ficaram em contato com as amostras e LPS por um período de 24 e 48 horas. O sobrenadante foi recolhido e as células raspadas em PBS 1x, esse material foi centrifugado a 1500 rpm por 15 minutos a 4 °C, o pellet de células foi então ressuscitado com tampão de lise e sonificado por duas horas e após esse período centrifugado a 14000 rpm

por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e após dosagem das proteínas no material, adicionado tampão de amostra com mercaptopurina, fervido por 10 minutos e armazenado a -80°C até a análise.

Para detecção das metaloproteinases, foi utilizado o sobrenadante, visto que as metaloproteinases são secretadas pelas células, sendo adicionado tampão de amostra 5x a alíquotas de 35 µL de sobrenadante de cada condição testada, fervido por 10 minutos e o material armazenado a -80°C até análise.

4.2.6.7.2 Corrida

A corrida foi realizada em sistema de eletroforese vertical Mini-PROTEAN Tetra Cell com lâminas de 7,2 cm com espaçadores de 1,5 mm. A corrida eletroforética foi realizada em gel de acrilamida-bisacrilamida 10%, preparados em sistema-tampão tris-glicina (250µM/1,92M) pH 8,3 contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) 1%.

Volumes equivalentes a 60 µg de proteína de cada amostra, assim como o padrão de peso pré-corado, foram aplicados no gel para migração eletroforética (32 mA), em tampão de Tris-glicina (250µM/1,92M). Após a migração, os géis foram transferidos para membrana Immobilon® em PVDF a 200 mA por 2 horas. Em seguida, a membrana foi bloqueada com leite em pó Molico® 2,5% por uma hora. Para avaliação da expressão de PPAR γ a membrana foi incubada com o anticorpo primário PPAR γ (E-8): sc-7196 diluído 1:500 em leite em pó por overnight e com anticorpo secundário anti-mouse sc-2314 diluído 1:10.000 por 1 hora. Já para avaliação das metaloproteinases foi utilizado como anticorpo primário anti-MMP9 ab38898 e anti-MMP2 sc-13594 diluído 1:1000 e como anticorpo secundário anti-mouse sc-2314 diluído 1:10.000.

4.2.6.7.3 Revelação

As membranas foram reveladas em sala escura utilizando filmes Amersham Hyperfilm™ ECL (GE Healthcare) com os reveladores SuperSignal West Pico PLUS e SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate com o tempo de exposição entre 20 e 40 minutos. As bandas proteicas foram escaneadas e densitometradas no programa TotalLab TL120 1D v 2009 (Nonlinear Dynamics Ltda).

4.2.6.8 *Biogênese de corpúsculo lipídicos*

4.2.6.8.1 Linhagem celular RAW 264.7

Para análise quantitativa de corpúsculos em linhagem RAW 264.7, as células (1×10^6 /poço) foram plaqueadas em placas p24 contendo lamínulas circulares de 12 mm no fundo para adesão dos macrófagos. Foi esperado um período de 24h para adesão das células para posterior estimulação. Os macrófagos foram incubados com a fração U70 nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ com e sem estímulo com LPS (0,1 $\mu\text{g/mL}$). Após período de 24 horas o sobrenadante foi recolhido e as células coradas com Oil red O para posterior análise.

4.2.6.8.2 Macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6

Para a extração dos macrófagos peritoneais, os camundongos da linhagem C57BL/6 foram eutanasiados em câmara de CO_2 , em seguida foi realizada lavagem peritoneal com 4 mL de RPMI com SFB 2%. Foi utilizado um pool de 5 animais para cada um dos três grupos avaliados. Após contagem em câmara de Neubauer utilizando reagente de Turkey, as células obtidas do lavado peritoneal foram plaqueadas (1×10^6 /poço) em poços contendo lamínulas circulares no fundo para adesão dos macrófagos. As células foram incubadas por 2 horas e, posteriormente, os poços foram lavados por duas vezes com RPMI com antibiótico penicilina/estreptomicina 0,1% para a retirada das células não aderidas. Os macrófagos foram incubados com a fração U70 nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ com e sem estímulo com LPS (0,1 $\mu\text{g/mL}$). Após período de 24 e 48 horas o sobrenadante foi recolhido e as células coradas com Oil red O para posterior análise.

4.2.6.8.3 Coloração por Oil red O

A coloração de corpúsculos lipídicos foi realizada com o corante de lipídios neutros, Oil red O (ORO), onde as lamínulas contendo as células foram fixadas em formalina 10% por 20 min a 24h. Em seguida as lamínulas foram lavadas por duas vezes com água destilada. Posteriormente, as lamínulas receberam solução de ORO por 5 min. Em seguida, foram lavadas novamente com água destilada e cobertas com isopropanol 30%. As lamínulas foram então lavadas por duas vezes com água destilada e lavadas com solução de 4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI) em PBS 1x. Em seguida, montadas com glicerol 70%. Os corpúsculos lipídicos foram analisados no campo claro e contadas um total de 50 células por lamínulas. A morfologia das células fixadas foi observada e fotografada em microscópio de fluorescência

Olympus BX53, equipado com câmera digital, em objetiva de 100x. As imagens foram processadas pelo programa Image-J 1.46 (Fiji).

4.2.6.9 Avaliação da peroxidação lipídica pelo método das substância reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O método para avaliar a peroxidação lipídica baseou-se na metodologia descrita por Draper e Hadley (1990) com modificações. Em placa de petri 35x10 mm foram plaqueadas 1×10^6 células RAW 264.7 por poço e submetidas a adesão por 24 horas. Em seguida, as células foram incubadas com a fração U70 nas concentrações de 12,5, 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$. As células ficaram em contato com as amostras por um período de 30 minutos. Em seguida o meio foi retirado e as células recolhidas com 100 μL de tampão de lise (Tris.HCl 50 mM, Tween 20 1%, NaCl 150 mM, EGTA 1mM, inibidor de protease). Foram adicionados 200 μL de PBS com BHT 0,2% e o material conservado a -80°C até a análise.

Para a quantificação do malondialdeído formado foi adicionado a eppendorfs, alíquotas das amostras correspondentes a 100 μg de proteínas e 50 μL de TBA a 0,67%. Em seguida, os eppendorfs foram incubados em banho seco à 96°C por 45 minutos. A absorbância das soluções foi medida em leitor de microplacas em comprimento de onda igual a 535 nm.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas usando o programa *GraphPad Prism*® versão 6.0. Os dados obtidos neste estudo foram representados como média \pm desvio padrão da média. Para comparações envolvendo mais de dois grupos a análise de variância (Oneway ANOVA) foi usada para determinar as diferenças, utilizando o teste estatístico de Tukey. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Foi considerado significativo os valores de $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 DOSAGENS QUÍMICAS DAS FRAÇÕES DE *U. lactuca* L.

Os PS foram obtidos a partir do pó cetônico de *U. lactuca* L. (19,2 g) que foi submetido ao fracionamento com volumes crescentes de acetona (0,3v, 0,5v, 0,7v, 1,0v). As quatro frações obtidas foram denominadas U30, U50, U70 e U100, das quais os rendimentos e as concentrações de açúcares, sulfatos, ácidos urônicos, proteínas e compostos fenólicos estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Concentrações obtidas nas dosagens químicas, relações entre seus constituintes e rendimento da extração dos polissacarídeos de *U. lactuca* L. para as frações U30, U50, U70 e U100

Fração	Açúcares totais (mg/mL)	Sulfato (mg/mL)	Ácidos urônicos (mg/mL)	Açúcares totais (mmol)	SO ₄ ⁻ (mmol)	Ácidos urônicos (mmol)
U30	4,15	2,5	1,11	0,25	0,26	0,06
U50	6,96	2,78	2,33	0,42	0,29	0,12
U70	6,64	2,69	2,86	0,55	0,28	0,15
U100	5,97	3,42	0,74	0,36	0,35	0,04

Fração	Açúcares totais/ Açúcares totais	SO ₄ ⁻ / Açúcares totais	Ácidos urônicos/ Açúcares totais	Proteínas (mg/mL)	Fenólicos (µg/mL)	Rendimento (%)
U30	1	1,03	0,22	0,08	n.d	1,24
U50	1	0,68	0,28	0,24	n.d	14,54
U70	1	0,69	0,26	0,22	n.d	0,88
U100	1	0,98	0,11	0,19	n.d	1,44

Legenda: n.d - não detectado

O conteúdo de açúcares totais variou entre 4,15 e 6,96 mg/mL (41,5% e 69,6%) e de sulfato entre 2,50 e 3,42 mg/mL (25% e 34,2%). Ácidos urônicos estão presentes em todas as frações e as proteínas estão em baixa concentração entre 0,08 e 0,24 mg/mL (0,8% e 2,4%). Não foi identificada a presença de fenólicos.

6.2 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE EM TAMPÃO PDA PH 9,0

A eletroforese em gel de agarose em tampão PDA foi realizada com objetivo de avaliar o perfil eletroforético de cada fração, assim como avaliar a presença de compostos sulfatados pela metacromasia, indicada pela mudança de cor do corante (azul de toluidina 0,1%, ácido acético 1% e etanol 50%) de azul para violáceo.

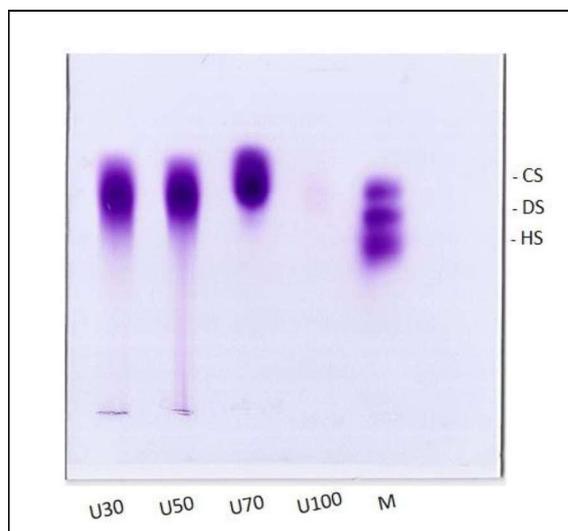


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose em tampão PDA pH 9,0. Foi aplicado no gel de agarose 50 μg das frações U30 e U100 e 30 μg das frações U50 e U70. Em seguida, foi realizada a corrida eletroforética a uma diferença de potencial de 100 V por aproximadamente 1 hora e 30 minutos, com o gel submerso em tampão PDA. M - mistura padrão de CS, DS e HS (5 μg de cada).

Na figura 9 está apresentado o gel de agarose, as frações apresentaram perfil eletroforético semelhante. Para as frações U30, U50 e U70 ocorreu metacromasia indicando a presença de compostos sulfatados, já a fração U100 foi visualizada como uma banda pouco corada pelo azul de toluidina.

6.3 DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR DAS FRAÇÕES DE *U. lactuca* L. POR ELETROFORESE EM TAMPÃO TBE E CROMATOGRAFIA DE GEL FILTRAÇÃO Q-SEPHADEX G-200

O peso molecular das frações de *U. lactuca* L. foi determinado por métodos distintos, eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE e por cromatografia em gel filtração.

Na análise por eletroforese utilizou-se padrões de açúcares sulfatados (DS, C6S e C4S) com distintos PM, as frações apresentaram peso molecular estimado entre 41,2 e 103,94 kDa, os resultados encontrados estão apresentados na Figura 10. As frações U30 e U50 apresentaram duas bandas, enquanto a fração U70 apresentou uma única banda. Não foi

possível estimar o peso molecular da fração U100, pois essa fração não se cora com o corante azul de toluidina 0,1% em ácido acético 1%.

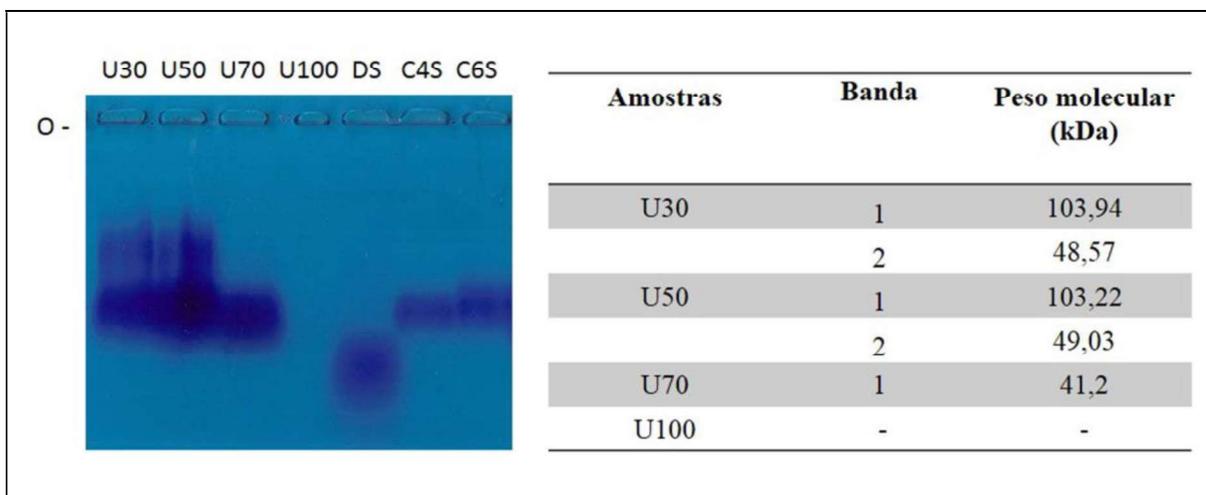


Figura 10. Peso molecular das frações em gel de agarose em tampão TBE pH 8,3. As frações foram analisadas em gel de agarose 1% coradas com azul de toluidina 0,1%. A figura apresenta a imagem do gel de agarose e a tabela com as bandas de cada fração e seus pesos moleculares estimados. Legenda: DS. Dextram sulfato (8 kDa); C4S. Condroitim-4-sulfato (26 kDa); C6S. Condroitim-6-Sulfato (67 kDa); O - Origem.

Como descrito, o peso molecular das amostras também foi estimado por gel filtração Q-Sephadex G-200, nessa análise o perfil cromatográfico de cada fração foi determinado por dosagem de açúcar pelo método de Dubois et al. (1956) e o peso molecular estimado por comparação com os padrões utilizados. Os resultados obtidos, apresentados na Figura 11, foram similares aos encontrados na eletroforese com TBE. As frações U30 e U50 apresentaram duas famílias de polissacarídeos, sendo uma com peso molecular em torno de 100 kDa e outra entre 50 e 25 kDa, já a U70 uma única família, com peso entre 40 e 30 kDa e a U100 três famílias, uma com mais de 200 kDa, que era o limite da coluna, outra com cerca de 85 kDa e a última com cerca de 20 kDa.

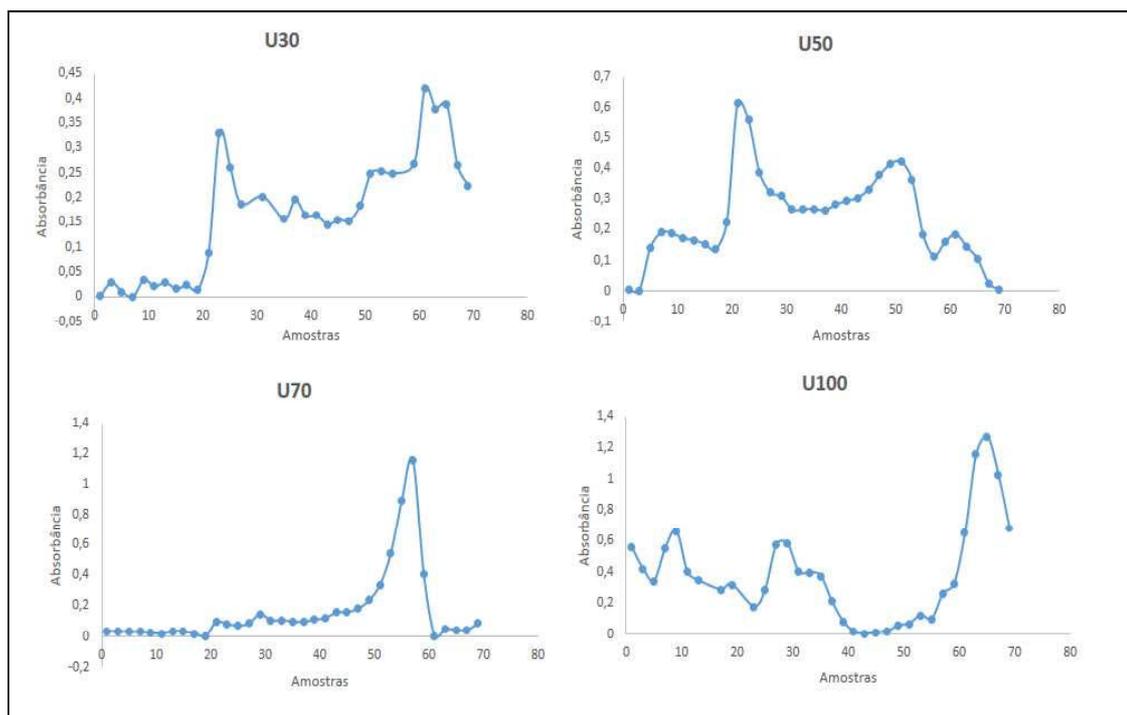


Figura 11. Gráficos da dosagem de açúcar das frações eluídas de U30, U50, U70 e U100 após cromatografia em coluna de gel filtração Q-Sephadex G-200. Foram realizadas dosagens de açúcares, pelo método de Dubois et al., 1956, das frações pares de cada eluição, tanto das amostras quanto dos padrões utilizados. Fonte: Elaborada pela própria autora.

A partir da análise da dosagem de açúcares, as frações eluídas foram então agrupadas, obtendo-se 2 grupos para fração U30 (U30-G1 e U30-G2), 3 para a U50 (U50-G1, U50-G2 e U50-G3), 1 grupo para U70 (U70-G1) e 3 grupos para U100 (U100-G1, U100-G2 e U100-G3). Os grupos foram então submetidos a eletroforese em gel de agarose com tampão PDA, juntamente com as amostra de origem, ou seja, aquelas que não foram submetidas a cromatografia em gel filtração. Na Figura 12 é possível visualizar o gel de agarose, no qual podemos observar a presença de 2 perfis de corrida eletroforética para a U30 e 2 para a U50 (U50-G2 e U50-G3 apresentaram o mesmo perfil) e a presença de 1 perfil de corrida eletroforética para fração U70. A fração U100, não apresentada, não foi visualizada com o corante utilizado.

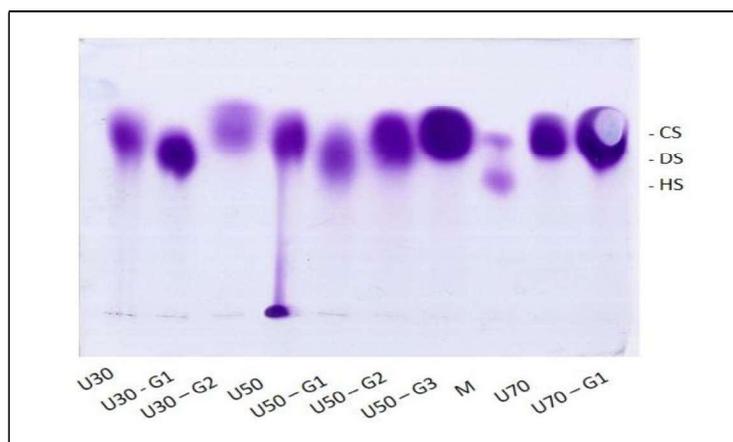


Figura 12. Eletroforese em gel de agarose em tampão PDA pH 9,0 após gel filtração. Foi aplicado no gel de agarose 50 µg da fração e grupos U30 e 30 µg das frações e grupos U50 e U70. Em seguida, foi realizada a corrida eletroforética a uma diferença de potencial de 100 V por aproximadamente 1 hora e 30 minutos, com o gel submerso em tampão PDA. G1 - grupo 1; G2 - grupo 2; G3 – grupo 3; M - mistura padrão de CS, DS e HS (5 µg de cada).

6.4 COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES DE *U. lactuca* L.

A composição monossacarídica das frações foi avaliada pela FACE, foi realizada uma eletroforese vertical dos hidrolisados das quatro frações e dos padrões monossacarídeos definidos de acordo com a literatura. Observou-se a presença de raminose, glicose, galactose, ácido glucurônico e um ácido urônico não identificado nas quatro frações, exceto pela galactose que não foi observada na fração U50 (Figura 13).

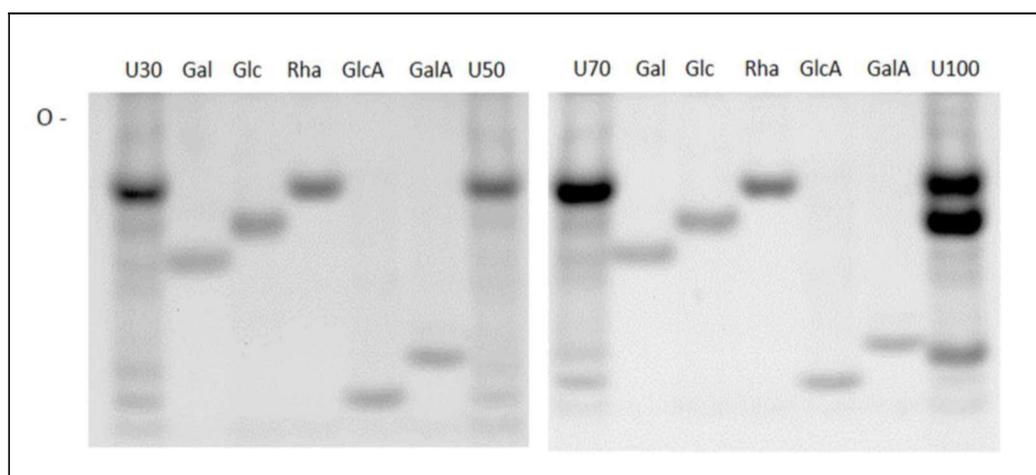


Figura 13. Eletrofluorograma no sistema Tris-Glicina-Borato da composição monossacarídeos das frações. Legenda: Gal - Galactose; Glc - Glicose; Rha - Raminose; GlcA - Ácido glucurônico; GalA - Ácido galacturônico; O – origem.

6.5 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

O espectro de RMN do ^{13}C das frações U50 e U70 estão apresentadas nas figuras 14 e 15. O espectro de RMN do ^{13}C da fração U50 apresenta sinais consistentes com raminose-3-sulfato ligada ao ácido glucurônico e sinais de ácido glucurônico, além disso o espectro de RMN ^{13}C da U70 apresenta além desses sinais outros consistentes com raminose-3-sulfato ligada ao ácido idurônico (YAICH et al., 2017; FREITAS, et al., 2015; TIAN, 2015; LAHAYE et al., 1999; LAHAYE, INIZAN, VIGOUROUX, 1998). O pico em δ 60,01 (CH_3 , C-6) no RMN ^{13}C do U70 foi atribuído ao carbono 6 da glicose (LAHAYE, ROBIC; 2007). De acordo com os espectro do RMN ^1H das frações U50 e U70, os sinais entre δ 4.58~5.51(1H, H-1) correspondem ao H ligado aos carbonos anomêricos, indicando que são compostos por raminose-3-sulfato, ácido glucurônico e ácido idurônico. O pico forte em δ 1,287 (3H, CH_3) foi devido ao $-\text{CH}_3$ da L-raminose, confirmando sua presença (FREITAS, et al., 2015; TIAN, 2015; LAHAYE, INIZAN, VIGOUROUX, 1998; KOPEL et al., 2016). Os sinais completos são apresentados na tabela 3.

No RMN HSQC, que apresenta os picos de correlação entre carbonos e hidrogênios, as frações U50 e U70 apresentaram espectros similares. Ambas apresentaram picos de correlação pertencentes a raminose-3-sulfato ligada ao ácido glucurônico, ao ácido glucurônico, a raminose-3-sulfato ligada ao ácido idurônico e ao ácido idurônico.

O RMN COSY apresenta a ligação entre prótons e pode confirmar o que foi observado nos demais RMNs. Para os espectros das frações foram identificados a ligação dos hidrogênios 5H/6H da raminose, 4H da raminose e 1H do ácido glicurônico, 1H/2H da raminose e 1H/2H do ácido glucurônico, 1H do ácido idurônico e 4H da raminose ligada ao ácido idurônico nos dois espectros (LAHAYE, INIZAN, VIGOUROUX, 1998; SASSAKI et al., 2008).

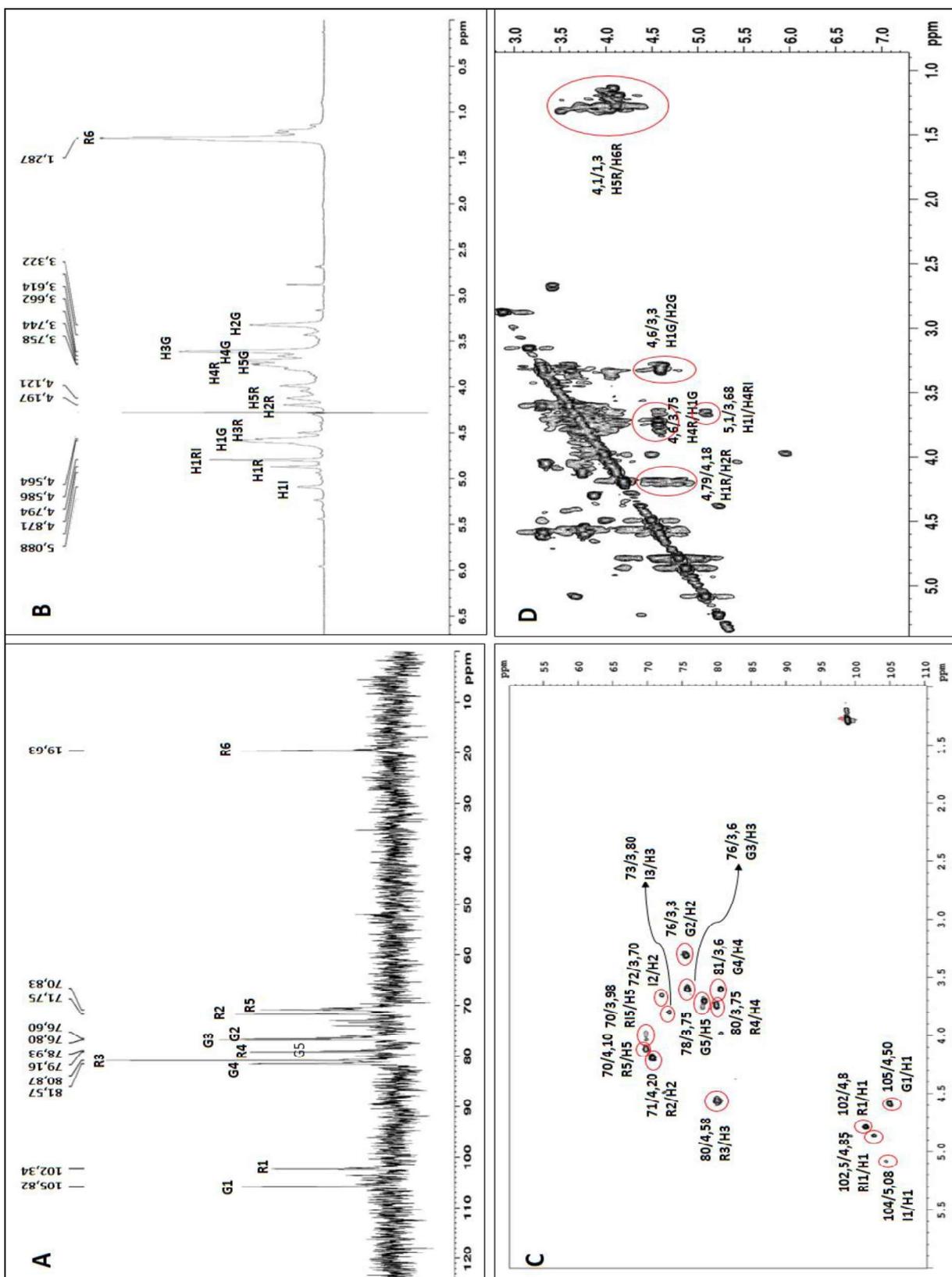


Figura 14. RMNs fração U50. A. RMN ^{13}C ; B. RMN ^1H ; C. RMN 2D HSQC; D. RMN 2D COSY. G – ácido glicurônico; I- ácido idurônico; RI – raminose ligada ao ácido idurônico; R – raminose ligada ao ácido glicurônico; GL - glicose; H- hidrogênio.

Tabela 3. Dados espectroscópicos de RMN (400 MHz, BBO) para as frações U50 e U70

Posição	U50		U70	
	δ_{Carbono}	$\delta_{\text{Hidrogênio (J in Hz)}}$	δ_{Carbono}	$\delta_{\text{Hidrogênio (J in Hz)}}$
Raminose-3-sulfato → Ácido Glicurônico				
1	102,34, C1	4,871	102,34, C1	4,871
2	71,75, C2	4,197	71,75, C2	4,195
3	80,87, C3	4,564	80,87, C3	4,560
4	79,16, C4	3,758	79,16, C4	3,758
5	70,83, C5	4,121	70,83, C5	4,118
6	19,64, C6	1,287	19,63, C6	1,286
Raminose-3-sulfato → Ácido Idurônico				
1	-	4,794	102,47, C1	4,791
2	-	-	-	-
3	-	-	79,95, C3	4,040
4	-	-	77,17, C4	3,708
5	-	-	70,56, C5	3,985
6	-	-	19,52, C6	1,300
Ácido Glicurônico				
1	105,82, C1	4,586	105,82, C1	4,586
2	76,60, C2	3,322	76,60, C2	3,321
3	76,80, C3	3,614	76,79, C3	3,615
4	81,57, C4	3,662	81,58, C4	3,659
5	78,93, C5	3,744	78,94, C5	3,743
6	-	-	-	-
Ácido Idurônico				
1	-	5,088	-	5,081
2	-	-	72,80	3,769
3	-	-	73,06	3,859
4	-	-	-	-
5	-	-	74,04	3,951
6	-	-	-	-

Legenda: (-) deslocamento químico não foi observado.

6.6 ENSAIOS BIOLÓGICOS EM MACRÓFAGOS DA LINHAGEM RAW 264.7

6.6.1 As frações de *U. lactuca* L. não interferem na capacidade dos macrófagos da linhagem RAW 264.7 em reduzir o MTT

Para avaliar a toxicidade das frações de *U. lactuca* L. sobre macrófagos RAW 264.7, utilizou-se o ensaio de MTT, no qual é avaliado a capacidade de conversão do sal de tetrazolium em formazan pelas enzimas mitocondriais das células viáveis. Conforme apresentado na Figura 16, as frações U30, U50, U70 e U100 analisadas nas concentrações 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ não alteraram significativamente a capacidade dos macrófagos em reduzir o MTT.

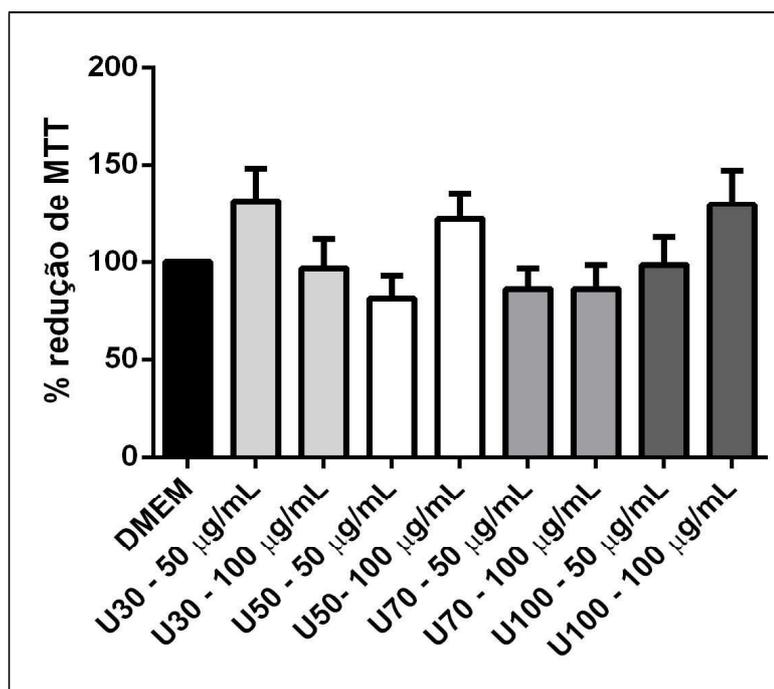


Figura 16. Avaliação da redução do MTT em macrófagos da linhagem RAW 264.7 após incubação com as frações U30, U50, U70 e U100. Células da linhagem RAW 264.7 foram plaqueadas e incubadas com as frações U30, U50, U70, U100 nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Após 44 horas, foram adicionados 20 μL de sal de tetrazolium MTT. Após 4 horas, a redução do MTT foi medida pela conversão do sal de tetrazolium em cristais de formazan.

6.6.2 Atividade das frações de *U. lactuca* L. sobre a produção de óxido nítrico por meio de estímulo com LPS em macrófagos da linhagem RAW 264.7

O efeito anti-inflamatório das frações de *U. lactuca* L. foi investigado por meio da avaliação indireta da produção de óxido nítrico pelo método de Griess em macrófagos tratados com as frações na ausência de estímulo (controle) e após estímulo com LPS 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Também foram avaliados o controle negativo onde as células foram incubadas apenas com meio DMEM e o controle positivo, no qual as células foram estimuladas com LPS sem incubação com as frações.

A amostra U100 na concentração 100 $\mu\text{g/mL}$ reduziu significativamente a produção de óxido nítrico no controle sem estímulo. Após estímulo com LPS, as amostras U50 na concentração 50 $\mu\text{g/mL}$, U70 na concentração 50 $\mu\text{g/mL}$ e U100 na concentração 100 $\mu\text{g/mL}$ reduziram significativamente a produção de óxido nítrico. A amostra U70 na concentração 50 $\mu\text{g/mL}$ foi a mais efetiva, reduziu em 52% a produção de óxido nítrico. Ainda, a fração U100 na concentração 50 $\mu\text{g/mL}$ aumentou a produção de óxido nítrico após estímulo com LPS (Figura 17).

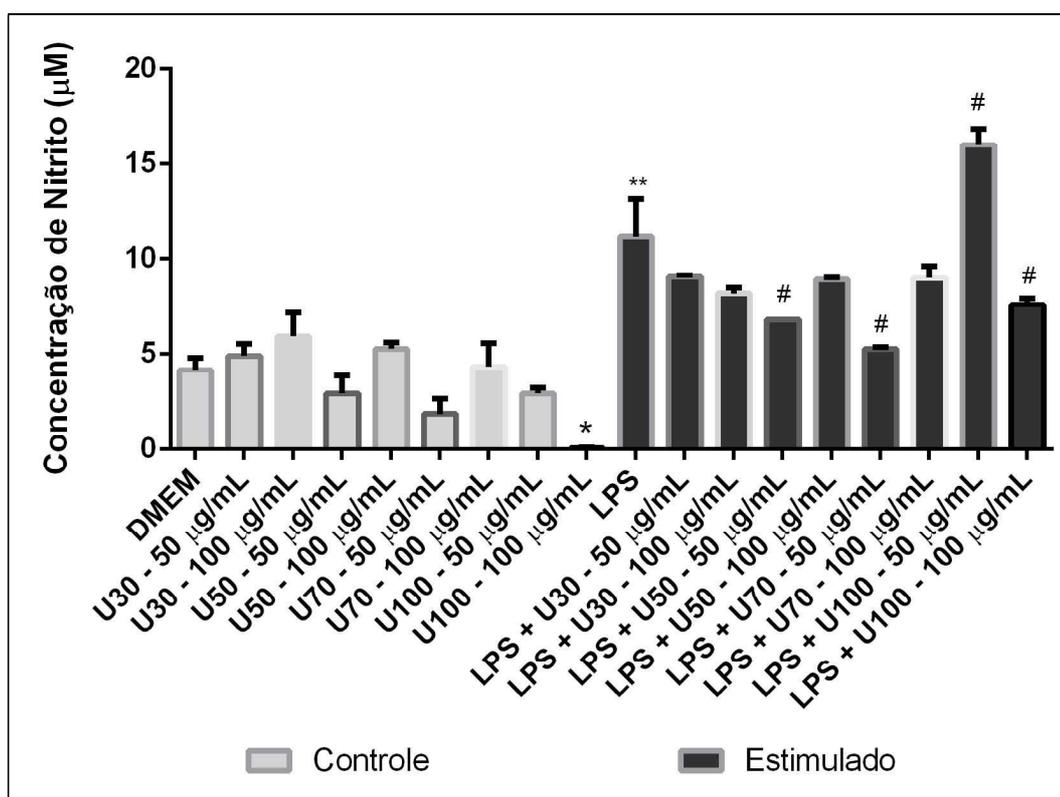


Figura 17. Dosagem de óxido nítrico com e sem estímulo com LPS em macrófagos da linhagem RAW 264.7 incubados com as frações U30, U50, U70 e U100. Células da linhagem RAW 264.7 foram plaqueadas e incubadas com as frações U30, U50, U70, U100 nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ com e sem estímulo com LPS. Após 48 horas, o sobrenadante foi recolhido e utilizado na dosagem indireta de NO, por meio da reação de Griess. Valores significativos: * $p < 0,05$ vs DMEM, ** $p < 0,05$ DMEM vs LPS e # $p < 0,05$ vs LPS.

Também foram avaliadas as frações U50 e U70 em quatro concentrações 12,5, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$. A fração U50 nas concentrações 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ aumentou significativamente a produção de NO no controle, assim como a fração U70 na concentração de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$. Também houve aumento na produção de NO após estímulo na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, pela fração U70. Por outro lado, a fração U50 nas concentrações 12,5 e 25 $\mu\text{g/mL}$ reduziu a produção de NO em 17% e 21% respectivamente, e a fração U70

nas concentrações 12,5 e 25 $\mu\text{g/mL}$, reduziu a produção de NO em 58% e 70%, respectivamente, após estímulo (Figura 18).

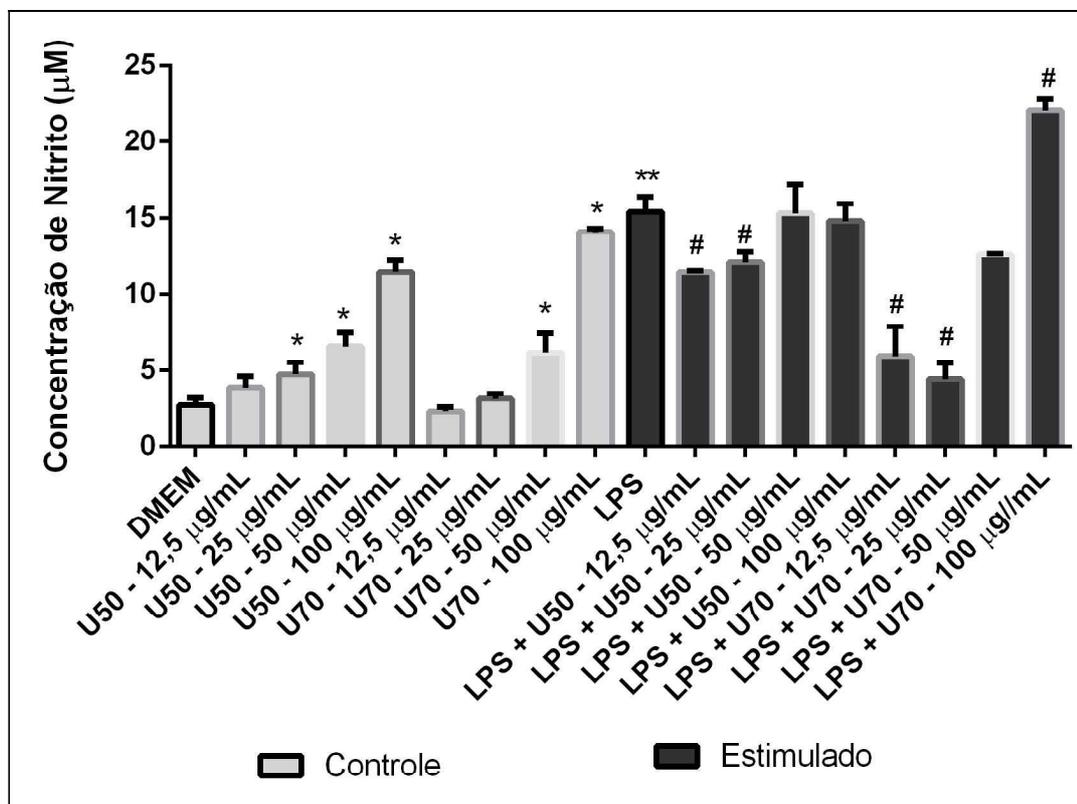


Figura 18. Dosagem de óxido nítrico com e sem estímulo com LPS em macrófagos da linhagem RAW 264.7 incubados com as frações U50 e U70. Células da linhagem RAW 264.7 foram plaqueadas e incubadas com as frações U50 e U70 nas concentrações de 12,5, 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ com e sem estímulo com LPS. Após 48 horas, o sobrenadante foi recolhido e utilizado na dosagem indireta de NO, por meio da reação de Griess. Valores significativos: * $p < 0,05$ vs DMEM, ** $p < 0,05$ DMEM vs LPS e # $p < 0,05$ vs LPS.

Buscou-se avaliar a produção de NO em um tempo de 24 horas de exposição com o intuito de verificar o efeito das frações em um menor tempo de exposição sobre a produção de óxido nítrico. O período de exposição de 24 horas foi suficiente para haver um estímulo significativo do LPS em comparação com o grupo apenas com DMEM, porém esse estímulo foi menor quando comparado com a exposição por 48 horas. Conforme apresentado na Figura 19, as amostras U50 e U70 na concentração 100 $\mu\text{g/mL}$, foram capazes de induzir significativamente a produção de óxido nítrico no controle e após estímulo, assim como apresentado na Figura 18. Entretanto, nas concentrações em que apresentaram atividade em reduzir a produção de óxido nítrico (12,5 e 50 $\mu\text{g/mL}$) em 48 horas não houve redução em 24 horas.

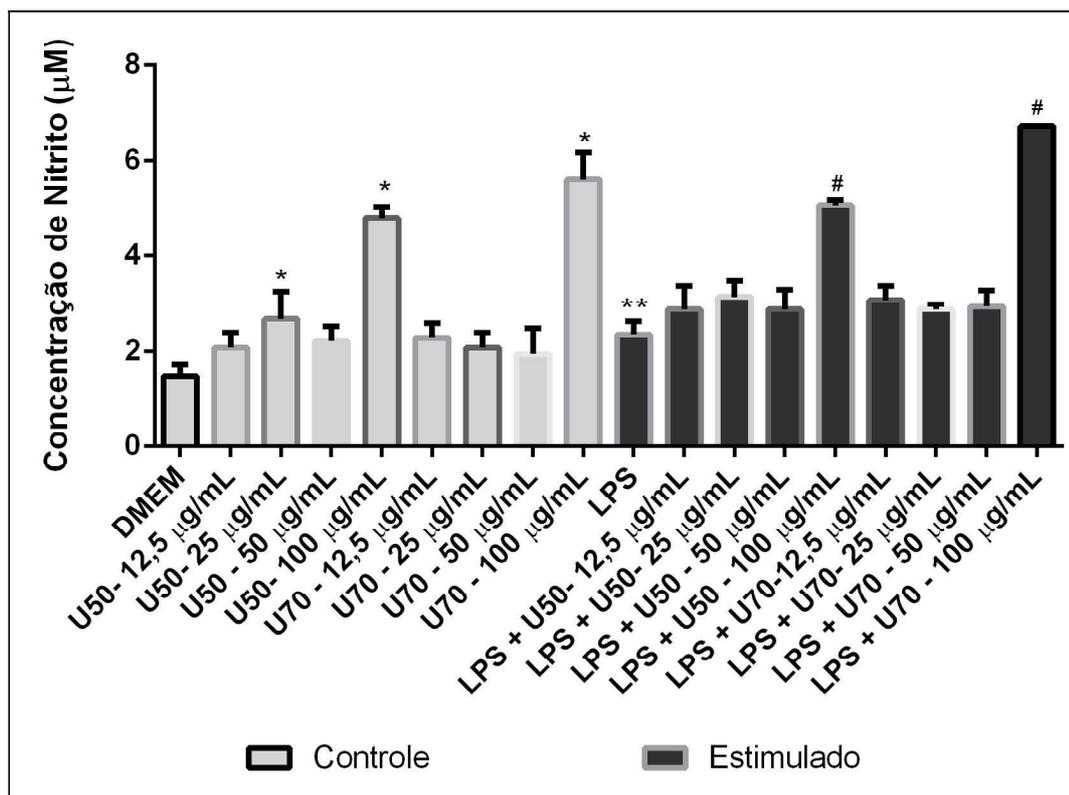


Figura 19. Dosagem de óxido nítrico com e sem estímulo com LPS em macrófagos da linhagem RAW 264.7 por um período de 24 horas incubados com as frações U50 e U70. Células da linhagem RAW 264.7 foram plaqueadas e incubadas com as frações U50 e U70 nas concentrações de 12,5, 25, 50, 100 µg/mL com e sem estímulo com LPS. Após 24 horas, o sobrenadante foi recolhido e utilizado na dosagem indireta de NO, por meio da reação de Griess. Valores significativos: * $p < 0,05$ vs DMEM, ** $p < 0,05$ DMEM vs LPS e # $p < 0,05$ vs LPS.

6.6.3 Avaliação da atividade da fração U70 sobre a produção de óxido nítrico em dois modelos de estímulo nos tempos de 30 minutos e 24 horas

Foram avaliados dois modelos de estímulo com LPS, o modelo 1 com aplicação da fração U70 antes do estímulo e o modelo 2 com aplicação posterior ao estímulo conforme descrito em materiais e métodos nos tempos de 30 minutos e 24 horas. No tempo de 30 minutos, observamos uma redução significativa da produção de óxido nítrico no modelo 2 nas concentrações 12,5, 25 e 50 µg/mL em 12, 20 e 25%, respectivamente, no qual após estímulo com LPS por 30 minutos incubamos com a fração U70 também por 30 minutos e mantivemos a incubação até 48 horas com DMEM + SFB 2%. Por outro lado, no modelo 1, no qual o tratamento ocorreu antes do estímulo não houve redução significativa da produção de óxido nítrico (Figura 20). Já havia sido observada redução da produção de óxido nítrico nas

concentrações 12,5 e 25 $\mu\text{g/mL}$ quando realizado estímulo e incubação com a fração simultaneamente.

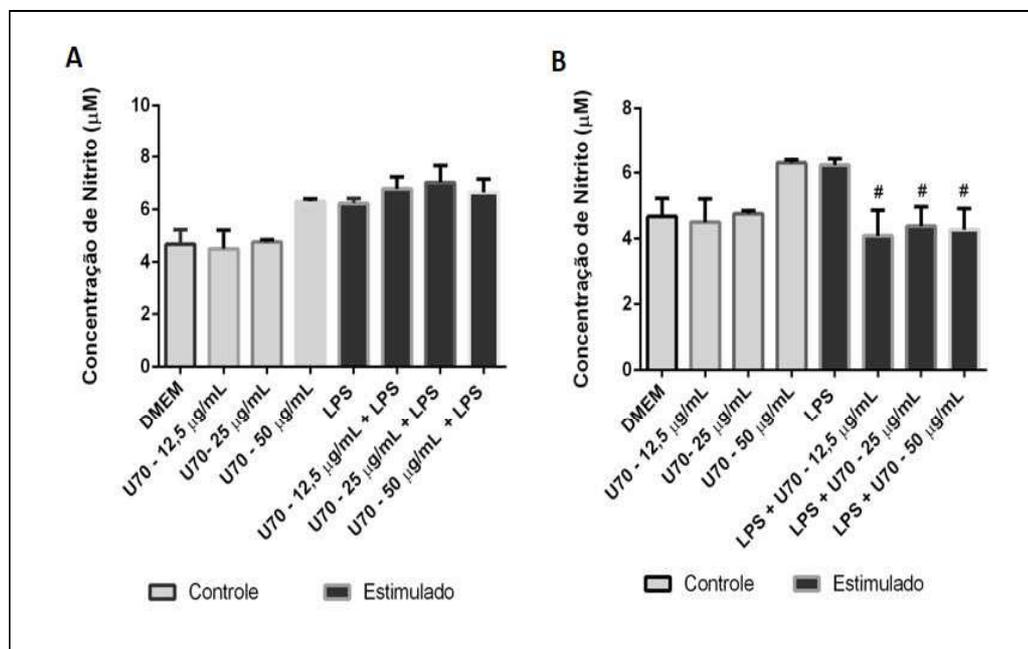


Figura 20. Dosagem indireta de óxido nítrico em dois modelos com indução por 30 minutos. A. Modelo 1. As células da linhagem RAW 264.7 foram plaqueadas e incubadas com a fração U70 nas concentrações de 12,5, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ por 30 minutos antes do estímulo com LPS. **B. Modelo 2.** As células da linhagem RAW 264.7 foram estimuladas com LPS por 30 minutos e em seguida incubadas com a fração U70 nas concentrações de 12,5, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ por 30 minutos. Após a exposição, nos dois modelos, as células foram incubadas com DMEM suplementado com SFB 2% por 48 horas. O sobrenadante foi recolhido e utilizado na dosagem indireta de NO, por meio da reação de Griess. Valores significativos: # $p < 0,05$ vs LPS.

Para o tempo de 24h, no modelo 1, visualizamos uma redução na produção de óxido nítrico na incubação com a fração U70 na concentração 50 $\mu\text{g/mL}$ em 65%, quando incubamos com a fração por 24 horas e em seguida estimulamos com LPS também por 24 horas. No modelo 2, visualizamos redução da produção de óxido nítrico com a fração U70 na concentração 12,5 $\mu\text{g/mL}$ de 42%, quando estimulamos com LPS por 24h e em seguida tratamos com a fração U70 por 24 horas (Figura 21).

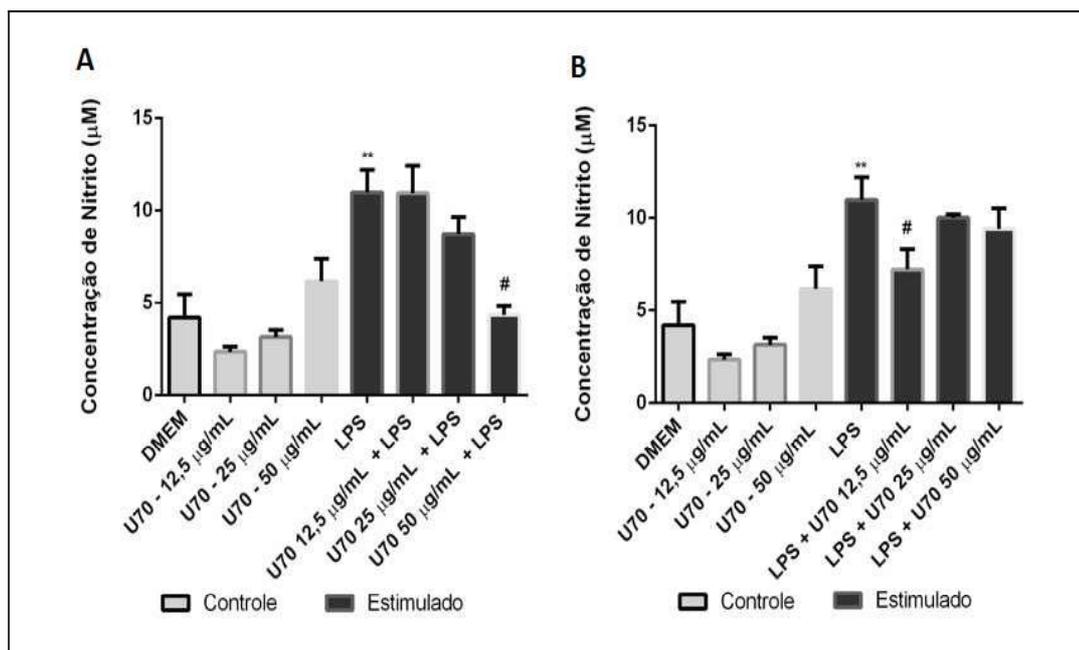


Figura 21. Dosagem indireta de óxido nítrico em dois modelos com indução por 24 horas. A. Modelo 1. As células da linhagem RAW 264.7 foram plaqueadas e incubadas com a fração U70 nas concentrações de 12,5, 25 e 50 µg/mL por 24 horas antes do estímulo com LPS. **B. Modelo 2.** As células da linhagem RAW 264.7 foram estimuladas com LPS por 24 horas e em seguida incubadas com a fração U70 nas concentrações de 12,5, 25 e 50 µg/mL por 24 horas. O sobrenadante foi recolhido e utilizado na dosagem indireta de NO, por meio da reação de Griess. Valores significativos: ** p<0,05 DMEM vs LPS e # p<0,05 vs LPS.

6.6.4 Ação das frações U50 e U70 de *U. lactuca* L. sobre a atividade das metaloproteinases 2 e 9

A análise por zimograma foi aplicada na avaliação da ação das frações U50 e U70 sobre a atividade das metaloproteinases 2 e 9. Na Figura 22A, está apresentada a imagem do gel de acrilamida/bisacrilamida tendo gelatina como substrato após ser corado com Coomassie Blue R250, no qual se avaliou a ação da fração U50 nas concentrações 12,5, 25, 50 e 100 µg/mL sobre a atividade das metaloproteinases. A atividade das metaloproteinases é indicada pela degradação da gelatina, visualizada como regiões brancas no gel. Também estão apresentados os gráficos da razão MMP-9/MMP-2 para as condições analisadas (Figura 22B e C).

No controle, a fração U50 foi indutora da atividade da MMP-9 nas concentrações 50 e 100 µg/mL (Figura 22B). No entanto, após estímulo com LPS a fração U50 reduziu significativamente a ação da MMP-9 nas concentrações 12,5 e 100 µg/mL em 40,24 e 33,07%, respectivamente (Figura 22C).

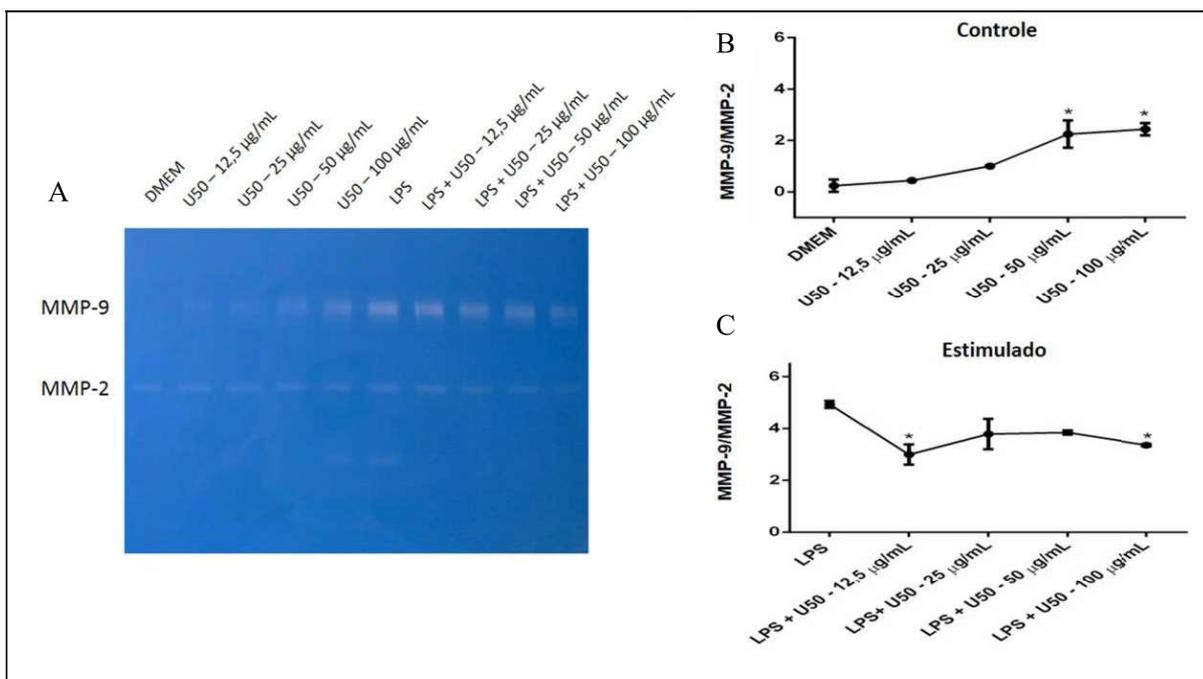


Figura 22. Avaliação do efeito da fração U50 sobre a atividade das metaloproteinasas 2 e 9. A fração U50 foi aplicada nas concentrações de 12,5, 25, 50 e 100 µg/mL e o estímulo foi realizada com LPS 0,1 µg/mL. Os sobrenadantes foram recolhidos após 48 horas. **A. Gel de acrilamida/bisacrilamida corado com Coomassie Blue.** Foi realizada uma eletroforese vertical em gel de acrilamida/bisacrilamida 7,5%, contendo gelatina 2,5% como substrato e em seguida o gel foi incubado e corado com Coomassie Blue R250. A atividade das gelatinases foi evidenciada pela presença de regiões claras nos géis. Para medir a intensidade dessas bandas foi utilizado o programa TotalLab TL120 1D v 2009 (Nonlinear Dynamics Ltda). **B. Gráfico da razão MMP-9/MMP-2 para o controle.** **C. Gráfico da razão MMP-9/MMP-2 para o estimulado.** Valores significativos: * $p < 0,05$ vs DMEM ou LPS.

Na Figura 23, estão apresentados os resultados do zimograma para a ação da fração U70 nas concentrações 12,5, 25, 50 e 100 µg/mL. Na Figura 23A, está apresentada a imagem do gel de acrilamida/bisacrilamida tendo gelatina como substrato após ser corado com Coomassie Blue. No controle, a fração U70 não induziu significativamente a atividade da MMP-9 (Figura 23B), ao passo que, após estímulo com LPS a fração U70 foi capaz de reduzir em 69% a atividade da MMP-9 na concentração 25 µg/mL (Figura 23C).

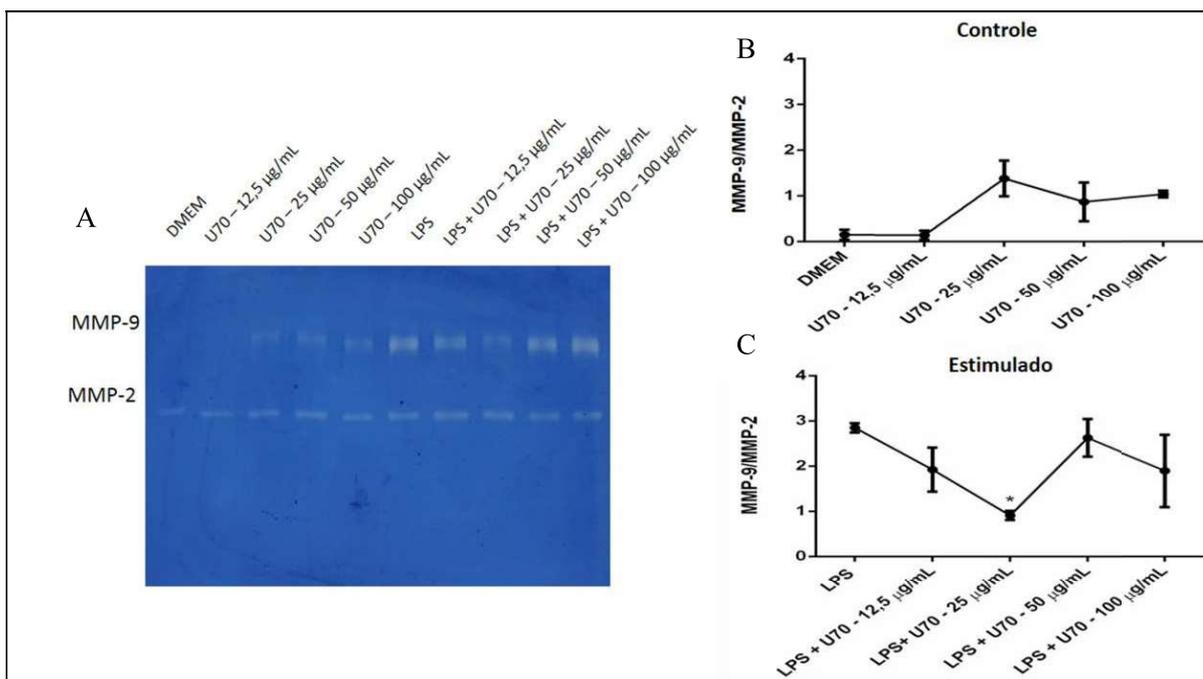


Figura 23. Avaliação do efeito da fração U70 sobre a atividade das metaloproteinasas 2 e 9. A fração U70 foi aplicada nas concentrações de 12,5, 25, 50 e 100 µg/mL e o estímulo foi realizada com LPS 0,1 µg/mL. Os sobrenadantes foram recolhidos após 48 horas. **A. Gel de acrilamida/bisacrilamida corado com Coomassie Blue.** Foi realizada uma eletroforese vertical em gel de acrilamida/bisacrilamida 7,5%, contendo gelatina 2,5% como substrato e em seguida o gel foi incubado e corado com Coomassie Blue R250. A atividade das gelatinases foi evidenciada pela presença de regiões claras nos géis. Para medir a intensidade dessas bandas foi utilizado o programa TotalLab TL120 1D v 2009 (Nonlinear Dynamics Ltda). **B. Gráfico da razão MMP-9/MMP-2 para o controle.** **C. Gráfico da razão MMP-9/MMP-2 para o estimulado.** Valores significativos: * $p < 0,05$ vs LPS.

6.6.5 Avaliação da expressão das metaloproteinasas 2 e 9 por western blot

Também foi avaliada a ação da fração U70 nas concentrações 12,5, 25 e 50 µg/mL, sobre a expressão das MMP-9 e MMP-2 por western blot. Na concentração 25 µg/mL já foi observado por zimograma a atividade significativa da fração U70 em reduzir a MMP-9. O western blot foi realizado com o sobrenadante de células RAW264.7 que foram incubadas em condições controle e após estímulo com LPS 0,1 µg/mL (Figura 24).

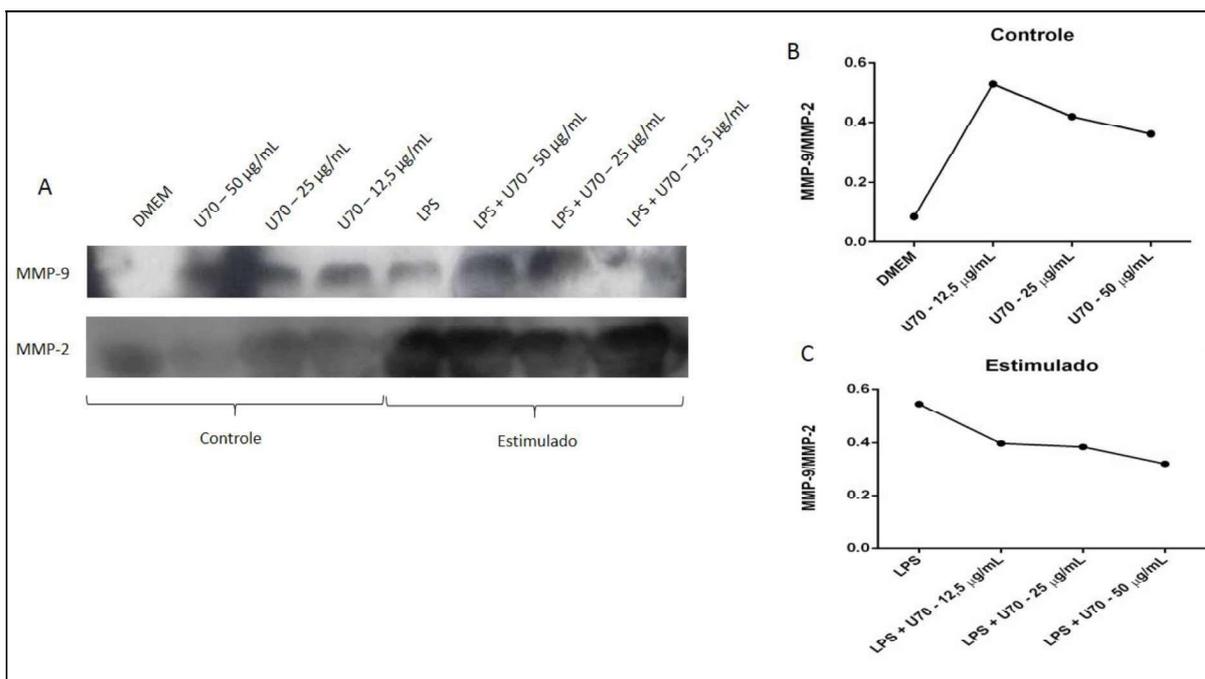


Figura 24. Avaliação do efeito da fração U70 sobre a expressão das metaloproteínas 2 e 9 por western blot. A fração U70 foi avaliada nas concentrações de 12,5, 25 e 50 µg/mL. Uma alíquota de 35 µL do sobrenadante de cada uma das condições testadas foi aplicada em gel de acrilamida/bisacrilamida 10% e submetida a uma eletroforese vertical. O gel foi transferido para membrana, que após bloqueio com Molico 5%, foi incubada com anticorpo primário anti-MMP-9 ab 38898 1:1000 overnight e em seguida com anticorpo secundário por 1 hora, assim como com anti-MMP-2 sc 13594 1:200 overnight e anticorpo secundário por 1 hora. **A. Imagem escaneada das bandas proteicas.** A membrana foi revelada com os reveladores pico e dura em tempos de exposição apropriado. As bandas proteicas foram escaneadas e densitometradas no programa TotalLab TL120 1D v 2009 e o resultado expresso em forma de gráfico de linha como proporção de atividade MMP-9/MMP-2 (Nonlinear Dynamics Ltda). **B. Gráfico da razão MMP-9/MMP-2 para o controle.** **C. Gráfico da razão MMP-9/MMP-2 para o estimulado.**

A fração U70 nas concentrações 12,5, 25 e 50 µg/mL induziu a expressão de MMP-9 no controle, por outro lado, após o estímulo com LPS a fração U70 reduziu a expressão de MMP-9 nas concentrações testadas quando comparado com a condição apenas estimulada (LPS).

6.6.6 Redução da produção de citocinas inflamatórias em macrófagos da linhagem RAW 264.7 pelas frações U50 e U70 *U. lactuca* L. após estímulo com LPS

Buscou-se avaliar o efeito das frações U50 e U70 sobre a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF-α. A dosagem das citocinas foi realizada nos sobrenadantes da cultura celular pelo método de ELISA do tipo sanduíche. No controle, as frações mostraram induzir a produção das citocinas IL-6 e TNF-α, principalmente na concentração de 50 µg/mL

(Figura 25A e B). Após o estímulo com LPS, as frações foram capazes de reduzir significativamente a produção das citocinas. Ambas na concentração 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ reduziram a produção de IL-6 em 26% (Figura 25A). As frações U50 e U70 reduziram em 18% e 26%, respectivamente, a produção de TNF- α quando comparado com a condição apenas estimulada (LPS) (Figura 25B).

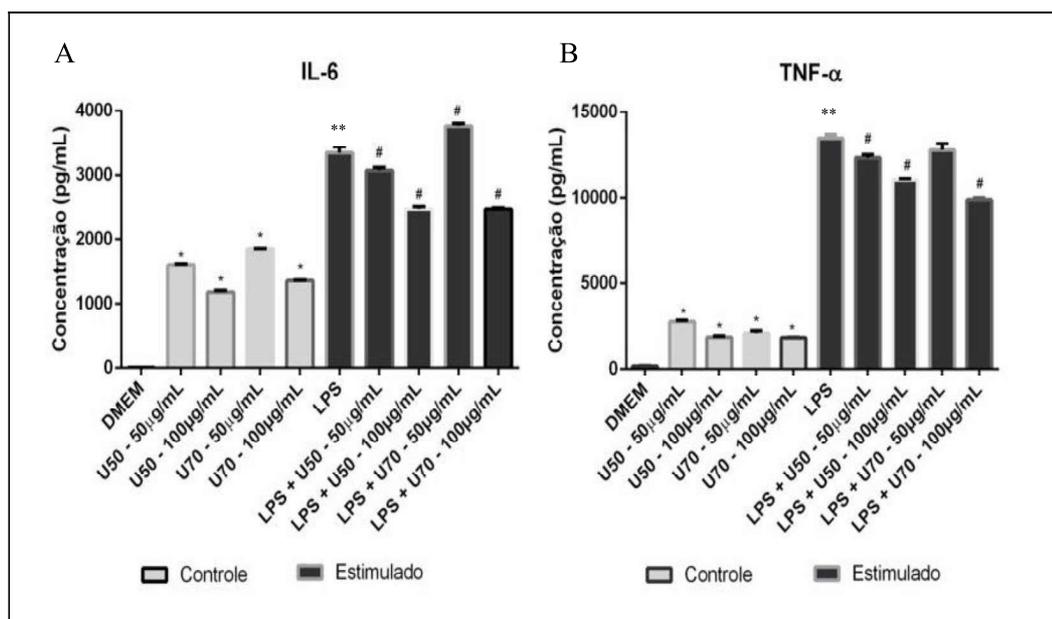
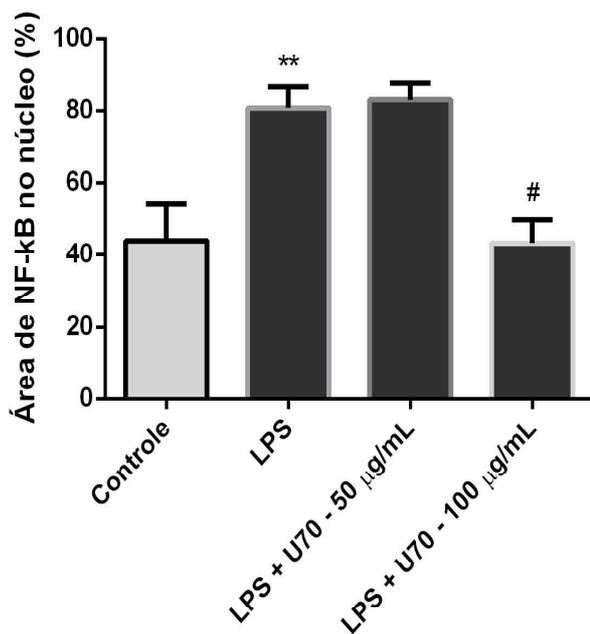


Figura 25. Dosagem de citocinas em sobrenadante por ELISA. A. IL-6. B. TNF- α . Células da linhagem RAW 264.7 foram plaqueadas e incubadas com as frações U50 e U70 nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ com e sem estímulo com LPS. Após 48 horas, o sobrenadante foi recolhido e utilizado na dosagem de IL-6 e TNF- α , pelo método de ELISA do tipo sanduíche. Valores significativos: * $p < 0,05$ vs DMEM, ** $p < 0,05$ DMEM vs LPS e # $p < 0,05$ vs LPS.

6.6.7 Efeito da fração U70 sobre a translocação do NF- κB após estímulo com LPS

Avaliou-se o efeito da fração U70 nas concentrações 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sobre a translocação do NF- κB do citoplasma para o núcleo após estímulo com LPS por 30 minutos. A translocação após estímulo com LPS foi significativamente maior quando comparada ao grupo apenas incubado com meio DMEM (Figura A). Na figura 26B, observa-se nas imagens que no controle incubado com a fração U70 nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a translocação do NF- κB não foi significativa. Por outro lado, para a concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, a fração U70 reduziu significativamente a translocação após o estímulo, porém na concentração 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a migração foi similar a observada para o LPS (Figura 26A e C).

A



B

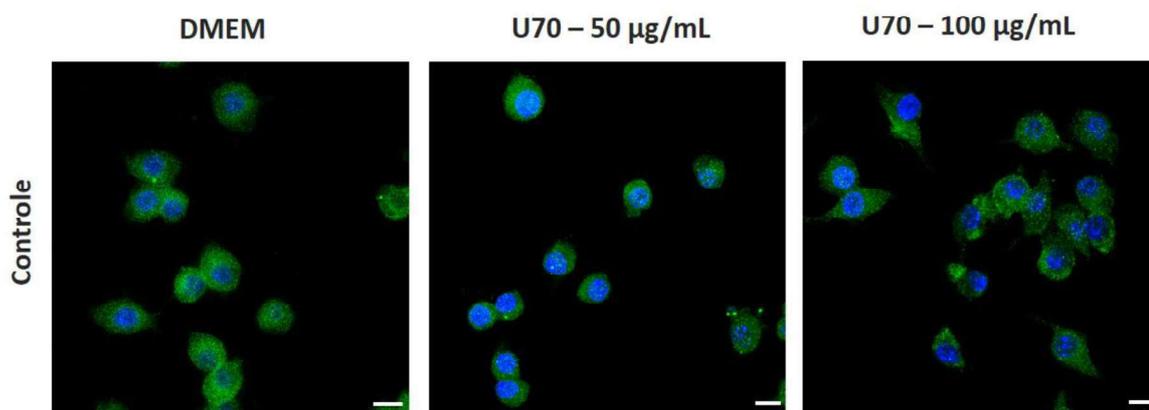
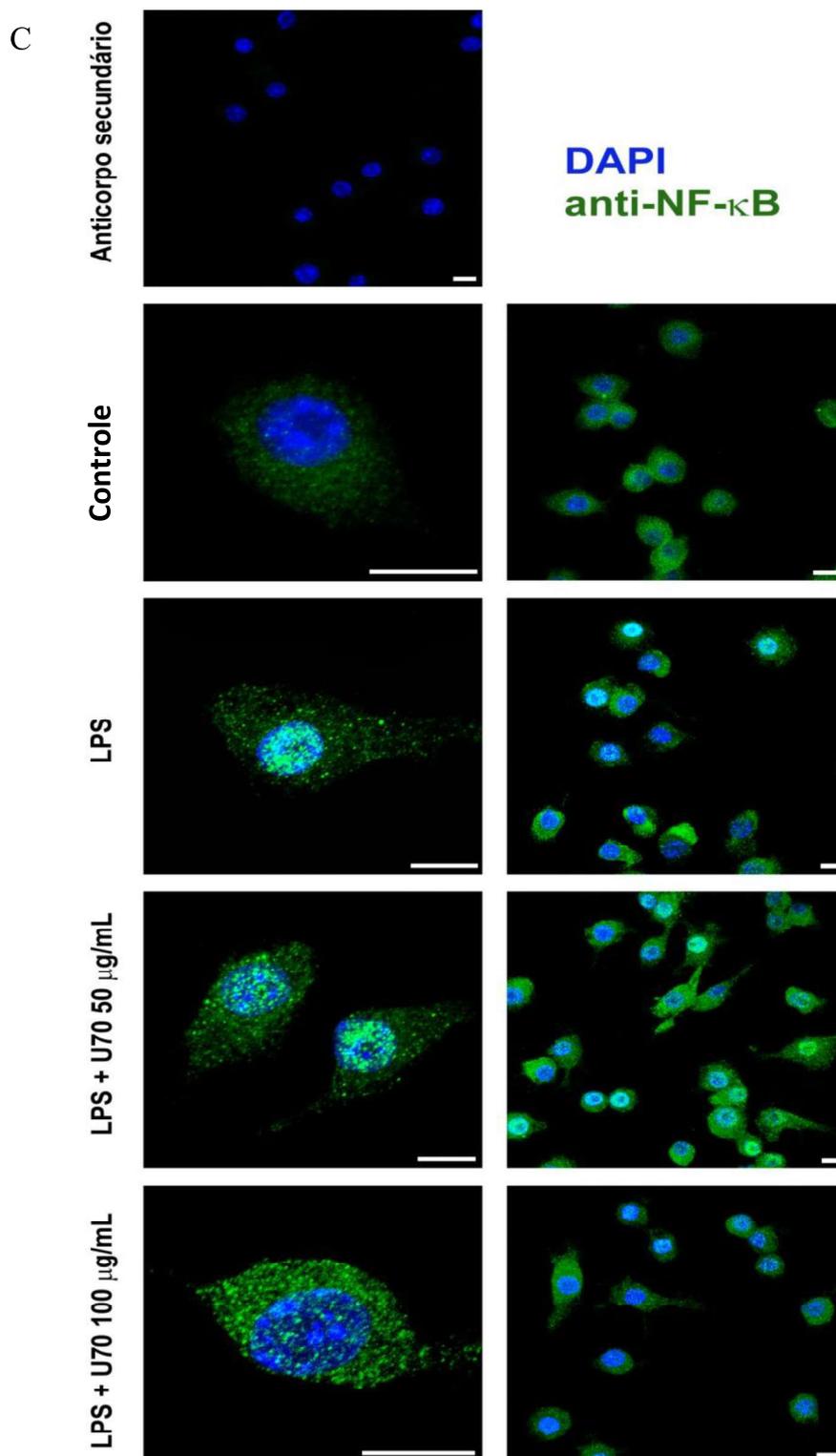


Figura 26. Translocação do NF- κ B após estímulo com LPS e incubação com a fração U70. A. Quantificação da porcentagem da área do núcleo celular na qual o NF- κ B estava presente B. Translocação nos controles incubados apenas com o meio DMEM ou com a fração U70 nas concentrações 50 e 100 μ g/mL. C. Translocação após estímulo com LPS e incubação com a fração U70 nas concentrações 50 e 100 μ g/mL. Os macrófagos RAW 264.7 plaqueados sobre lamínulas foram incubados com a fração U70 nas concentrações 50 e 100 μ g/mL e estimulados com LPS 0,1 μ g/mL. Em seguida, foram incubados com anticorpo primário anti-p65 NF- κ B 1:800 (SC8008 – Santa Cruz) por overnight em 4°C. Após lavagem com solução de bloqueio, incubadas com anticorpo secundário Alexa Fluor 488-conjugated 1:250 por 1 hora. O núcleo foi corado com DAPI 1:5000. As lamínulas foram montadas em lâminas usando Prolong Gold. As lamínulas foram fotografadas em microscópio microscópio Axio Observer.A1. A quantificação da área foi realizada no programa ImageJ. Valores significativos: ** $p < 0,05$ DMEM vs LPS e # $p < 0,05$ vs LPS.



6.6.8 Avaliação da peroxidação lipídica em macrófagos da linhagem RAW 264.7 pelo método do TBARS

A atividade da fração U70 sobre a peroxidação lipídica foi avaliada pelo método do TBARS, no qual é dosado a produção do malondialdeído, um dos produtos formados durante

a peroxidação lipídica. Para tal, adequou-se a metodologia de Draper e Hadley (1990) realizada em tecido para células. Inicialmente o experimento foi testado com 8×10^4 macrófagos, não obtendo resultado significativo. Em seguida, trabalhamos com 1×10^6 macrófagos e três momentos de indução 30 minutos, 2 horas e 6 horas, inicialmente testamos apenas os controles DMEM e estimulado com LPS $0,1 \mu\text{g/mL}$. Na figura 27 podemos visualizar a quantificação de malondialdeído em cada um dos tempos. No tempo de 30 minutos foi observada diferença significativa entre os controles, sendo o tempo mais adequado para a realização do ensaio.

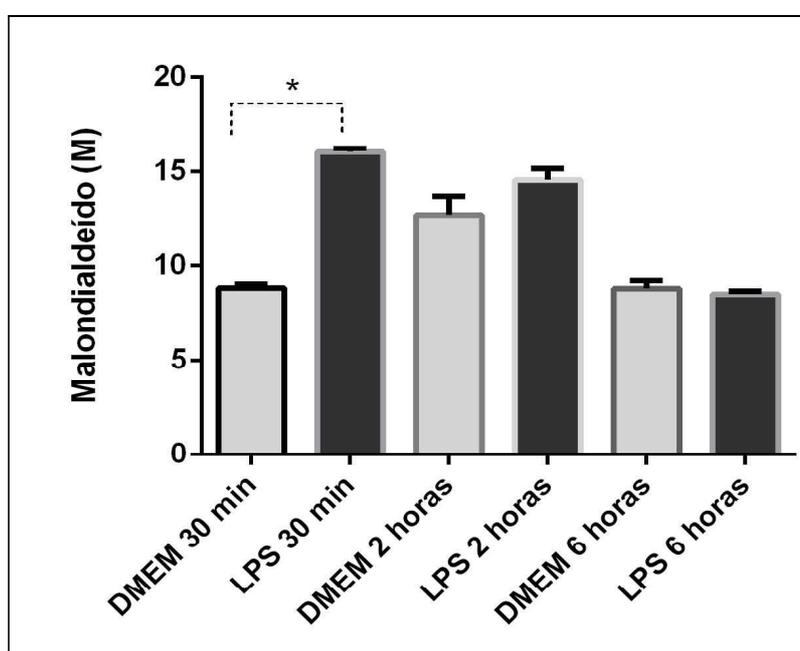


Figura 27. Avaliação da peroxidação lipídica pelo método do TBARS para os controles DMEM e estimulado com LPS nos tempos de 30 minutos, 2 horas e 6 horas de incubação. Valores significativos: * $p < 0,05$ DMEM vs LPS.

A fração U70 foi testada nas concentrações de 12,5, 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$ no controle e com estímulo com LPS $0,1 \mu\text{g/mL}$. A fração aumentou a produção de malondialdeído no controle na concentração 200 $\mu\text{g/mL}$, porém reduziu a produção de malondialdeído após o estímulo com LPS em todas as concentrações testadas entre 33,35 e 55,93%. Ainda nas concentrações 12,5, 25 e 200 $\mu\text{g/mL}$ a redução foi significativamente menor, entre 31,68 e 40,97%, que a observada para o controle apenas incubado com DMEM (Figura 28).

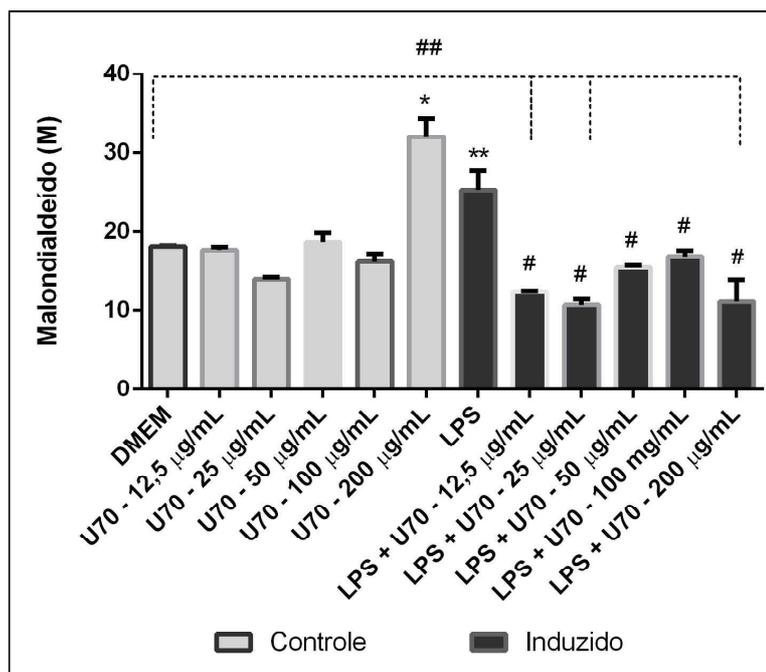


Figura 28. Avaliação da peroxidação lipídica pelo método do TBARS com e sem estímulo com LPS em macrófagos da linhagem RAW 264.7 incubados com a fração U70. Células RAW 264.7 (1×10^6) foram plaqueadas em placas p35 e incubadas com a fração U70 nas concentrações de 12,5, 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$. As células ficaram em contato com as amostras por um período de 30 minutos. Em seguida o meio foi retirado e as células recolhidas com 100 μL de tampão de lise (Tris.HCl 50 mM, Tween 20 1%, NaCl 150 mM, EGTA 1mM, inibidor de protease). Aliquotas das amostras correspondentes a 100 μg de proteínas e 50 μL de TBA a 0,67% foram adicionadas a tubos, colocados em banho seco à 96°C por 45 minutos. A absorbância das soluções foi medida em leitor de microplacas em 535 nm. Valores significativos: * $p < 0,05$ vs DMEM, ** $p < 0,05$ DMEM vs LPS, # $p < 0,05$ vs LPS, ## significativo.

6.6.9 Atividade da fração U70 *U. lactuca* L. em reduzir o número de corpúsculos lipídicos em macrófagos da linhagem RAW 264.7 após estímulo com LPS

Para investigar a atividade da fração U70 sobre a biogênese de corpúsculos lipídicos em macrófagos da linhagem RAW 264.7, as células foram plaqueadas sobre lamínula e o número de corpúsculos lipídicos nas células observado após coloração com Oil Red (ORO), um corante de lipídios neutros.

A análise quantitativa do número de corpúsculos lipídicos/célula após 48h de estímulo com LPS está apresentada na Figura 29A, sendo possível observar um aumento significativo no número de corpúsculos lipídicos/célula nas células incubadas com a fração U70 nas concentrações 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ no controle quando comparadas com o controle DMEM. Por sua vez, as células estimuladas com LPS e incubadas com a fração U70 nas concentrações 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram redução significativa do número de corpúsculos lipídicos/célula

quando comparadas com as células estimuladas com LPS e sem tratamento. Não houve diferença significativa entre a redução promovida pela fração U70 nas concentrações 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$.

A Figura 29B mostra as imagens obtidas por microscopia de fluorescência dos grupos analisados. É possível observar uma redução significativa do número de corpúsculo lipídicos no grupo estimulado com LPS e incubado com U70 nas concentrações 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ quando comparado ao grupo estimulado com LPS.

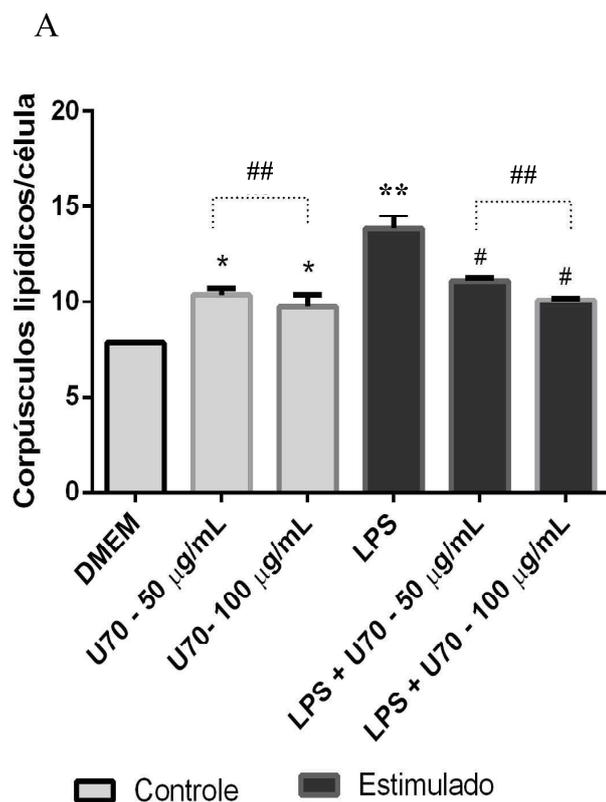
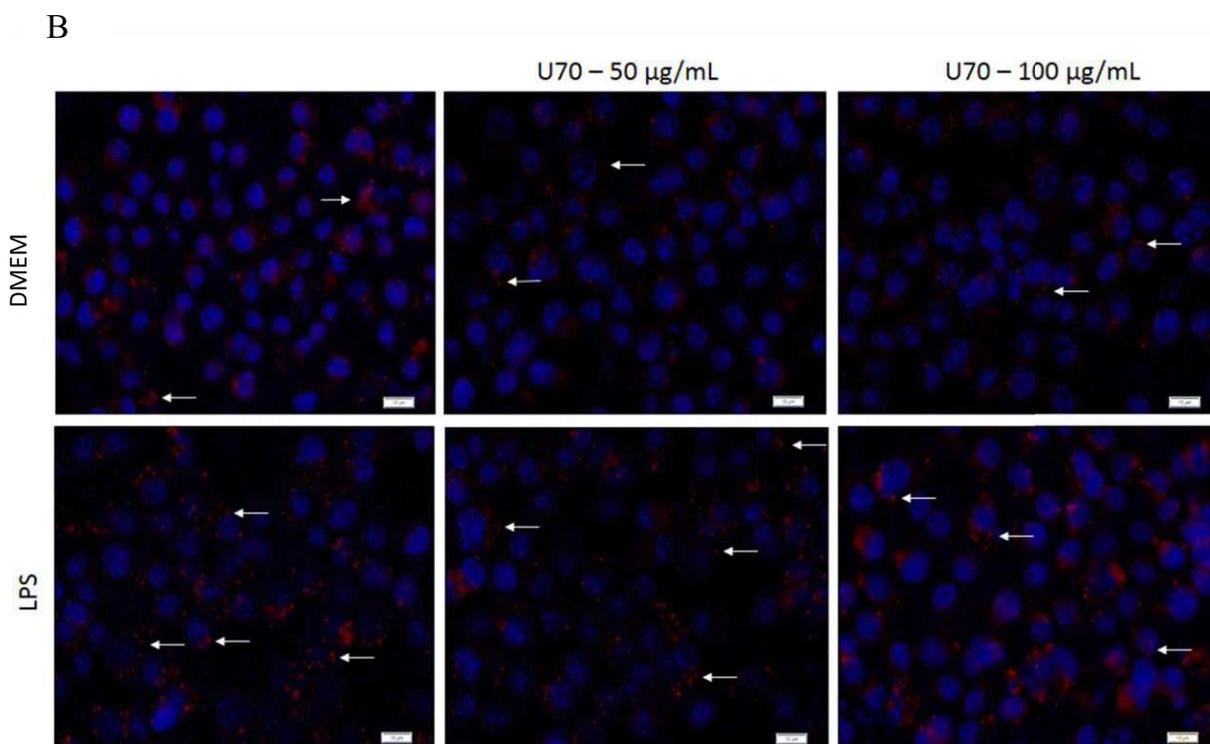


Figura 29. Biogênese de corpúsculos lipídicos em macrófagos da linhagem RAW 264.7 no controle e após estímulo. A. Análise quantitativa do número de corpúsculos lipídicos. As células foram plaqueadas sobre lamínulas, após adesão, incubadas com a fração U70 nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ com e sem estímulo com LPS. Após período de 48h, as lamínulas foram coradas pela coloração Oil Red e o número de corpúsculos quantificado em microscópio, contando-se um total de 50 células por lamínula. Valores significativos: * $p < 0,05$ vs DMEM, ** $p < 0,05$ DMEM vs LPS # $p < 0,05$ vs LPS, ## - não significativo. **B. Imagens da sobreposição dos corpúsculos lipídicos capturados nos filtros para DAPI e Oil Red.** As imagens foram obtidas em microscópio de fluorescência Olympus BX53 e sobrepostas no programa ImageJ.



6.7 ENSAIOS BIOLÓGICOS EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS C57BL/6

6.7.1 Atividade da fração U70 de *U. lactuca L.* sobre a produção de óxido nítrico com estímulo com LPS em macrófagos peritoneais em dois tempos de exposição

Da mesma forma que se avaliou a produção de óxido nítrico em uma linhagem estabelecida, buscou-se avaliar a produção de óxido nítrico em uma linhagem de macrófagos primários. Portanto, foi avaliada pelo método de Griess a produção de indireta de óxido nítrico em macrófagos peritoneais de C57BL/6 no controle sem estímulo e após estímulo com LPS por um período de 24 e 48 horas.

Para o tempo de 24 horas, a fração U70 na concentração 50 $\mu\text{g/mL}$ aumentou significativamente a produção de óxido nítrico no controle. Após estímulo com LPS, a fração U70 na concentração 50 $\mu\text{g/mL}$ reduziu significativamente a produção de óxido nítrico, uma redução de cerca de 27% (Figura 30A).

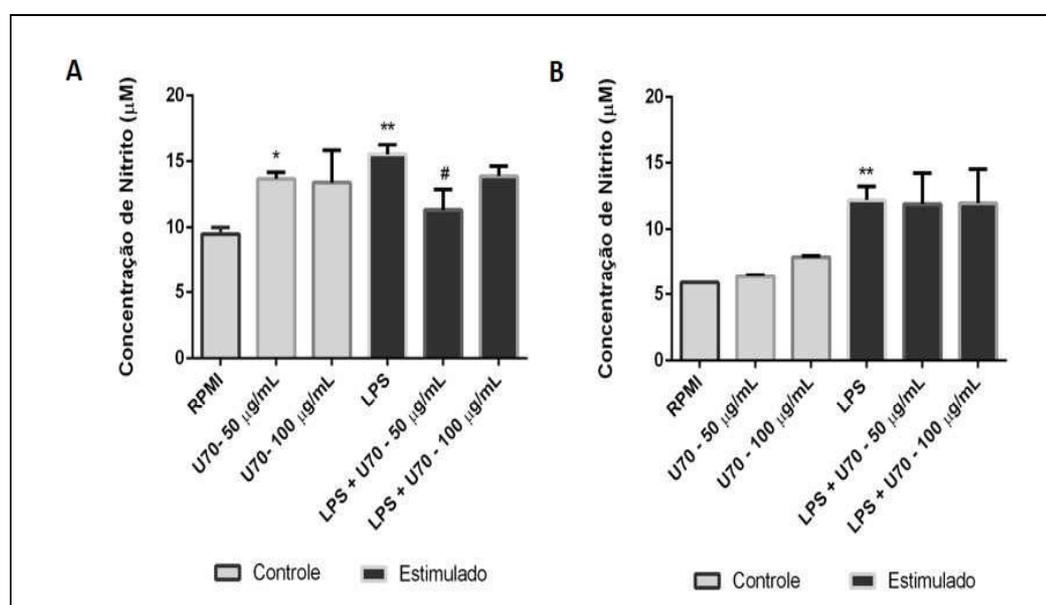


Figura 30. Dosagem de óxido nítrico com e sem estímulo com LPS em macrófagos peritoneais de C57BL/6 após estímulo por 24 e 48 horas. A. Estímulo por 24 horas. B. Estímulo por 48 horas. As células foram plaqueadas sobre lamínulas redondas e, após adesão, incubadas com a fração U70 nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ com e sem estímulo com LPS. Após período de 24 h, o sobrenadante foi recolhido e utilizado na dosagem de NO, por meio da reação de Griess. Valores significativos: * $p < 0,05$ vs DMEM, ** $p < 0,05$ DMEM vs LPS e # $p < 0,05$ vs LPS.

Por sua vez, após estímulo por um período de 48 horas, a fração U70 nas concentrações 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ não reduziram significativamente a produção de NO (Figura 30B).

6.7.2 Ação da fração U70 de *U. lactuca* L. sobre a atividade das metaloproteinasas 2 e 9 em macrófagos peritoneais

Foi avaliada a ação da fração U70 sobre a atividade das MMP-2 e 9 em macrófagos primários nos tempos de 24 e 48 horas. Para o tempo de 24 horas, está apresentada na Figura 31A, a imagem do gel de acrilamida/bisacrilamida tendo gelatina como substrato após ser corado com Coomassie Blue R250. Foi observada aumento da atividade da MMP-9 nos controles incubados com a fração U70 nas concentrações 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 31B). Não foi observada redução da atividade da MMP-9 nas células estimuladas com LPS e incubadas com a fração U70 nas concentrações 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 31C).

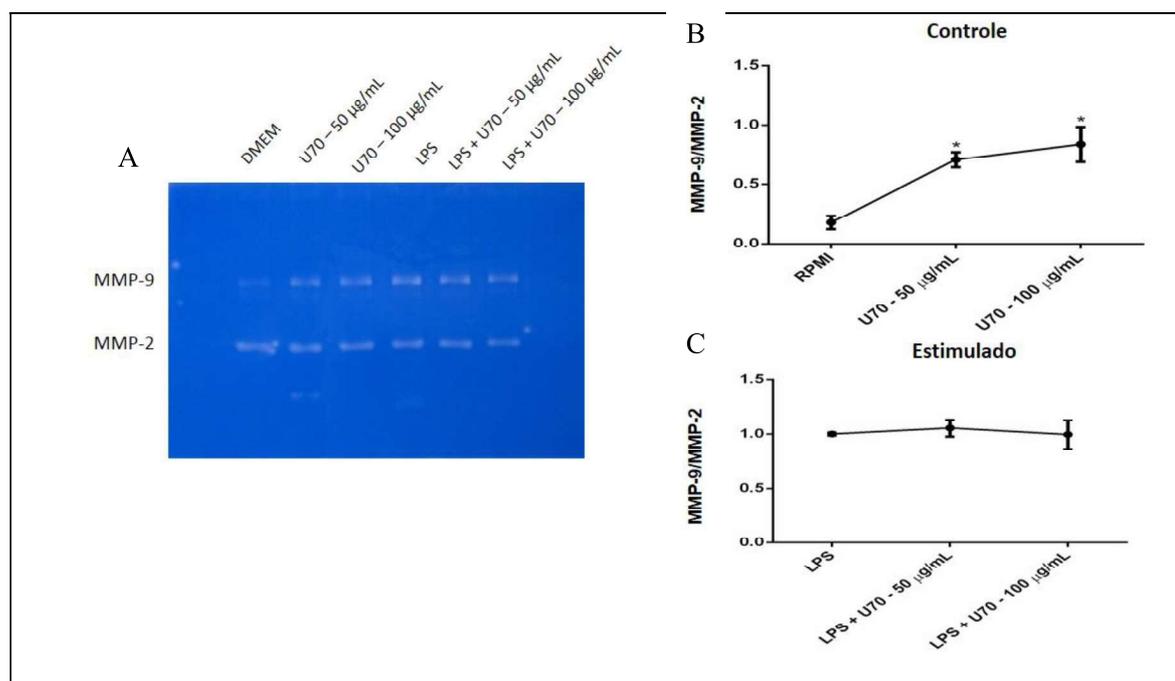


Figura 31. Avaliação do efeito da fração U70 sobre a atividade das metaloproteinasas 2 e 9 em macrófagos primários após 24 horas. A fração U70 foi aplicada nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e a estimulação foi realizada com LPS 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Os sobrenadantes foram recolhidos após 24 horas. **A. Gel de acrilamida/bisacrilamida corado com Coomassie Blue.** Foi realizada uma eletroforese vertical em gel de acrilamida/bisacrilamida 7,5%, contendo gelatina 2,5% como substrato e em seguida o gel foi incubado e corado com Coomassie Blue R250. A atividade das gelatinases foi evidenciada pela presença de regiões claras nos géis. Para medir a intensidade dessas bandas foi utilizado o programa TotalLab TL120 1D v 2009 (Nonlinear Dynamics Ltda). **B. Gráfico da razão MMP-9/MMP-2 para o**

controle. C. Gráfico da razão MMP-9/MMP-2 para o estimulado. Valores significativos: * $p < 0,05$ vs DMEM.

Para o tempo de 48 horas, está apresentada na Figura 32A a imagem do gel de acrilamida/bisacrilamida corado com Coomassie Blue R250. No controle, não foi observado aumento da atividade da MMP-9 com a incubação com a fração U70 nas concentrações 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 33B). Após o estímulo, não foi observada redução significativa da atividade da MMP-9, assim como observado em 24h. Além disso, foi observada menor atividade da MMP-9 após estímulo por 48h em todas as condições testadas (Figura 33B).

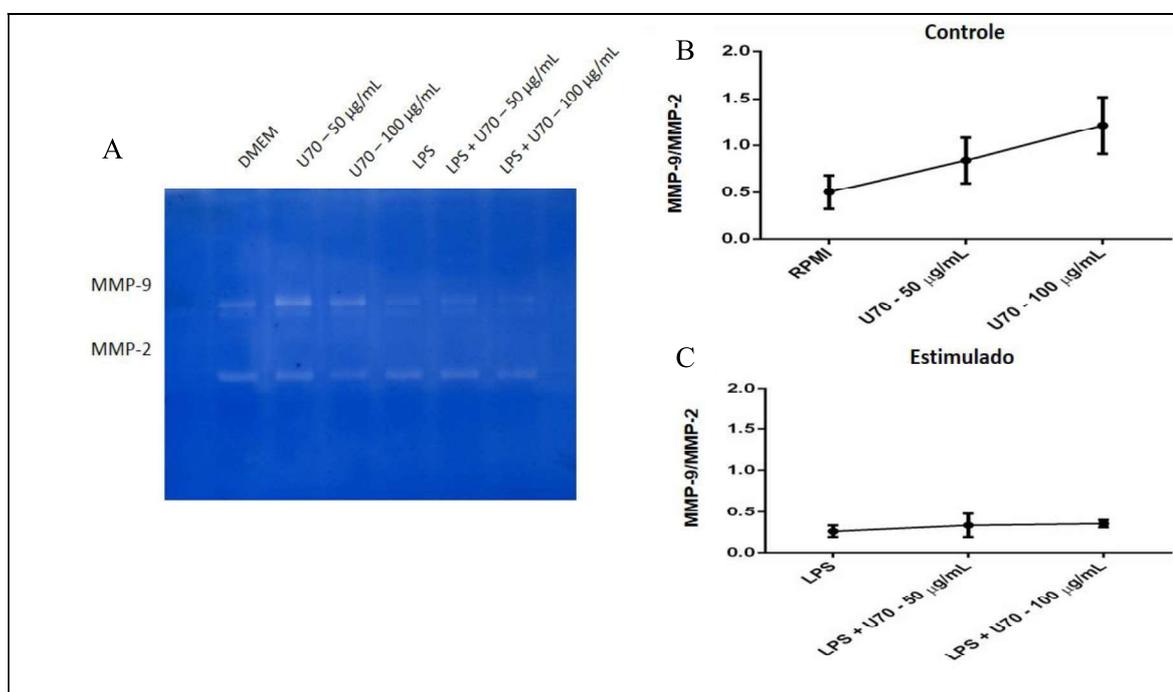


Figura 32. Avaliação do efeito da fração U70 sobre a atividade das metaloproteinases 2 e 9 em macrófagos primários após 48 horas. A fração U70 foi aplicada nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ e a estimulação foi realizada com LPS 0,1 $\mu\text{g/mL}$. Os sobrenadantes foram recolhidos após 48 horas. **A. Gel de acrilamida/bisacrilamida corado com Coomassie Blue.** Foi realizada uma eletroforese vertical em gel de acrilamida/bisacrilamida 7,5%, contendo gelatina 2,5% como substrato e em seguida o gel foi incubado e corado com Coomassie Blue R250. A atividade das gelatinases foi evidenciada pela presença de regiões claras nos géis. Para medir a intensidade dessas bandas foi utilizado o programa TotalLab TL120 1D v 2009 (Nonlinear Dynamics Ltda). **B. Gráfico da razão MMP-9/MMP-2 para o controle.** **C. Gráfico da razão MMP-9/MMP-2 para o estimulado.**

6.7.3 Atividade da fração U70 de *U. lactuca* L. em diminuir o número de corpúsculos lipídicos em macrófagos peritoneais após estímulo com LPS em dois tempos de exposição

Assim como apresentado para os macrófagos RAW 264.7, também foi avaliada a ação da fração U70 sobre a biogênese de corpúsculos lipídicos em macrófagos primários nos tempos de 24 e 48 horas.

A análise quantitativa do número de corpúsculos lipídicos/célula nos tempos de 24 e 48 horas apresentou perfil semelhante. Em ambos os tempos de exposição, não houve diferença significativa entre o número de corpúsculos no grupo controle incubado com a fração U70 nas concentrações 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ com o grupo apenas incubado com RPMI. Por outro lado, o grupo estimulado com LPS e incubadas com a fração U70 na concentração 100 $\mu\text{g/mL}$ apresentou redução significativa do número de corpúsculos lipídicos quando comparado com o grupo estimulado com LPS e sem tratamento. Além disso, na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ a redução do número de corpúsculos lipídicos/célula foi similar a visualizada para o controle DMEM (Figuras 33 e 34).

A Figura 33B mostra as imagens obtidas por microscopia de fluorescência dos grupos testados por um período de 24h. É possível observar tanto na análise quantitativa quanto pela análise qualitativa o menor número de corpúsculos no controle comparado ao estimulado. Além disso, ocorreu redução de 67% no número de corpúsculos lipídicos nos grupos estimulados com LPS e incubados com a fração U70 na concentração 100 $\mu\text{g/mL}$, diferença de cerca de 44 corpúsculos lipídicos/célula para o grupo estimulado e 14 corpúsculos lipídicos/célula para o grupo estimulado e incubado com a fração.

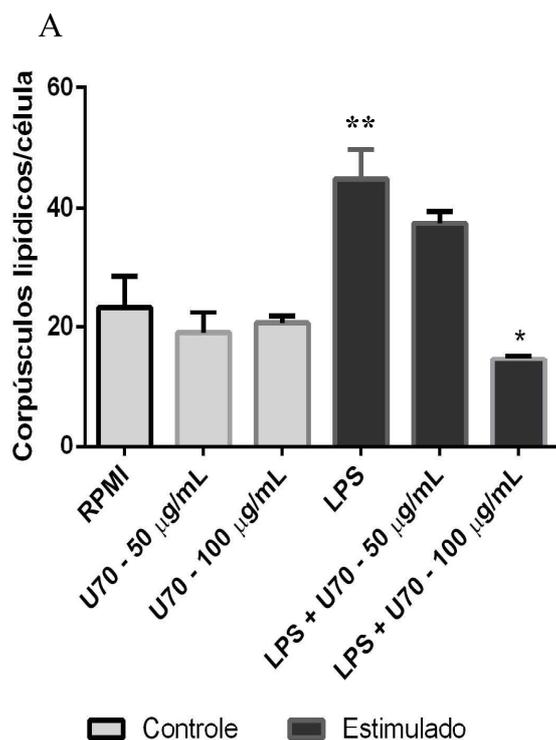
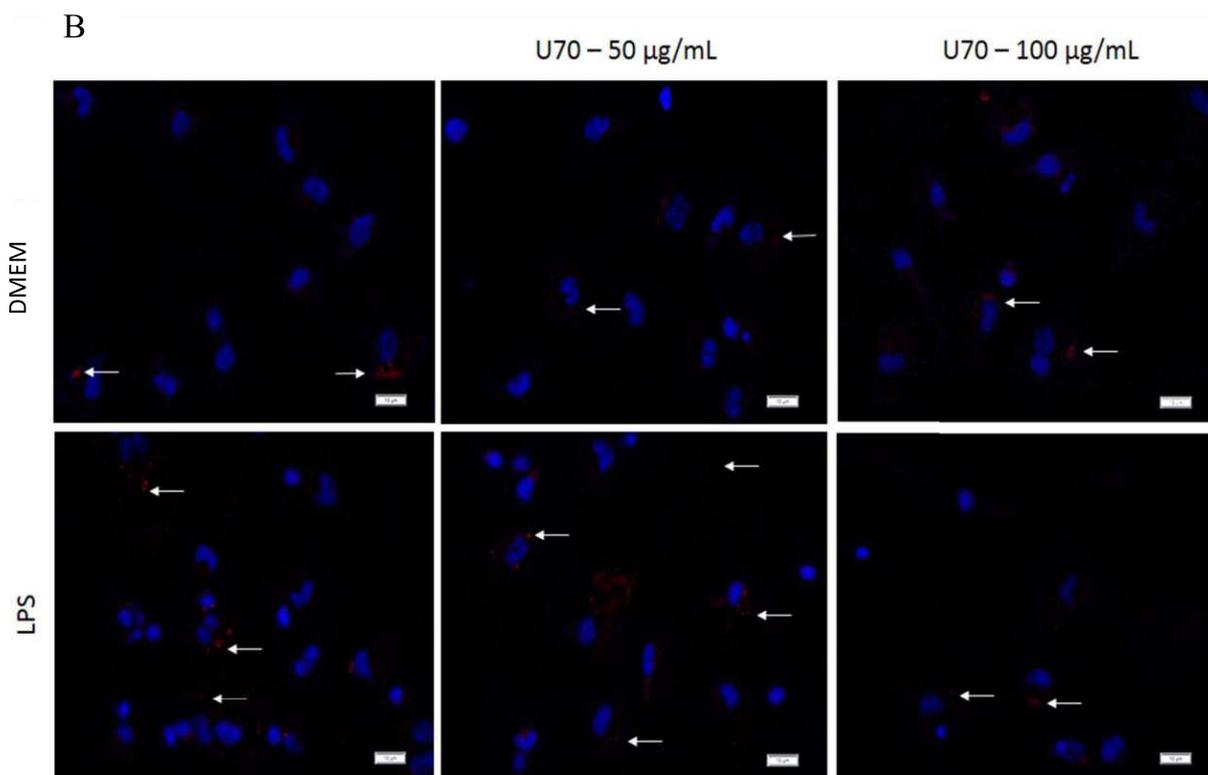


Figura 33. Biogênese de corpúsculos lipídicos em macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 no controle e após estímulo com LPS por 24h. A. Análise quantitativa do número de corpúsculos lipídicos. As células do lavado peritoneal foram plaqueadas sobre lamínulas e, após adesão, incubadas com a fração U70 nas concentrações de 50 e 100 µg/mL com e sem estímulo com LPS. Após período de 24h, as lamínulas foram coradas com Oil Red O e o número de corpúsculos quantificado em microscópio, contando-se um total de 50 células por lamínula. Valores significativos: * $p < 0,05$ vs LPS, ** $p < 0,05$ RPMI vs LPS. **B. Imagens da sobreposição dos corpúsculos lipídicos capturados nos filtros para DAPI e Oil Red.** As imagens foram obtidas em microscópio de fluorescência Olympus BX53 e sobrepostas no programa ImageJ.



A Figura 34B mostra as imagens obtidas por microscopia de fluorescência dos grupos testados por um período de 48h. Foi observada redução de 69% do número de corpúsculos lipídicos após estímulo e incubação com a fração U70 na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, diferença de cerca de 16 corpúsculos lipídicos/célula para o grupo estimulado e 5 corpúsculos lipídicos/célula para o grupo estimulado e incubado com a fração. A redução promovida na concentração 100 $\mu\text{g/mL}$ foi similar a observada para o controle DMEM (Figura 34A).

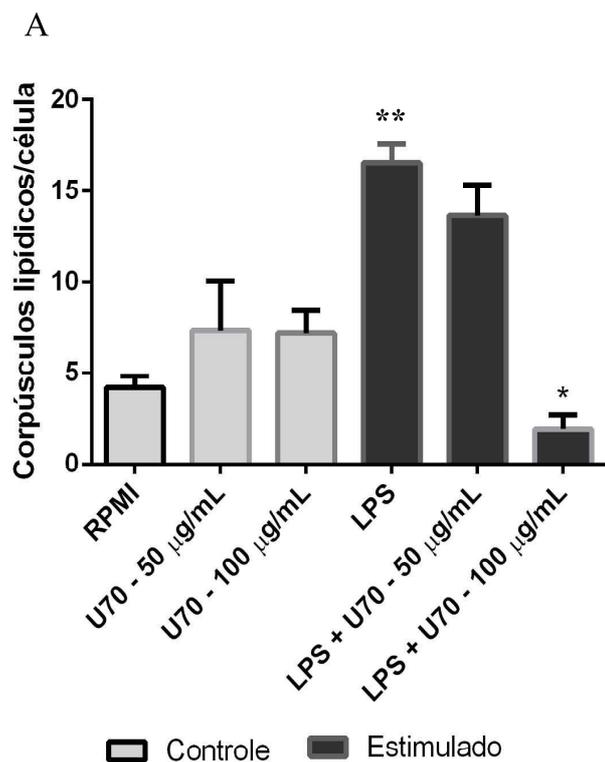
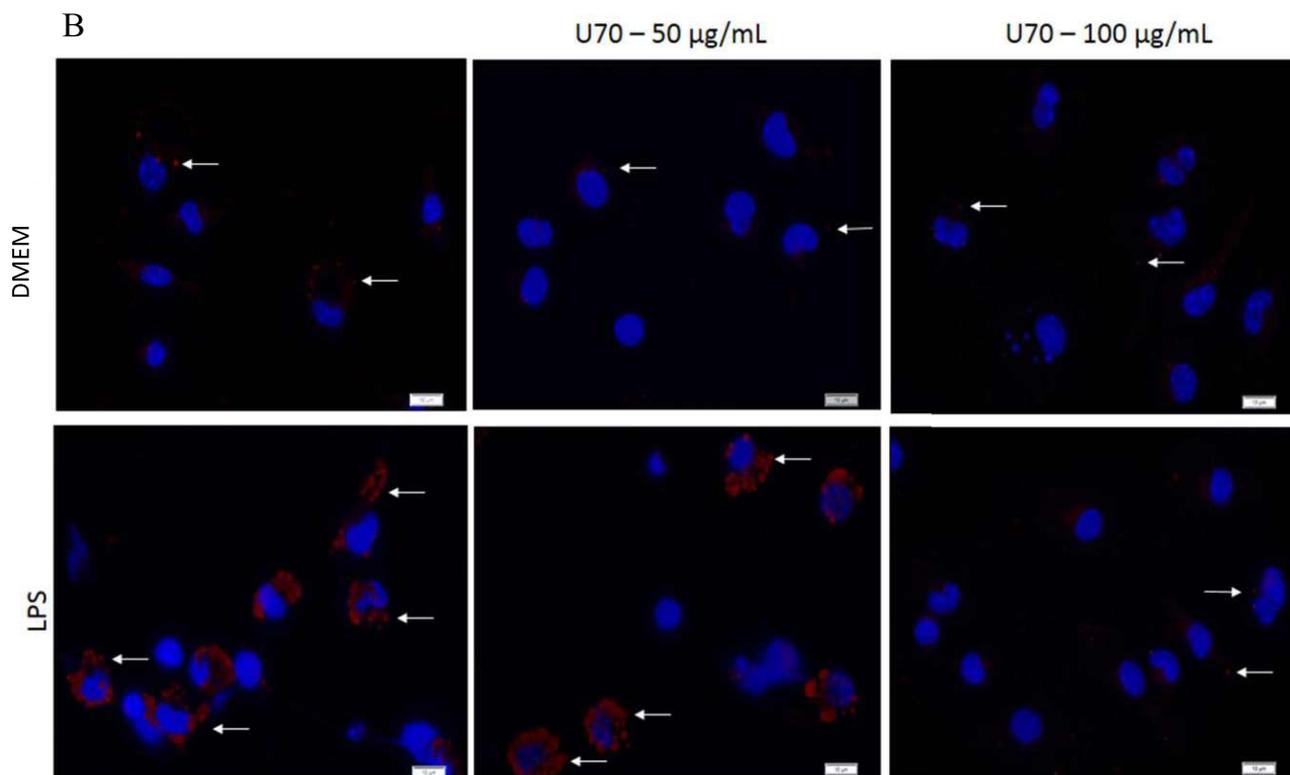


Figura 34. Biogênese de corpúsculos lipídicos em macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 em condições basais e após estímulo com LPS por 48h. A. Análise quantitativa do número de corpúsculos lipídicos. As células do lavado peritoneal foram plaqueadas sobre lamínulas e, após adesão, incubadas com a fração U70 nas concentrações de 50 e 100 µg/mL com e sem estímulo com LPS. Após período de 48h, as lamínulas foram coradas com Oil Red O e o número de corpúsculos quantificado em microscópio, contando-se um total de 50 células por lamínula. Valores significativos: * $p < 0,05$ vs LPS, ** $p < 0,05$ RPMI vs LPS. **B. Imagens da sobreposição dos corpúsculos lipídicos capturados nos filtros para DAPI e Oil Red.** As imagens foram obtidas em microscópio de fluorescência Olympus BX53 e sobrepostas no programa ImageJ.



6.7.4 Avaliação da expressão de PPAR γ em macrófagos peritoneais por western blot

Visto que a produção de corpúsculos lipídicos pode ser regulada por PPAR γ , avaliamos a ação da fração U70 na concentração 100 µg/mL sobre a expressão dessa proteína

em macrófagos peritoneias. A fração U70 na concentração 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mostrou atividade significativa em modular a biogênese de corpúsculos nos ensaios anteriores. Observamos que no tempo de 24h os macrófagos incubados com a fração U70 na concentração 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ na ausência do estímulo apresentaram discreta redução da expressão de PPAR γ . Por outro lado, após estímulo com LPS 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ os macrófagos estimulados e incubados com a fração U70 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ não reduziram a expressão de PPAR γ nos tempos de 24 e 48h. Esse resultado sugere que a atividade da fração U70 em reduzir o número de corpúsculos lipídicos após estímulo provavelmente não ocorre por modulação dessa via.

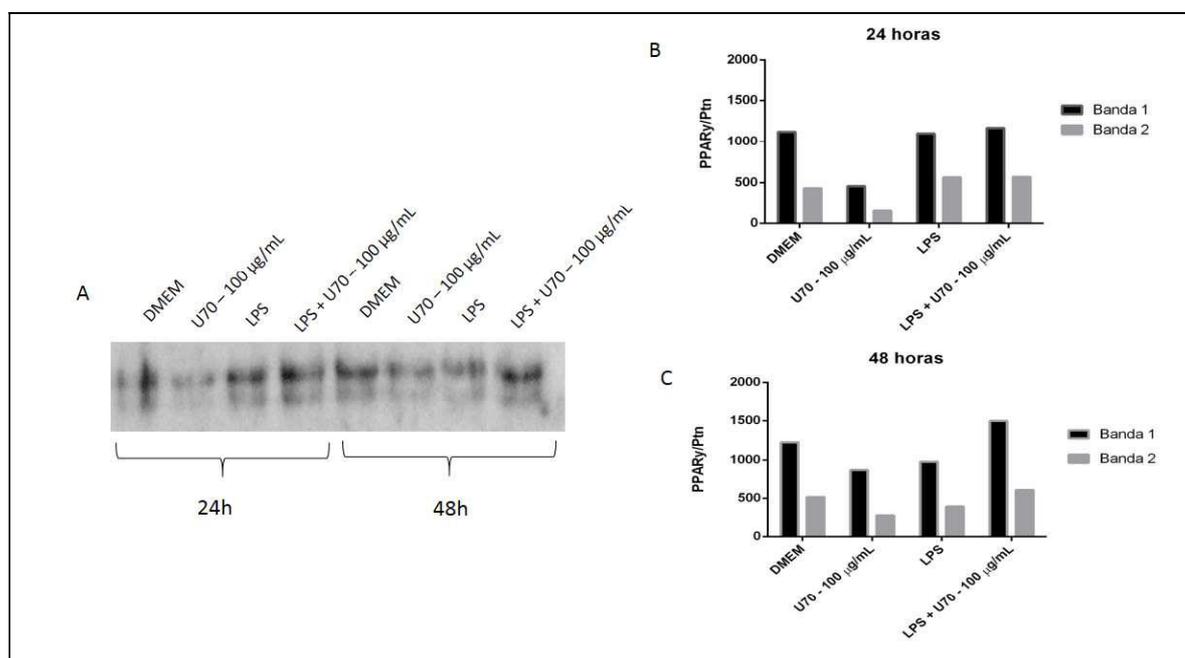


Figura 35. Avaliação do efeito da fração U70 sobre a expressão de PPAR γ em macrófagos peritoneais por western blot. Aliquotas correspondentes a 60 μg de proteínas do lisado celular de macrófagos peritoneais foram aplicadas em gel de acrilamida/bisacrilamida 10% e submetidas a uma eletroforese vertical. O gel foi transferido para membrana, que após bloqueio com Molico 5%, foi incubada com anticorpo primário anti-PPAR γ sc-7273 1:750 overnight e em seguida com anticorpo secundário por 1 hora. **A. Imagem escaneada das bandas proteicas** A membrana foi revelada com os reveladores pico e dura em tempos de exposição apropriado. As bandas proteicas foram escaneadas e densitometradas no programa TotalLab TL120 1D v 2009 e o resultado expresso em forma de gráfico de linha como proporção de PPAR γ /Proteína (Nonlinear Dynamics Ltda). **B. Gráfico PPAR γ /Ptn para incubação por 24 horas.** **C. Gráfico PPAR γ /Ptn para incubação por 48 horas.**

7 DISCUSSÃO

Os PS de algas verdes são heterogêneos, podendo variar de acordo com determinados fatores como região de origem e período de coleta. Dessa forma, tanto o conteúdo químico de açúcares, ácidos urônicos e sulfatos quanto a composição monossacarídica dos PS de *U. lactuca* L. obtidos nesse estudo são semelhantes aos observados na literatura, porém as concentrações destes constituintes são distintas (ARAÚJO et al., 2016; THANH et al., 2016). Entre as frações de *U. lactuca* L. analisadas nesse estudo, as frações U50 e U70 apresentaram os maiores conteúdos de açúcares (66,4 e 69,6 %). Todas as frações são sulfatadas, sendo a maior concentração de sulfato apresentada pela fração U100, porém na relação sulfato/açúcares totais a maior relação foi para a fração U30, ou seja, essa fração apresenta mais grupos sulfatos em relação ao resíduos de açúcares presentes, apesar de não ser a fração com maior conteúdo de açúcares. Um ponto onde os estudos concordam é com a presença de sulfato nos polissacarídeos de *U. lactuca*, com o seu conteúdo variando geralmente entre 15 e 30%, nesse estudo encontramos uma concentração semelhante de sulfato entre 25 e 34% (KAEFFER et al., 1999; TIAN et al., 2015). Nas dosagens químicas foram observadas baixas concentrações de proteínas, o que demonstra que a proteólise foi eficiente em quebrar as proteínas presentes, sendo a concentração de alcalase utilizada adequada. Também não foi identificada a presença de fenólicos, composto já relacionado com diversas atividades biológicas e que se presente poderia ser o responsável ou atuar em sinergismo com os PS nas atividades biológicas observado para as frações.

Na eletroforese em tampão PDA as frações U30, U50 e U70 apresentaram intensa metacromasia, confirmando a presença de sulfato nessa frações. Visto que as frações U50 e U70 possuem maior conteúdo de açúcares e no caso da U70 a fração é composta por uma única família de polissacarídeos foi necessário aplicar uma concentração menor dessas frações (30 µg) em comparação com a fração U30 (50 µg) para ser visualizada uma metacromasia semelhante. Por outro lado, a fração U100 apresentou uma discreta metacromasia apesar de ser a fração com maior concentração de sulfato na dosagem química. Sugere-se que os grupos sulfatos dessa fração estejam internalizados no polissacarídeo, não sendo observados quando o polissacarídeo está íntegro mas observado na dosagem, na qual o polissacarídeo é hidrolisado com ácido clorídrico.

Além disso, a análise da composição monossacarídica das frações mostrou a presença de resíduos de raminose como monossacarídeo majoritário, também glicose, galactose e ácidos urônicos. As frações de *U. lactuca* analisadas por Tian et al. (2015), apresentaram

conteúdo monossacarídico semelhante, com a presença de raminose, xilose, glicose e ácidos urônicos. Em outro trabalho, Than et al. (2016), identificaram raminose, xilose, glicose e traços de galactose e manose. Ambos identificaram a raminose como monossacarídeo majoritário, assim como nesse estudo. Porém, não foi identificada xilose nas frações. Entre os ácidos urônicos, pode-se identificar o ácido glicurônico e um ácido urônico não identificado, esse ácido urônico na FACE apresentou-se como uma banda entre o ácido glicurônico e o galacturônico. Sugere-se que essa banda corresponda ao ácido idurônico que já foi descrito como um dos constituintes dos PS de ulvanas (PANGESTUTI E KURNIANTO, 2017).

Conhecer o peso molecular das frações em estudo é importante para sua caracterização e apresenta-se como um dos fatores relacionados com a capacidade biológica de diversos PS, influenciando a interação do PS com componentes celulares, por exemplo. Nas frações estudadas observamos variado peso molecular para os PS de *Ulva lactuca* L. A literatura descreve uma grande variação de pesos moleculares para amostras de *U. lactuca*, sendo essas diferenças explicadas por variações no processo de extração, por exemplo na temperatura aplicada no processo extrativo, também por características particulares da amostra, como sazonalidade e ainda diferentes métodos e condições de medida do peso molecular (LAHAYE E ROBIC, 2007).

Nos métodos utilizados para estimar o peso molecular, eletroforese em tampão TBE e gel filtração, os resultados obtidos foram similares, nos quais as frações U30, U50 e U100 são compostas por mais de uma população de polissacarídeos, enquanto a fração U70 é composta por apenas uma população de polissacarídeos, demonstrando que o processo de extração foi suficiente para purificação dessa fração. Dessa forma, podemos denominar a fração U70 como polissacarídeo sulfatado de *Ulva lactuca* L. 70 (PS-U70), por se tratar de uma única família de polissacarídeo.

Além disso, a fração U50 possui duas famílias de polissacarídeos, uma com peso molecular em torno de 100 kDa e outra em torno de 40 kDa, já a U70 apenas uma família em torno de 40 kDa, portanto há uma indicação de que os polissacarídeos de menores pesos moleculares é que estão relacionados com a atividade anti-inflamatória e como temos apenas um polissacarídeo de menor peso na fração U70, esta apresenta atividade anti-inflamatória mais significativa.

De acordo com os RMNs das frações U50 e U70 e com as dosagens químicas e eletroforeses realizadas, os polissacarídeos das frações são constituídos pelos ácidos ulvabiurônicos de tipo A, que apresenta L-raminose ligada ao ácido glicurônico, e tipo B, que

apresenta L-raminose ligada ao ácido idurônico, isômeros de posição cujas as estrutura podem ser observadas na Figura 36.

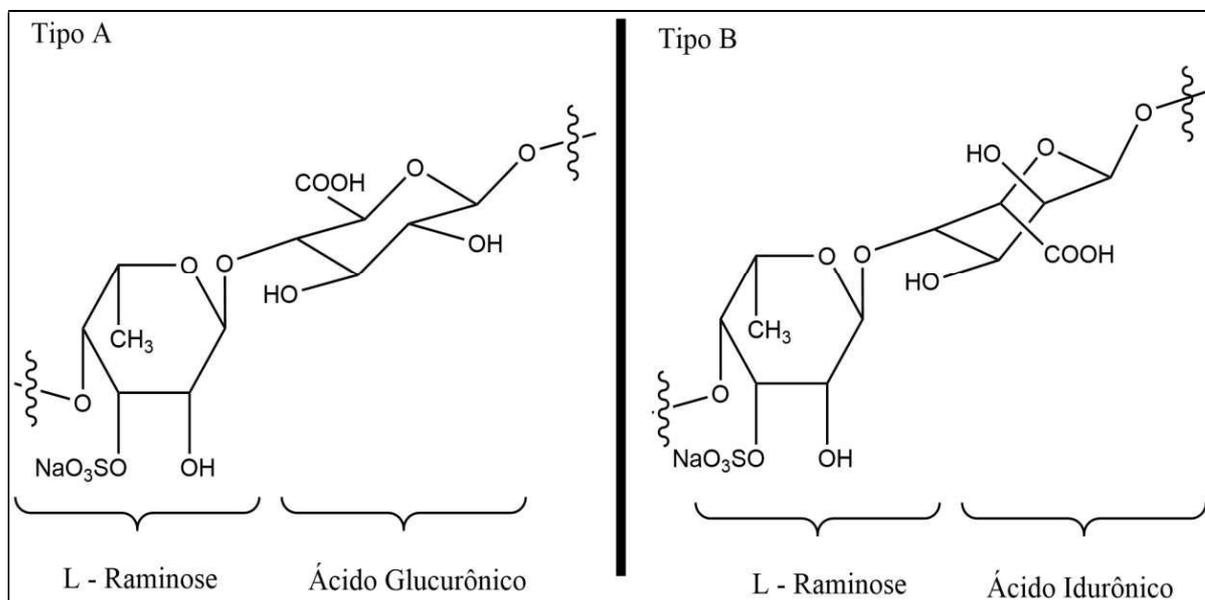


Figura 36. Estrutura do ácido ulvanobiurônico tipo A e B. Tipo A. α -L-Raminose 3 sulfatada ligada ao D-ácido glucurônico por ligação β (1-4). Tipo B. α -L-Raminose 3 sulfatada ligada ao L-ácido idurônico por ligação β (1-4).

Com bases nos espectros, a família de polissacarídeos de menor peso (cerca de 40 kDa) presente em ambas as frações é semelhante. Porém, alguns picos de correlação referentes a raminose-3-sulfato ligada ao ácido idurônico e ao ácido idurônico não foram identificados no espectro da fração U50 ou foram menos intensos que para a U70, provavelmente devido a fração de menor peso molecular estar em menor concentração na fração U50 quando comparado com a U70 e pela fração U50 ter duas famílias de polissacarídeos e não uma como a U70 (SASSAKI et al., 2008; FREITAS, et al., 2015). Isso pode estar relacionado com a atividade biológica distinta entre as frações U50 e U70. Em ensaios anteriores realizados no Laboratório de Glicoconjugados (ICB-UFJF), a fração U50 apresentou atividade anticoagulante, porém não foi observada a atividade para a fração U70 (REIS, 2016), ademais a fração U70 apresenta atividade anti-inflamatória mais significativa.

As frações não alteraram a capacidade dos macrófagos da linhagem RAW 264.7 em reduzir o MTT, o que favoreceu a continuidade dos estudos das atividades biológicas das frações. Alves, Sousa e Reis (2012), avaliaram a citotoxicidade de polissacarídeos extraídos de *U. lactuca* pelo ensaio de MTT e por outros métodos, não sendo observada citototoxicidade nos ensaios realizados, corroborando com os resultados encontrados nesse estudo.

Os PS de *U. lactuca* L. têm sido relacionados na literatura com diversas atividades biológicas, entre elas atividade anti-inflamatória. A resposta inflamatória é desencadeada por injúria, vírus, bactérias e o processo inflamatório decorrente envolve uma série de fatores como ativação enzimática, reparo tecidual e a liberação de mediadores inflamatórios, tais como citocinas, óxido nítrico, eicosanoides, etc. Logo, buscou-se avaliar a atividade das frações de *U. lactuca* L. sobre reguladores do processo inflamatório e observamos atividades significativas de determinadas frações, indicando possível ação anti-inflamatória.

As frações U50 e U70 nas concentrações 12,5 e 25 µg/mL demonstraram atividade potencial em reduzir a produção de óxido nítrico em macrófagos RAW 264.7 após estímulo por 48 horas e a fração U70 na concentração de 50 µg/mL em macrófagos peritoneais após 24 horas. Em macrófagos peritoneais a ação da fração U70 ocorreu em um tempo menor (24 h), o que demonstra a capacidade de reduzir a produção de óxido nítrico em células primárias, porém em condições distintas da observada para RAW 264.7.

Para um tempo de estímulo de 24 horas, as frações U50 e U70 na concentração 100 µg/mL são capazes de promover o estímulo da produção de NO, mas não são capazes de promover uma atividade anti-inflamatória nas concentrações 12,5 e 50 µg/mL, indicando que a ação deve ser tempo dependente, necessitando da síntese e/ou ativação de substâncias e vias.

Quando foi avaliado o modelo de incubação com a fração U70 antes ou depois do estímulo com o LPS, observou-se uma redução da produção de óxido nítrico quando U70 foi aplicada após o estímulo com LPS. Isso demonstra que provavelmente o polissacarídeo tem uma ação curativa. Sugere-se que a fração U70 atue no receptor do tipo toll 4, receptor no qual o LPS se liga, uma vez que os dados demonstraram que quando a fração U70 é adicionada após o estímulo com LPS por um período de contato de 30 minutos (período curto), ela é capaz de reduzir a produção de óxido nítrico por uma provável competição de ligação ao receptor.

O óxido nítrico é um dos mediadores inflamatórios liberados por macrófagos durante o desenvolvimento de uma resposta à injúria ou patógeno e a redução da sua produção indica uma atividade anti-inflamatória. Já foi descrita na literatura, a redução da produção de NO por células da glia infectadas com o vírus da encefalite após o tratamento com *U. lactuca* L. quando comparada com células não tratadas (CHIU et al., 2012). Outras espécies de *Ulva*, por outro lado, estimularam macrófagos da linhagem celular RAW 264.7, induzindo a produção de óxido nítrico (KIM et al., 2011). Essa atividade dual das ulvanas é justificada pela heterogeneidade dos PS das algas, podendo interagir de formas diferentes com as células e induzir respostas distintas.

Foram realizados muitos estudos sobre o efeito de compostos de origem vegetal na ativação de metaloproteinases, grande parte deles buscando sua aplicação em cuidados com a pele, tanto na redução do envelhecimento quanto no câncer de pele. Nesse trabalho buscou-se avaliar o efeito das frações U50 e U70 na atividade das MMP-2 e 9. A fração U50 reduziu significativamente a atividade da MMP-9 em macrófagos RAW 264.7 nas concentrações 12,5 e 100 $\mu\text{g/mL}$ após estímulo com LPS, já a fração U70 reduziu a atividade na concentração 25 $\mu\text{g/mL}$. A MMP-9 já teve o aumento de sua ativação observado em processos inflamatórios associados a doenças como a artrite, dessa forma a redução de sua ativação pode contribuir para a atenuação da inflamação.

Ainda não foi descrito na literatura a atividade dos PS de *U. lactuca* L. sobre as MMP-2 e 9. Porém, o trabalho de Park et al. (2011), avaliou por meio do zimograma a ação de diversos extratos metanólicos de algas marinhas sobre a atividade das metaloproteinases, entre eles o da alga verde *Enteromorpha linza*, que foi capaz de reduzir a MMP-2 e a MMP-9 em células de fibrosarcoma humano e da alga verde *E. compressa* que reduziu a atividade de MMP-2 em fibroblastos. Apesar de serem metabólitos secundários de algas verdes e não PS como em nosso trabalho, esse estudo demonstra o interesse na pesquisa de algas verdes e de suas ações sobre as MMPs, buscando sua aplicação no tratamento de doenças.

Por outro lado em macrófagos peritoneais, não foi observado redução da atividade da MMP-9 após estímulo por 24h e 48h e incubação com U70 nas concentrações 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$. Apesar de ter sido observada atividade nos macrófagos RAW 264.7, a atividade concentrou-se nas concentrações de 12,5 e 25 $\mu\text{g/mL}$, justificando não observar essa atividade nas maiores concentrações em macrófagos primários.

Ademais, já foi descrita a relação entre substâncias relacionadas ao processo inflamatório e ação das MMPs. Como exemplo, as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são um dos indutores da produção de MMPs, além disso, já foi descrita atividade das citocinas TNF- α e IL-1 β na transcrição de MMPs. Dessa forma, a atividade das frações U50 e U70 sobre outras substâncias avaliadas nesse estudo podem estar participando da modulação da atividade das MMPs.

As citocinas pró-inflamatórias levam ao desencadeamento de uma resposta inflamatória nas células. O TNF- α que é produzido principalmente por macrófagos, sendo essas também suas células alvo, atuam promovendo a ativação de células fagocíticas e o choque endotóxico, já a IL-6 tem entre as principais fontes as células T helper e os macrófagos, tendo como alvo células B ativadas e células do plasma, promovendo diferenciação celular e produção de anticorpos IgG (TURNER et al., 2014). Em nosso estudo,

a fração U50 e o U70 na concentração 100 µg/mL demonstraram potencial em reduzir após estímulo com LPS a produção dessas citocinas em macrófagos RAW 264.7. Já foi descrita na literatura, a redução da produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 em macrófagos tratados por 1 hora com uma associação selênio e PS de *U. lactuca*, estimulados com LPS por 18 horas e em seguida estimulados por 1 hora com a bactéria comensal *E.f.* (ZHU et al., 2017). No trabalho de Abd-Ellatef et al. (2017), a administração de PS de *U. lactuca* reduziu em 33,95% os níveis de TNF- α em soro de animais com câncer de mama estimulado por 7,12-dimetilbenzotraceno (DMBA) quando comparados ao controle. Além disso, a avaliação por PCR da expressão das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 em tecido cerebral de ratos com encefalite, indicou que o pré-tratamento com *U. lactuca* L. reduziu significativamente a quantidade de TNF- α mas não de IL-6 quando comparados com o animal não tratado (CHIU, CHAN, WU, 2012).

O LPS foi utilizado como o agente indutor em nosso trabalho, esse atua em receptores tipo toll 4, que ativam IKK, culminando com a liberação do NF- κ B e consequente translocação para o núcleo com expressão de genes responsáveis pela resposta inflamatória. Portanto, como a incubação com a fração U70 foi capaz de reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias e o NF- κ B é descrito na literatura como um dos responsáveis pela modulação dessa produção, buscou-se avaliar a ação dos PS na via de ativação do NF- κ B. No ensaio de translocação do NF- κ B observamos uma redução da translocação do fator no tratamento com a fração U70 na concentração 100 µg/mL quando comparado ao controle, o que indica que o PS atua sobre essa via e as atividades anti-inflamatórias podem estar relacionadas a essa interação. Além do mais, a atividade de PS de *U. lactuca* sobre a redução da expressão do gene NF- κ B já foi descrita em um estudo onde o PS foi administrado em associação com nanopartículas de selênio (ZHU et al., 2017).

Da mesma forma, a ativação do NF- κ B pode levar a expressão da iNOS, enzima induzível responsável pela produção de óxido nítrico, logo uma regulação via NF- κ B pode ainda afetar a produção de óxido nítrico pelos macrófagos.

A fração U70 nas concentrações 100 µg/mL reduziu significativamente o número de corpúsculos lipídicos em macrófagos RAW 264.7 e em macrófagos peritoneais após estímulo com LPS. A diferença no número total de corpúsculos lipídicos/célula em macrófagos peritoneais entre 24 horas (entre 20 e 40 corpúsculos lipídicos/célula) e 48 horas (entre 3 e 15 corpúsculos lipídicos/célula) pode ser decorrente de diversas interações, como pela degradação desses corpúsculos, porque esses apresentam um turnover rápido, sendo degradados por lipases ou também por autofagia (HERKER, OTT, 2012). Além disso, os

corpúsculos podem alterar seu tamanho por aumento da produção de triacilgliceróis, os quais são produzidos por enzimas na superfície dos CLs, também por coalescência entre corpúsculos através de poros e por difusão de moléculas de triacilglicerol de um corpúsculo para outro (THIAM, FARESE JR, WALTHER, 2013).

Os corpúsculos lipídicos já foram associados com o processo inflamatório, desempenhando papel na produção de eicosanoides, um importante mediador inflamatório. Sathievel et al. (2008), em um estudo sobre as atividades anti-peroxidativa e anti-hiperlipidêmica de polissacarídeos de *U. lactuca* em ratos com hepatite induzida por D-galactosamina observou redução do número de corpúsculos lipídicos em tecidos do fígado. Outros estudos relacionando a atividade de PS de *U. lactuca* e também de outras algas com a redução de corpúsculos lipídicos em condições de estímulo inflamatório não foram encontrados.

Ademais, a administração de PS de *U. lactuca* L. em ratos hipercolesterolêmicos levou a melhora do perfil lipídico e antioxidante, demonstrando ação dos PS sobre a redução do conteúdo lipídico, como triglicérides, LDL e HDL, e redução do estresse oxidativo associado (HASSAN et al., 2011). Ainda, os polissacarídeos sulfatados de fontes marinhas também têm sido relacionados com atividade hipolipidêmica, atuando sobre enzimas que atuam na degradação lipídica e dessa forma regulando o perfil lipídico e protegendo as funções do fígado e rins *in vitro* e em ratos (LI et al., 2017; KOLSI et al., 2017). A relação entre polissacarídeos e lipídeos tem sido estudada por outras áreas como a indústria alimentícia e farmacêutica. No estudo de Chang e McClements (2015), avaliou-se a estabilidade de uma emulsão contra floculação por meio de um mecanismo de deposição de polissacarídeos sobre a superfície das gotas lipídicas proteicas em emulsões óleo em água. Portanto, a existência de relação entre PS de origem marinha e lipídios já foi estabelecida. Sendo agora necessário melhor elucidar sua atividade sobre os corpúsculos lipídicos, estruturas com ação importante na inflamação.

A via do PPAR γ regula a produção de corpúsculos lipídicos e com o intuito de avaliar se a ação da fração U70 sobre os corpúsculos se dava por modulação da via do PPAR γ foi avaliada sua expressão por western blot. Não houve redução da expressão dessa proteína quando os macrófagos peritoneais foram estimulados com LPS e incubados com a fração U70 na concentração 100 μ g/mL, a concentração mais eficaz em reduzir o número de corpúsculos. Portanto, sugere-se que a redução do número de corpúsculo ocorra pela modulação da via de ativação do NF- κ B. No estudo de Wang et al. (2012) observou-se que o NF- κ B é estimulado pelo LPS e que pode marcadamente aumentar a deposição de lipídeos, além disso o pré-

tratamento com um inibidor de NF- κ B, reduziu significativamente o número de corpúsculos lipídeos em fibroblastos.

De acordo com a literatura, um quadro de inflamação crônica é caracterizado por desregulação do sistema imune com aumento da produção de citocinas, redução das defesas antioxidantes e consequente aumento da produção de espécies reativas de oxigênio. Portanto, substâncias com atividade antioxidante podem contribuir para a redução da inflamação crônica (MORO-GARCIA et al., 2018). A fração U70 demonstrou reduzir a peroxidação lipídica em macrófagos RAW 264.7 nas concentrações entre 12,5 e 200 μ g/mL, demonstrando sua possível ação na redução do estado inflamatório também por esse mecanismo. Já foi observada a capacidade dos polissacarídeos de *U. lactuca* em reduzir em cerca de 50% a peroxidação lipídica em ratos Wistar com indução de câncer de mama quando comparado ao controle estimulado (ABD-ELLATEF et al., 2017). Além disso, He et al. (2016) avaliou a ação antioxidante dos polissacarídeos de *U. lactuca* L. *in vitro* por diferentes ensaios, como avaliação da captura dos radicais ABTS e radical hidroxila, captura de nitrito e poder de redução, tendo o polissacarídeo de *U. lactuca* L. apresentado atividade significativa em todos os testes realizados. Outros estudos avaliaram a atividade antioxidante de polissacarídeos de *U. lactuca* L. de diferentes locais e com diferentes processos de extração por variados ensaios, como captura do radical DPPH, poder de redução e pela atividade antioxidante total, nos quais os polissacarídeos da alga também apresentaram atividade antioxidante significativa (YAICK et al., 2017; EL-BAKY, BAZ, BAROTY, 2009). Já o trabalho de Widyaningsih et al. (2017), descreveu a redução significativa da produção de malondialdeído em animais tratados com extrato etanólico de *U. lactuca*.

Na Tabela 4 está apresentado o resumo das atividades biológicas observadas para a fração U70 sobre os mediadores inflamatórios estudados, a fração U70 demonstrou a atividade anti-inflamatória mais significativa entre as frações de *U. lactuca* L. avaliadas.

Tabela 4. Resumo das atividades da fração U70 sobre os mediadores inflamatórios avaliados em nosso estudo

Macrófagos	RAW 264.7		C57BL/6	
	30 minutos	48 horas	24 horas	48 horas
Óxido Nítrico*	—	↓	↓	NS
MMP-9	—	↓	NS	NS
Citocinas (IL-6 e TNF- α)	—	↓	—	—
Translocação do NF- κ B	↓	—	—	—
Corpúsculos lipídicos	—	↓	↓	↓
Peroxidação lipídica	↓	—	—	—

↓ - Reduziu significativamente; NS - Não reduziu significativamente; — - Ensaio não foi realizado nessa condição; * Foi considerado apenas o modelo de estímulo e tratamento concomitante.

De acordo com os resultados obtidos em nosso trabalho, sugere-se que o LPS atue na via clássica de ativação do NF- κ B. Nessa via o LPS ativa o receptor TLR4, isso promove a ativação do MyD88 que recruta receptores IL-1 associados a quinase 4 (IRAK-4), consequentemente ativam IRAK-1 por fosforilação, o que leva a sua associação com o TRAF6 e ativação do complexo IKK, esse complexo fosforila e degrada o I κ B, os I κ Bs são proteínas que bloqueiam a translocação do NF- κ B para o núcleo, com sua degradação o NF- κ B é liberado e pode então ser translocado para o núcleo onde modula a expressão de genes relacionados com a produção de citocinas, corpúsculos lipídicos, espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico. Na presença da fração U70 a via clássica do NF- κ B provavelmente é inibida em macrófagos, com redução da translocação do NF- κ B para o núcleo e com isso ocorrendo uma diminuição da produção de citocinas, corpúsculos lipídicos e outras substâncias. Além disso, sugere-se que a fração U70 module a produção de óxido nítrico por outras vias, na qual a fração U70 apresenta inibição da produção do mediador quando presente em menores concentrações (12,5, 25, 50 μ g/mL) e não alteração ou aumento em maiores concentrações (100 μ g/mL), possivelmente atuando sobre vias distintas (Figura 37).

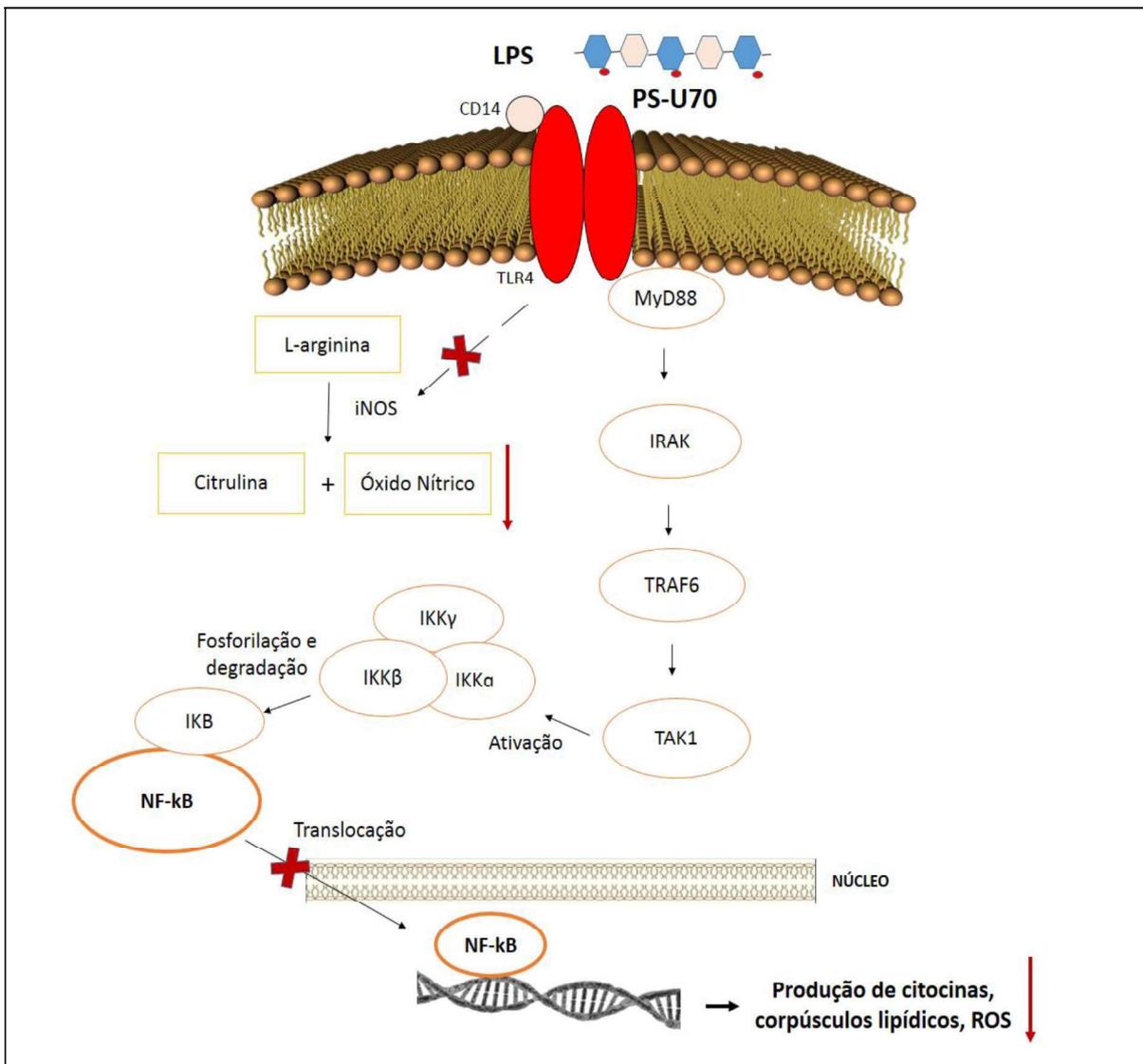


Figura 37. Via de ativação do NF-κB a partir do receptor do tipo toll 4 (TLR4) e produção de óxido nítrico em macrófagos por estímulo com LPS.

8 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados encontrados nesse estudo, as frações de *U. lactuca* L. são formadas majoritariamente por resíduos de raminose sulfatados e pelos ácidos glucurônico e idurônico. As frações apresentam pesos moleculares distintos e a fração U70 é composta por uma única família de polissacarídeos após a precipitação com acetona. Em relação a atividade biológica, a fração U70 apresentou atividade anti-inflamatória potencial modulando a atividade de componentes relacionados com o processo inflamatório. Nos ensaios realizados a fração U70 diminuiu a produção de óxido nítrico nas duas linhagens de macrófagos estudadas, a atividade de MMP-9 em RAW 264.7, a produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 em RAW 264.7, a biogênese de corpúsculos lipídicos nas duas linhagens de macrófagos e a peroxidação lipídica em RAW 264.7. A fração U70 demonstrou atuar sobre a via do NF-kB, reduzindo a translocação desse fator do citoplasma para o núcleo após estímulo com LPS. Portanto, as perspectivas futuras são investigar a interação do PS com o receptor tipo toll 4 e a via do NF-kB, assim como a ação do PS em modelos animais e celulares de doenças inflamatórias crônicas.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABD-ELLATEF, G. F.; AHMED, O. M.; ABDEL-REHEIM, E. S.; ABDEL-HAMID, Z. A. *Ulva lactuca* polysaccharides prevent Wistar rat breast carcinogenesis through the augmentation of apoptosis, enhancement of antioxidant defense system, and suppression of inflammation. **Breast Cancer - Targets and Therapy**, v. 9, p. 67 – 83, 2017.
- ALMEIDA, C. L. F.; FALCÃO, H. S.; LIMA, G. R. M. MONTENEGRO, C. A.; Lira, N. S.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; RODRIGUES, L. C. SOUZA, M. F. V.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BATISTA, L. M. Bioactivities from Marine Algae of the Genus *Gracilaria*. **Internacional Journal of Molecular Science**, v. 12, p. 4550-4573, 2011.
- ALMEIDA, P. E.; SILVA, A. R.; MAYA-MONTEIRO, C. M.; TÖRÖCSIK, D.; D'ÁVILA, H.; DEZSÖ, B.; MAGALHÃES, K. G.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; NAGY, L., T. BOZZA, P. T. Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guérin Infection Induces TLR2-Dependent Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Expression and Activation: Functions in Inflammation, Lipid Metabolism, and Pathogenesis. **Journal of Immunology**, v. 183, n. 2, 2009.
- ALVINE, T. D.; KNOPIK, P. L.; NILLES, M. L.; BRADLEY, D. S. **Inflammatory Mediators**, 1ª ed. Nova Jersey: John Wiley & Sons, Ltd, 2015.
- ALVES, A.; SOUSA, R. A.; REIS, R. L. *In Vitro* Cytotoxicity Assessment of Ulvan, a Polysaccharide Extracted from Green Algae. **Phytotherapy Research**, 2012.
- ARAÚJO, I. W. F.; VANDERLEI, E. S. O.; RODRIGUES, J. A. G.; COURA, C. O.; QUINDERÉ, A. L. G.; FONTES, B. P.; QUEIROZ, I. N. L.; JORGE, R. J. B; BEZERRA, M. M.; SILVA, A. A. R.; CHAVES, H. V.; MONTEIRO, H. S. A.; PAULA, R. C. M.; BENEVIDES, N. M. B. Effects of a sulfated polysaccharides isolated from the red seaweed *Solifera filiformis* on model of nociception and inflammation. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, p. 1207 – 1225, 2011.
- ARAÚJO, I. W. F.; RODRIGUES, J. A. G.; QUINDERÉ, A. L.G.; SILVA, J. F. T.; MACIEL, G. F.; RIBEIRO, N. A.; VANDERLEI; E. S. O.; RIBEIRO, K. A.; CHAVES, H. V.; PEREIRA, K. M. A.; BEZERRA, M. M.; BENEVIDES, N. M. B. Analgesic and anti-inflammatory actions on bradykinin route of apolysulfated fraction from alga *Ulva lactuca*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 820 - 830, 2016.
- BHILOCHA, S.; AMIN, R.; PANDYA, M.; YUAN, H.; TANK, M.; LOBELLO, J.; COWMAN, M. K. Agarose and polyacrylamide gel electrophoresis methods for molecular mass analysis of 5-to 500-kDa hyaluronan. **Analytical biochemistry**, v. 417, n.1, p. 41- 49, 2011.
- BELHADJ, S.; HENTATI, O.; ELFEKI, A.; HAMDEN, K. Inhibitory activities of *Ulva lactuca* polysaccharides on digestive enzymes related to diabetes and obesity. **Archive of Physiology and Biochemistry**, v. 119, n.2, p. 81-87, 2013.
- BORÉN, J.; TASKINEN, M. R.; OLOFSSON, S. O.; LEVIN, M. Ectopic lipid storage and insulin resistance: a harmful relationship. **J Intern Med.**, v. 274, n. 1, 2013.

BOZZA, P. T.; VIOLA, J. P. B. Lipid droplets in inflammation and cancer. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 82, p. 243-250, 2010.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BURKE, A. J.; SULLIVAN, F. J.; GILES, F. J.; GLYNN, S. A. The yin and yang of nitric oxide in cancer progression. **Carcinogenesis**, v. 34, n. 3, p. 503 – 512, 2013.

CHANG, Y.; MCCLEMENTS, D. J. Interfacial deposition of an anionic polysaccharide (fucoidan) on protein-coated lipid droplets: Impact on the stability of fish oil-in-water emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 51, p. 252-260, 2015.

CHEN, X.; XIU, M.; YU, S.; MIN, S.; GUO, F. Lanthanum chloride inhibits LPS mediated expressions of pro-inflammatory cytokines and adhesion molecules in HUVECs: involvement on NF- κ B-Jmjd3 signaling. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 42, p. 1713-1724, 2017.

CHEN, L.; DENG, H.; CUI, H.; FANG, J.; ZUO, Z.; DENG, J.; LI, Y.; WANG, X.; ZHAO, L. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. **Oncotarget**, v. 9, n. 6, p. 7204-7218, 2018.

CHENG, Z.; LIMBU, M. H.; WANG, Z.; LIU, J.; LIU, L.; ZHANG, X.; CHEN, P.; LIU, B. MMP-2 and 9 in Chronic Kidney Disease. **International Journal of Molecular Science**, v.18, 2017.

CHIU, Y.; CHAN, Y.; LI, T.; WU, C. Inhibition of Japanese Encephalitis Virus Infection by the Sulfated Polysaccharide Extracts from *Ulva lactuca*. **Marine Biotechnology**, v. 14, 2012.

COSTA, L.S.; FIDELIS, G.P.; CORDEIRO, S.L.; OLIVEIRA, R.M.; SABRY, D.A.; CÂMARA, R.B.G.; NOBRE, L.T.D.B.; COSTA, M.S.S.P.; ALMEIDA-LIMA, J.; FARIAS, E.H.C.; LEITE, E.L.; ROCHA, H.A.O. Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 64, p. 21-28, 2010.

COURA, C. O. **Atividades antinociceptiva e anti-inflamatória dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Gracilaria cornea* J. Agardh**. 2011. Dissertação (Mestrado em bioquímica), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

CUNHA, A. L.; DE OLIVEIRA, L. G.; MAIA, L. F.; DE OLIVEIRA, L. F. C.; MICHELACCI, Y. M.; DE AGUIAR, J. A. K. Pharmaceutical grade chondroitin sulfate: Structural analysis and identification of contaminants in different commercial preparations. **Carbohydrate polymers**, v. 134, p. 300-308, 2015.

DIETRICH, C. P.; DIETRICH, S. M. Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. **Analytical biochemistry**, v. 70, n. 2, p. 645-647, 1976.

DI FERRANTE, N. Turbidimetric measurement of acid mucopolysaccharides and hyaluronidase activity. **The Journal of biological chemistry**, v. 220, n. 1, p. 303-6, May 1956.

DODGSON, K. S. Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymic and non-enzymic hydrolysis of carbohydrate and other sulphate esters. **Biochemical Journal**; v. 78, n. 2, 312-319, 1961.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde Determination as Index of Lipid Peroxidation. **Methods in enzymology**, v. 186, 1990.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colourimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

DUQUE, G. A.; DESCOTEAUX, A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. **Frontiers in Immunology**, v.5, 2014.

EL-BAKY, H. H. A.; BAZ, F. K. E.; BAROTY, G. S. E. Potencial biological properties of sulphated polysaccharides extracted from the macroalgae *Ulva lactuca* L. **Academic Journal of Cancer Research**, v. 2, n. 1, p. 1-11, 2009.

FERRAZ, F. B. Panorama Geral Sobre Doenças Inflamatórias Intestinais: Imunidade e Suscetibilidade da Doença de Crohn e Colite Ulcerativa. **Journal Health Science**, v. 18, nº2, p.139-143, 2016.

FRANCESCHINI, I.M.; BURLIGA, A.L.; REVIERS, B.; PRADO, J.F.; REZIG, S.H. **Algas: uma abordagem filogenética, taxonomica e ecologica**. 332p. Artmed, Porto Alegre, 2010.

FREITAS, M. B. **Caracterização química e atividade de ulvanas na estímulo de respostas oxidativas associadas ao controle de *Alternaria brassicicola* E *Colletotrichum higginsianum* em *Arabidopsis thaliana***. 2014. Dissertação (Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais), Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2014.

FREITAS, M. B.; FERREIRA, L. G.; HAWERROTH, C.; DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, M. D.; STADNIK, M. J. Ulvans induce resistance against plant pathogenic fungi independently of their sulfation degree. **Carbohydrate Polymers**, v. 133, p. 384-390, 2015.

GREEN, L. C., WAGNER, D. A., GLOGOWSKI, J., SLEIPPER, P. L., TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n.1, p. 131-138, 1982.

GOELDNER, I; SKARE, T. L.; REASON, I. T. M.; UTIYAMA, S. R. R. Artrite reumatoide: uma visão atual. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica Laboratorial**, v. 47, nº 5, p. 459-503, 2011.

KAEFFER, B.; BÉNARD, C.; LAHAYE, M.; BLOTTIÈRE, H.; CHERBUT, C. Biological Properties of Ulvan, a New Source of Green Seaweed Sulfated Polysaccharides, on Cultured Normal and Cancerous Colonic Epithelial Cells. **Planta Medica**, v.65, p. 527-531, 1999.

HASSAN, S.; EL-TWAB, S. A.; HETTA, M.; MAHMOUD, B. Improvement of lipid profile and antioxidant of hypercholesterolemic albino rats by polysaccharides extracted from the green alga *Ulva lactuca* Linnaeus. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 18, p. 333-340, 2011.

HE, J.; XU, Y.; CHEN, H.; SUN, P. Extraction, Structural Characterization, and Potential Antioxidant Activity of the Polysaccharides from Four Seaweeds. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, 2016.

HERKER, E.; OTT, M. Emerging Role of Lipid Droplets in Host/Pathogen Interactions. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, 2012.

KOLSI, R. B. A.; JARDAK, N.; HAJKACEM, F., CHAABEN, R.; JRIBI, I.; FEKI, A. E.; REBAI, T.; JAMOSSI, K.; FKI, L.; BELGHITH, H.; BELGHITH, K. Anti-obesity effect and protection of liver-kidney functions by *Codium fragile* sulphated polysaccharide on high fat diet induced obese rats. **Internacional Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 119-129, 2017.

KOPEL, M.; HELBERT, W.; BELNIK, Y.; BURAVENKOV, V.; HERMAN, A.; BANIN, E. New Family of Ulvan Lyases Identified in Three Isolates from the Alteromonadales Order. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 11, p. 5871–5878, 2016.

KIM, J. K.; CHO, M. L.; KARNJANAPRATUM, S., SHIN, I. S., YOU, S. G. *In vitro* and *in vivo* immunomodulatory activity of sulfated polysaccharides from *Enteromorpha prolifera*. **Internacional Journal of Biological Macromolecules**, v. 49, n. 5, p. 1051 – 1058, 2011.

KUMAR, S.; SINGH, R. K.; BHARDWAJ, T. R. Therapeutic role of nitric oxide as emerging molecule. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 85, p. 182-201, 2017.

LAHAYE, M.; INIZAN, F.; VIGOUROUX, J. NMR analysis of the chemical structure of ulvan and of ulvan-boron complex formation. **Carbohydrate Polymers**, v. 36, p. 239-249, 1998.

LAHAYE, M.; CIMADEVILLA, A. E.; KUHLENKAMP, R.; QUEMENER, B.; LOGNONÉ, V.; DION, P. Chemical composition and ¹³C NMR spectroscopic characterisation of ulvans from *Ulva* (Ulvales, Chlorophyta). **Journal of Applied Phycology**, v. 11, p. 1–7, 1999.

LAHAYE, M.; ROBIC, A. Structure and Functional Properties of Ulvan, a Polysaccharide from Green Seaweeds. **Biomacromolecules**, v.8, n.6, 2007.

LANDSKRON, G.; FUENTE, M. D. L.; THUWAJIT, P.; THUWAJIT, C.; HERMOSO, M. A. Chronic Inflammation and Cytokines in the Tumor Microenvironment. **Journal of Immunology Research**, v. 2014, 2014.

LI, B.; LU, F.; WEI, X.; ZHAO, R. Fucoidan: structure and bioactivity. **Molecules**, v. 13, 2008.

- LI, S.; LI, J.; ZHI, Z.; WEI, C.; WANG, W.; DING, T.; YE, X.; HU, Y.; LINHARDT, R. J.; CHEN, S. Macromolecular properties and hypolipidemic effects of four sulfated polysaccharides from sea cucumbers. **Carbohydrate Polymers**, v. 173, p. 330-337, 2017.
- LUBRANO, E.; MESINA, F.; CAPORALI, R. Clinical remission in rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis. **Clinical and Experimental Rheumatology**, 2018.
- MEDEIROS, V. P.; QUEIROZ, K. C. S.; CARDOSO, M. L.; MONTEIRO, G. R. G.; OLIVEIRA, F. W.; CHAVANTE, S. F.; GUIMARAES, L. A.; ROCHA, H. A. O.; LEITE, E. L. Sulfated Galactofucan from *Lobophora variegata*: Anticoagulant and Anti-inflammatory Properties. **Biochemistry (Moscow)**, v. 73, n. 9, p. 1018-1024, 2008.
- MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, 2008.
- MEYER, P. W.; ANDERSON, R.; KER, J. A.; ALLY, M. T. M. Rheumatoid arthritis and risk of cardiovascular disease. **Cardiovascular Journal of África**, v. 29, 2018.
- MOLTENI, M.; GEMMA, S.; ROSSETTI, C. The Role of Toll-Like Receptor 4 in Infectious and Noninfectious Inflammation. **Mediators of Inflammation**, 2016.
- MORO-GARCÍA, M. A.; MAYO, J. C.; SAINZ, R. M.; ALONSO-ARIAS, R. Influence of inflammation in the process of T lymphocyte differentiation: Proliferative, metabolic and oxidative changes. **Frontier in Immunology**, v. 9, 2018.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
- MURPHY, D. J. The dynamic roles of intracellular lipid droplets: from archaea to mammals. **Protoplasma**, 2011.
- NARDO, D. DE. Toll-like receptors: Activation, signalling and transcriptional modulation. **Cytokine**, v. 74, p. 181-189, 2015.
- PACHECO, P.; BOZZA, F. A.; GOMES, R. N.; BOZZA, M.; WELLER, P. F.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; BOZZA, P. T. Lipopolysaccharide-Induced Leukocyte Lipid Body Formation *In Vivo*: Innate Immunity Elicited Intracellular Loci Involved in Eicosanoid Metabolism. **The Journal of Immunology**, v. 169, 2002.
- PANDAY, A.; INDA, M. E.; BAGAM, P.; SAHOO, M. K.; OSORIO, D.; BATRA, S. Transcription factor NF- κ B: An update on intervention strategies. **Arch. Immunol.**, v. 64, p. 463-483, 2016.
- PANGESTUTI, R.; KURNIANTO, D. **Green seaweeds-derived polysaccharides ulvan**: Occurrence, Medicinal Value and potential application. Estados Unidos: Elsevier, 2017.
- PARK, I.; LEE, S.; KIM, S.; NGO, D.; JEON, Y.; KIM, M. Effects of Seaweeds on Matrix Metalloproteinases Derived from Normal Human Dermal Fibroblasts and Human Fibrosarcoma Cells. **Journal of Life Science**, v. 21, n. 11, 2011. PARKS, W. C.; WILSON, C.

L.; LÓPEZ-BOADO, Y. S. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. **Nature Reviews**, v. 4, 2004.

PÉREZ-RECALDE, M.; MATULEWICZ, M. C.; PUJOL, C. A.; CARLUCCI, M. J. In vitro and in vivo immunomodulatory activity of sulfated polysaccharides from red seaweed *Nemalion helminthoides*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 63, p. 38-42, 2014.

PIRES, C. L. **Avaliação dos efeitos dos polissacarídeos sulfatados de macroalgas marinhas sobre a fosfolipase A2 de *Crotalus durissus terrificus***. 2013. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada), Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2013.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. **Farmacologia**, 6^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

REIS, S. E. **Polissacarídeos sulfatados da alga verde *Ulva lactuca* L.: caracterização química parcial e análise das atividades anticoagulante, antitrombótica e anti-inflamatória**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, 2016.

SAIRENJI, T.; COLLINS, K. L.; EVANS, D. V. An Update on Inflammatory Bowel Disease, **Prim Care Clin Office Pract**, v. 44, p. 673–692, 2017.

SASSAKI, G. L.; SOUZA, L. M.; SERRATO, R. V.; CIPRIANI, T. R.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Application of acetate derivatives for gas chromatography–mass spectrometry: Novel approaches on carbohydrates, lipids and amino acids analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1208, p. 215-222, 2008.

SATHIVEL, A.; RAGHAVENDRAN, H. R. B.; SRINIVASAN, P.; DEVAKI, T. Anti-peroxidative and anti-hyperlipidemic nature of *Ulva lactuca* crude polysaccharide on D-Galactosamine induced hepatitis in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 3262-3267, 2008.

SOUFLI, I.; TOUMI, R.; RAFA, H.; TOUIL-BOUKOFFA. Overview of cytokines and nitric oxide involvement in immune-pathogenesis of inflammatory bowel diseases. **World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics**, v.7, n. 3, p. 353-360, 2016.

SUBASH, A.; VEERARAGHAVAN, G.; SALI, V. K.; BHARDWAJ, M.; VASANTHI, H. R. Attenuation of inflammation by marine algae *Turbinaria ornata* incotton pellet induced granuloma mediated by fucoidan like sulphated polysaccharide. **Carbohydrate polymers**, v. 151, p. 1261-1268, 2016.

REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M.R.; CORREA, J.B.C. Determinação espectrofotométrica de taninos pelo reativo fosfotúngstico-fosfomolibdico. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v.24, 1981.

ROBENEK, H.; HOFNAGEL, O.; BUERS, I.; ROBENEK, M. J.; TROYER, D.; SEVERS, N. J. Adipophilin-enriched domains in the ER membrane are sites of lipid droplets biogenesis. **Journal of cell science**, v. 119, p. 4215-4224, 2006.

TIAN, H.; YIN, X.; ZENG, Q.; ZHU, L.; CHEN, J. Isolation, structure, and surfactant properties of polysaccharides from *Ulva lactuca* L. from South China Sea. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 79, 2015.

THANH, T. T. T.; QUACH, T. M. T.; NGUYEN, T. N.; LUONG, D. V.; BUI, M. L., TRAN, T. T. V. Structure and cytotoxic activity of ulvan extracted from green seaweed *Ulva lactuca*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93, p. 695-702, 2016.

THIAM, A. R.; FARESE JR, R. V.; WALTHER, T. C. The biophysics and cell biology of lipid droplets. **Nature Reviews**, 2013.

TURNER, M. D.; NEDJAI, B., HURST, T.; PENNINGTON, D. J. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signaling and inflammatory disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1843, p. 2563 – 2582, 2014.

WANG, J.; SI, Y.; WU, C.; SUN, L.; MA, Y.; GE, A.; LI, B. Lipopolysaccharide promotes lipid accumulation in human adventitial fibroblasts via TLR4-NF- κ B pathway. **Lipids in Health and Disease**, v. 11, 2012.

WANG, J.; LIU, Y.; XIAO, L.; ZHU, L.; WANG, Q.; YAN, T. Anti-inflammatory effects of apigenin in lipopolysaccharide-induced inflammatory in acute lung injury by suppressing COX-2 and NF- κ B pathway. **Inflammation**, v. 37, n. 6, p. 2085-2090, 2014.

WIJESEKARA, I.; PANGESTUTI, R.; KIM, S. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 14-21, 2011.

WIDYANINGSIH, W.; PRAMONO, S.; ZULAELA; SUGIYANTO; WIDYARINI, S. Protection by Ethanolic Extract from *Ulva lactuca* L. against Acute Myocardial Infarction: Antioxidant and Antiapoptotic Activities. **Malays Journal of Medical Science**, v. 24(6), p. 39–49, 2010.

YANG, Y.; ROSENBERG, G. A. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets for stroke. **Brain Research**, v. 1623, 2015.

YAICH, H.; GARNA, H.; BCHIR, B.; BESBES, S.; PAQUOT, M.; RICHEL, A.; BLECKER, C.; ATTIA, H. Chemical composition and functional properties of dietary fibre extracted by Englyst and Prosky methods from the alga *Ulva lactuca* collected in Tunisia. **Algal Research**, v. 9, p. 65 - 73, 2015.

YAICH, H.; BENAMIRA, A.; ABBES, F.; BOUAZIZ, M.; BESBES, S.; RICHEL, A.; ATTIA, H.; GARNA, H. Effect of extraction procedures on structural, thermal and antioxidant properties of ulvan from *Ulva lactuca* collected in Monastir coast. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, p. 1430-1439, 2017.

YI, Y. S. Role of inflammasomes in inflammatory autoimmune rheumatic diseases. **Korean J Physiol Pharmacol**, v. 22(1), p. 1-15, 2018.

ZHANG, Z.; WANG, F.; WANG, X.; LIU, X.; HOU, Y.; ZHANG, Q. Extraction of the polysaccharides from five algae and their potential antioxidant activity in vitro. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, 2010.

ZHANG, Q.; LENARDO, M. J.; BALTIMORE, D. 30 Years of NF- κ B: A Blossoming of Relevance to Human Pathobiology. **Cell**, v. 168, p. 37-57, 2017.

ZHU, C.; ZHANG, S.; SONG, C.; ZHANG, Y.; LING, Q.; HOFFMANN, P. R.; LI, J.; CHEN, T.; ZHENG, W.; HUANG, Z. Selenium nanoparticles decorated with *Ulva lactuca* polysaccharide potentially attenuate colitis by inhibiting NF- κ B mediated hyper inflammation. **Journal of Nanobiotechnology**, 2017.