



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

VITÓRIA VIRGÍNIA MAGALHÃES SOARES

**ESTRUTURA E MECANISMO MOLECULAR ENVOLVIDO NO EFEITO ANTI-
INFLAMATÓRIO DE UMA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA SULFATADA DE**
Gracilaria birdiae

FORTALEZA

2020

VITÓRIA VIRGÍNIA MAGALHÃES SOARES

ESTRUTURA E MECANISMO MOLECULAR ENVOLVIDO NO EFEITO ANTI-
INFLAMATÓRIO DE UMA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA SULFATADA DE *Gracilaria*
birdiae

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientadora: Profa. Dra. Norma Maria Barros Benevides

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S657e Soares, Vitória Virgínia Magalhães.
Estrutura e mecanismo molecular envolvido no efeito anti-inflamatório de uma fração polissacarídica sulfatada de *Gracilaria birdiae* / Vitória Virgínia Magalhães Soares. – 2020.
107 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2020.
Orientação: Profa. Dra. Norma Maria Barros Benevides.
1. Macroalga Vermelha. 2. Agarana Sulfatada. 3. Inflamação. 4. Estresse Oxidativo. 5. Via fator nuclear kB. I. Título.

CDD 572

VITÓRIA VIRGÍNIA MAGALHÃES SOARES

ESTRUTURA E MECANISMO MOLECULAR ENVOLVIDO NO EFEITO ANTI-
INFLAMATÓRIO DE UMA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA SULFATADA DE *Gracilaria*
birdiae

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Aprovada em: 27 de janeiro de 2020.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Norma Maria Barros Benevides (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Ticiano Monteiro Abreu
Centro Universitário da Grande Fortaleza (UNIGRANDE)

Profa. Dra. Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Profa. Dra. Deysi Viviana Tenazoa Wong
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Aos meus pais, Fabiano e Vilani.

A minha irmã Waleska.

AGRADECIMENTOS

Finalizada essa etapa da minha vida, não poderia deixar de expressar o mais profundo agradecimento a todos aqueles que me apoiaram nesta caminhada e contribuíram para a realização deste trabalho.

Em primeiro lugar agradeço a Deus, Aquele que tornou tudo possível, me deu forças e fortaleceu minha fé em todos os momentos da minha vida.

À minha família, principalmente aos meus pais, Maria Vilani e José Fabiano e à minha irmã Waleska Virgínia, por serem minha base e que com todo carinho, dedicação, amor e compreensão me deram forças e incentivo para realizar meus sonhos.

À Profa. Dra. Norma Maria Barros Benevides, minha orientadora, pela oportunidade, suporte, orientação e confiança durante a realização deste trabalho.

À Chistiane Oliveira, pelo apoio inicial durante a realização dos experimentos de inflamação.

À Annyta Fernandes Frota, companheira de longas datas, pela amizade, companheirismo e apoio técnico e emocional. Obrigada por toda a ajuda durante a realização de todas as etapas desse trabalho.

À Natássia Ribeiro e Renata Rivanor pela amizade, apoio e auxílio durante a realização de alguns experimentos de edema de pata.

Ao Rogênio Mendes pela ajuda nos experimentos e na análise de dados da espectroscopia de infravermelho (FT-IR).

À professora Nágila Ricardo e ao Rafael Almeida, do Laboratório de Polímeros e Inovação de Materiais (LABPIM), pela realização das análises de cromatografia de permeação em gel (GPC).

Ao prof. Dr. Guilherme Zocolo e à Lorena Silva, do Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais (Embrapa Agroindústria Topical), pelas contribuições nos experimentos de ressonância magnética nuclear (RMN).

Aos professores Benildo Cavada e Kyria Nascimento, por terem cedido o Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (BioMol-Lab) para a realização dos

experimentos de PCR em tempo real. E um agradecimento especial à amiga Gleiciane Queiroz, pela amizade e por todo apoio concedido para que tenha sido possível a realização dessa análise.

Aos amigos e estudantes de iniciação científica do Laboratório de Carboidratos e Lectinas (CarboLec), que me auxiliaram durante o desenvolvimento dos experimentos laboratoriais, muito obrigada! Pedro Nonato, Helayne Gomes, Ramon, Luzia, Larissa, Andressa, Ariel Mesquita e João Victor. Parte de vocês está nesse trabalho.

Aos colegas do CarboLec, pelo convívio, amizade e pelo conhecimento que adquiri durante estes quatro anos em Fortaleza. Anderson Gomes, Neto Silva, Cirlânio Albuquerque, Edna Cordeiro, Renato Andrade, Natássia Ribeiro, Renata Rivanor, Acrísio Bastos, Ticiania Lima, Ticiania Abreu, Felipe Barros, George Meredite, Valdécio Monteiro e Gerardo Carneiro.

Aos colegas e professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, pelo convívio e troca de conhecimentos.

Ao meu amigo e companheiro João Garcia Alves Filho, por todo apoio e disponibilidade para a realização deste trabalho, além de amizade, carinho e dedicação.

Aos membros da banca examinadora, professores Renato Moreira, Ana Cristina Moreira, Deysi Wong e Ticiania Abreu pelas contribuições ao trabalho.

À Associação dos Produtores de Algas de Flecheiras e Guajiru (APAFG), pela parceria e fornecimento das algas para a realização deste trabalho.

À CAPES pela bolsa concedida - "O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001."

À Universidade Federal do Ceará, por contribuir na minha formação profissional.

Aos ratinhos, que mesmo sem escolha, sacrificaram suas vidas para que esta pesquisa fosse realizada.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original.”
(Albert Einstein)

RESUMO

As algas marinhas são fontes de compostos bioativos e vêm despertando interesse devido às suas aplicações cosmeceúticas, nutracêuticas, biotecnológicas e farmacológicas. Dentre esses compostos, destacam-se os polissacarídeos sulfatados (PS), os quais possuem propriedades anticoagulante, antioxidante, antiviral, atuam na neuroproteção e como agentes anti-inflamatórios. O PS da alga marinha *Gracilaria birdiae* possui efeito anti-inflamatório. No entanto, seus mecanismos não foram elucidados claramente. Assim, os objetivos deste estudo foi caracterizar uma fração polissacarídica sulfatada de *G. birdiae* (FI-Gb) avaliando os mecanismos envolvidos no seu efeito anti-inflamatório. Inicialmente, os polissacarídeos sulfatados totais (PST) foram extraídos na presença de papaína, fracionados por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose e a fração obtida teve sua estrutura caracterizada por métodos espectroscópicos. Para a avaliação do efeito anti-inflamatório de FI-Gb e de seu mecanismo de ação, foram realizados ensaios de edema de pata induzidos por agentes inflamatórios. O estresse oxidativo foi avaliado pela determinação do conteúdo de nitrito/nitrato, níveis de peroxidação lipídica e produção de glutathiona reduzida (GSH). Além disso, a interação de FI-Gb com E-selectina foi verificada por meio de docagem molecular. Os níveis de expressão de genes envolvidos no processo inflamatório (TNF- α , IL-1 β , IL-6, COX-2, iNOS, HO-1, IL-10 e NF- κ B) foram analisados por qPCR. Os resultados revelaram que FI-Gb é constituída principalmente por unidades repetitivas de β -D-galactopiranosose-4-sulfato-(1 \rightarrow 4)-3,6-anidro- α -L-galactopiranosose, apresentando massa molar estimada em 189.5 kDa. O pré-tratamento com FI-Gb, na dose de 5 mg/Kg, inibiu o edema de pata induzido por carragenana, dextrana, histamina, serotonina, composto 48/80 e L-arginina, em 76,1%, 34%, 33,6%, 15%, 28% e 65,4%, respectivamente. Por outro lado, FI-Gb não reduziu o edema induzido por bradicinina. A docagem molecular indicou que FI-Gb pode interagir com a E-selectina, reduzindo a migração leucocitária para o foco inflamatório. Em adição, parâmetros bioquímicos revelaram que FI-Gb reduziu a produção de NO e MDA e aumentou os níveis de GSH. Por fim, FI-Gb diminuiu a expressão gênica de citocinas e mediadores pró-inflamatórios (TNF- α , IL-1 β , IL-6, iNOS, COX-2 e NF- κ B) e aumentou a expressão de genes anti-inflamatórios (IL-10 e HO-1). Desta forma, FI-Gb possui efeito anti-inflamatório e pode atuar em múltiplos alvos nas vias da resposta inflamatória.

Palavras-chave: Macroalga Vermelha. Agarana Sulfatada. Inflamação. Estresse Oxidativo. Via fator nuclear κ B.

ABSTRACT

Seaweeds are sources of bioactive compounds and has attracted interest due to their cosmeceutical, nutraceutical, biotechnological and pharmacological applications. Among these compounds, we can emphasize the sulfated polysaccharides (SP), which have anticoagulant, antioxidant, antiviral properties, act on neuroprotection and as anti-inflammatory agents. The SP from alga *Gracilaria birdiae* has shown anti-inflammatory activity, but its mechanism has not been elucidated clearly. Thus, this study aims to characterize a sulfated polysaccharide fraction of *G. birdiae* (Gb-FI) and to evaluate the molecular mechanisms involved in its anti-inflammatory effect. Initially, the total sulfated polysaccharides (TSP) were extracted in the presence of the papain, fractionated by ion exchange chromatography with DEAE-cellulose column and the fraction obtained was characterized by spectroscopic methods. To determine the anti-inflammatory effect of Gb-FI and its mechanism, were performed paw edema assays induced by various inflammatory agents. To evaluate the oxidative stress, biochemical dosages were performed, such as determination of nitrite/nitrate content, lipid peroxidation levels and reduced glutathione (GSH) production. Besides that, the interaction of Gb-FI with E-selectin was verified by molecular docking. The levels of genes expression involved in the inflammatory process (TNF- α , IL-1 β , IL-6, COX-2, iNOS, HO-1, IL-10 and NF- κ B) were analyzed by qPCR. The results revealed that Gb-FI is formed mainly of repeating units β -D-galactopyranose-4-sulfate- (1 \rightarrow 4)-3,6-anhydro- α -L-galactopyranose, with molar mass of 189.5 kDa. Pretreatment with Gb-FI, at the dose of 5 mg/Kg, inhibited the rat paw edema induced by carrageenan, dextran, histamine, serotonin, compound 48/80 and L-arginine, in 76.1%, 34%, 33.6%, 15%, 28% and 65.4%, respectively. Differently, FI-Gb was not reduced bradykinin-induced edema. Molecular docking indicated that Gb-FI may interact with E-selectin, reducing the leukocyte recruitment to the inflammatory focus. In addition, biochemical parameters revealed that Gb-FI decreased the production of nitric oxide and malondialdehyde and increased the GSH levels. Finally, Gb-FI downregulated proinflammatory cytokines and mediators (TNF- α , IL-1 β , IL-6, iNOS, COX-2 e NF- κ B) and upregulated anti-inflammatory genes (IL-10 and HO-1), compared with carrageenan group. Thus, Gb-FI has anti-inflammatory effect and can act on multiple targets in the inflammatory response pathways.

Keywords: Red algae. Sulfated agaran. Inflammation. Oxidative stress. NF- κ B pathway.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Estrutura química básica repetitiva de carragenanas.....	22
Figura 2 -	Estrutura química básica repetitiva de agaranas.....	22
Figura 3 -	Via da biossíntese do ágar em algas marinhas vermelhas.....	24
Figura 4 -	Migração dos leucócitos da corrente sanguínea para o tecido lesado.....	28
Figura 5 -	Biossíntese dos principais mediadores inflamatórios vasoativos.....	29
Figura 6 -	Biossíntese de eicosanóides.....	30
Figura 7 -	Via de sinalização do NF- κ B.....	33
Figura 8 -	Alga marinha vermelha <i>Gracilaria birdiae</i>	40
Figura 9 -	Esquema da extração dos polissacarídeos sulfatados totais da alga marinha <i>Gracilaria birdiae</i>	42
Figura 10 -	Linha do tempo do ensaio de edema de pata induzido por carragenana.....	46
Figura 11 -	Mecanismo de reação que ocorre durante o método de Griess.....	47
Figura 12 -	Reação entre o ácido tiobarbitúrico e os produtos da decomposição dos hidroperóxidos.....	48
Figura 13 -	Reação entre a glutatona reduzida e DTNB (reagente de Ellman) para a determinação de hidroperóxidos.....	49
Figura 14 -	Linha do tempo do ensaio de edema de pata induzido por diferentes mediadores pró-inflamatórios.....	50
Figura 15 -	Linha do tempo do ensaio de permeabilidade vascular através da quantificação do azul de Evans.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Descrição da sequência dos <i>primers</i> utilizados na qPCR.....	53
------------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

¹³ C	Carbono-13 (isótopo do carbono)
¹ H	Prótio (Isótopo do hidrogênio)
5-HT	5-hidroxitriptamina (serotonina)
5-HTP	5-hidroxitriptofano
AA	Ácido araquidônico
ADM	Azul de 1,9-dimetilmetileno
AIES	Anti-inflamatórios esteroidais
AINES	Anti-inflamatórios não-esteroidais
AP-1	Proteína ativadora-1
Arg	Arginina
BK	Bradicinina
BR ₁	Receptor de bradicinina tipo 1
BR ₂	Receptor de bradicinina tipo 2
BSA	Albumina sérica bovina
CCP	Cloreto de cetilpiridínio
cDNA	DNA complementar
Cg	Carragenana
COX	Cicloxigenase
COX-1	Cicloxigenase-1
COX-2	Cicloxigenase-2
Ct	<i>Cycle threshold</i>
DEAE-celulose	Dietilaminoetil-Celulose
DEPC	Dietilpirocarbonato
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FI-Gb	Fração I polissacarídica sulfatada de <i>G. birdiae</i>
FII-Gb	Fração II polissacarídica sulfatada de <i>G. birdiae</i>
FT-IR	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
GDP-L-galactose	Guanosina difosfato L-galactose

GPC	Cromatografia de Permeação em Gel
GSH	Glutathiona Reduzida
GSSG	Glutathiona oxidada
GTs	Galactosiltransferases
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
HDC	L-histidina descarboxilase
HO/HO-1	Heme oxigenase/ heme oxigenase-1
HSQC	Correlação Heteronuclear Única Quântica, do inglês <i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
i.pl.	Via intraplantar
i.v.	Via intravenosa
ICAM-1	Molécula-1 de adesão intercelular
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-10	Interleucina-10
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
I κ B	Inibidor <i>kappa</i> B
KBr	Brometo de potássio
kN	kilonewton
L- NAME	N(ω)-nitro-L-arginina metil éster
LOX	Lipoxigenase
MDA	Malondialdeído
MHz	Megahertz
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NaNO ₂	Nitrito de sódio
NCBI	Centro Nacional de Informação Biotecnológica, do inglês <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NEED	Dicloridrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina
NF- κ B	Fator nuclear <i>kappa</i> B
NOS	Óxido nítrico sintase

O ₂ ⁻	Íon superóxido
PAF	Fator de ativação plaquetária
PBS	Tampão fosfato salino
PDB	Banco de Dados de Proteínas, do inglês <i>Protein Data Bank</i>
PGE2	Prostaglandina E2
PGs	Prostaglandinas
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
PS	Polissacarídeos Sulfatados
PS	Polissacarídeos Sulfatados Totais
PS-Gb	Polissacarídeos sulfatados totais da alga <i>Gracilaria birdiae</i>
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RMN	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
RNAase	Ribonuclease
RNA _m	RNA mensageiro
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
s.c.	Via subcutânea
SH	Sulfohidrolase
STs	Sulfotransferases
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, do inglês <i>Thiobarbituric acid reactive substances</i>
TCA	Ácido tricloroacético
TLR	Receptor Toll-Like
TNF-α	Fator de necrose tumoral-α
TPH	Triptofano hidroxilase
TSP	2,2,3,3-d4-(3-trimetilsilil)-propionato de sódio
UDP-D-galactose	Uridina difosfato D-galactose
VCAM-1	Molécula-1 de adesão celular vascular
λ-Cg	Lambda carragenana
•OH	Radical hidroxila

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	Polissacarídeos Sulfatados (PS)	18
2.2	Algas Marinhas	18
2.3	Polissacarídeos Sulfatados de Algas Marinhas	20
2.4	Biossíntese de ágar nas algas marinhas vermelhas	22
2.5	A espécie <i>Gracilaria birdiae</i>	23
2.5.1	<i>Caracterização e Atividades Biológicas de Polissacarídeos Sulfatados de G. birdiae</i>	24
2.6	Inflamação	25
2.6.1	<i>Mediadores Inflamatórios</i>	27
2.6.2	<i>Inflamação e Estresse Oxidativo</i>	30
2.6.3	<i>Via molecular da inflamação</i>	31
2.6.4	<i>Modelos experimentais da inflamação</i>	33
2.6.5	<i>Fármacos anti-inflamatórios e seus efeitos adversos</i>	34
2.6.6	<i>Efeitos dos polissacarídeos Sulfatados (PS) de algas marinhas na resposta inflamatória</i>	35
3	OBJETIVOS	37
3.1	Gerais	37
3.2	Específicos	37
4	ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL	38
5	MATERIAL E MÉTODOS	39
5.1	Coleta da Alga Marinha <i>Gracilaria birdiae</i>	39
5.2	Animais e Aspectos Éticos	39
5.3	Obtenção dos polissacarídeos sulfatados	40
5.3.1	<i>Extração de polissacarídeos sulfatados totais (PS)</i>	40
5.3.2	<i>Fracionamento do PS-Gb por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose</i>	41
5.3.3	<i>Rendimento dos Polissacarídeos Sulfatados Totais e das frações extraídas da alga <i>G. birdiae</i></i>	42
5.4	Caracterização físico-química e estrutural	42

5.4.1	<i>Determinação do teor de carboidratos totais</i>	42
5.4.2	<i>Quantificação de sulfato livre</i>	43
5.4.3	<i>Determinação de contaminantes proteicos</i>	43
5.4.4	<i>Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)</i>	43
5.4.5	<i>Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)</i>	43
5.4.6	<i>Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)</i>	43
5.4.7	<i>Estrutura molecular do polissacarídeo sulfatado de G. birdiae</i>	44
5.5	Efeito anti-inflamatório in vivo de FI-Gb	44
5.5.1	<i>Ensaio de edema de pata induzido por λ-Carragenana (λ-Cg)</i>	44
5.5.2	<i>Determinação da Concentração de Nitrito (NO₂)/Nitrato (NO₃)</i>	45
5.5.3	<i>Determinação dos Níveis de Peroxidação Lipídica (TBARS)</i>	46
5.5.4	<i>Determinação dos Níveis de Glutathiona Reduzida (GSH)</i>	47
5.5.5	<i>Edema de pata induzido por dextrana</i>	48
5.5.6	<i>Avaliação da alteração de permeabilidade vascular induzida por dextrana</i>	48
5.5.7	<i>Edema de pata induzido por diferentes mediadores inflamatórios (histamina, bradicinina, serotonina, composto 48/80 ou L-arginina)</i>	49
5.6	Análise da expressão de genes inflamatórios (TNF-α, IL-1β, IL-6, COX-2, iNOS, HO-1, IL-10 e NF-κB) no tecido subplantar de ratos submetidos ao edema induzido por Cg	50
5.6.1	<i>Coleta do tecido subplantar</i>	50
5.6.2	<i>Extração do RNA Total</i>	50
5.6.3	<i>Quantificação do RNA extraído</i>	51
5.6.4	<i>Síntese de cDNA</i>	51
5.6.5	<i>Construção dos primers</i>	51
5.6.6	<i>Análises por PCR em tempo real (qPCR)</i>	51
5.7	Docagem Molecular	53
5.8	Análises Estatísticas	53
6	ARTIGO	54
7	CONCLUSÃO	86
	REFERÊNCIAS	87

ANEXO A – CERTIDÃO DO CADASTRO DA ALGA <i>Gracilaria birdiae</i> NO SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO (SISGen)	104
ANEXO B – APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA DA UFC	105
ANEXO C - SUBMISSÃO À REVISTA CARBOHYDRATE POLYMERS	106