

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - UFMG**

**Instituto De Ciências Biológicas**

**Departamento de Bioquímica e Imunologia**

**WESLEY FERNANDES BRAGA**

**FUCOIDAN PROTEGE CONTRA A DISFUNÇÃO ENDOTELIAL E  
ATEROSCLEROSE EM CAMUNDONGOS *APOE*<sup>-/-</sup> ATRAVÉS DA  
REDUÇÃO DA INFLAMAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO**

**Belo Horizonte**

**2019**

**WESLEY FERNANDES BRAGA**

**FUCOIDAN PROTEGE CONTRA A DISFUNÇÃO ENDOTELIAL E  
ATEROSCLEROSE EM CAMUNDONGOS *APOE*<sup>-/-</sup> ATRAVÉS DA  
REDUÇÃO DA INFLAMAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Dra. Jacqueline I. Alvarez-Leite

Co-orientador: Dr. Ednil Costa Aguilar

**Belo Horizonte  
2019**

043

Braga, Wesley Fernandes.

Fucoidan protege contra a disfunção endotelial e aterosclerose em camundongos ApoE<sup>-/-</sup> através da redução da inflamação e estresse oxidativo [manuscrito] / Wesley Fernandes Braga. – 2019.

109 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Dra. Jacqueline I. Alvarez-Leite. Co-orientador: Dr. Edenil Costa Aguiar.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Doenças Cardiovasculares. 3. Aterosclerose. 4. Polissacarídeos. 5. Suplementos Nutricionais. I. Alvarez-Leite, Jacqueline Isaura. II. Aguiar, Edenil Costa. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais  
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG  
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha  
 31270-901 – Belo Horizonte – MG  
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



**ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE WESLEY FERNANDES BRAGA.**  
 Aos oito dias do mês de julho de 2019 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado ""Fucoidan protege contra a disfunção endotelial e aterosclerose em camundongos ApoE através da redução da inflamação e estresse oxidativo"", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Bioquímica. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Prof. Jacqueline Isaura Alvarez Leite, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Ana Maria Caetano de Faria (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Aristobolo Mendes da Silva (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Patrícia Torres Bozza Viola (Fiocruz-RJ), aprovado; Dr. Hugo Alexandre de Oliveira Rocha (Universidade Federal do Rio Grande do Norte), aprovado; Dr. Edenil Costa Aguilhar - Coorientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Jacqueline Isaura Alvarez Leite - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado:

- APROVADO  
 REPROVADO

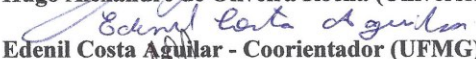
O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 08 de julho de 2019.

  
 Dr. Ana Maria Caetano de Faria (UFMG)

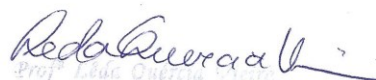
  
 Dr. Aristobolo Mendes da Silva (UFMG)

  
 Dr. Patrícia Torres Bozza Viola (Fiocruz-RJ)

  
 Dr. Hugo Alexandre de Oliveira Rocha (Universidade Federal do Rio Grande do Norte)

  
 Dr. Edenil Costa Aguilhar - Coorientador (UFMG)

  
 Dr. Jacqueline Isaura Alvarez Leite - Orientadora (UFMG)

  
 Prof. Reda Queiroz  
 Coordenadora do Curso de Pós-Graduação  
 em Bioquímica e Imunologia  
 ICB-UFMG

A todos os meus familiares, amigos, colegas e professores, pela ajuda e apoio dado em todos os momentos de minha vida.

Dedico

## AGRADECIMENTOS

Neste mundo nada se conquista sem a ajuda das pessoas ao seu redor, por isso, tenho muito a agradecer. Primeiramente a Deus, pela minha vida e pelas pessoas que cruzaram o meu caminho, sem as quais, eu não teria chegado até aqui.

Aos meus dois amados professores de Bioquímica e Metabolismo, Dr. Silvio Luiz de Oliveira (da graduação) e Dr. Raimundo Vicente de Souza (do mestrado, *in memoriam*). Todos os ensinamentos que vocês me deram foram essenciais para a minha vida hoje. Obrigado por me mostrar o melhor caminho com seus exemplos e seus ensinamentos.

À minha orientadora Dra. Jacqueline I. Alvarez Leite, pela orientação e ensinamentos imprescindíveis para a realização deste trabalho, sobretudo pela atenção, paciência e dedicação. Obrigado por confiar em mim e me receber em seu laboratório. Sou muito grato a você!

Ao meu co-orientador Dr. Edenil Costa Aguilar, por todo o conhecimento transferido, pelo tempo compartilhado, pela paciência, ajuda, apoio e amizade. Você possui um coração enorme. Sou muito grato a Deus por ser você o meu co-orientador. Muito obrigado por tudo, irmão!

À Universidade Federal de Minas Gerais/UFMG e às agências financiadoras que de alguma forma viabilizaram este estudo: CNPq, CAPES e FAPEMIG.

Aos professores do departamento de Bioquímica e Imunologia, que contribuíram com a minha formação acadêmica. Aos técnicos e amigos, em especial ao Jamil Silvano, Daniela Reis e Maria Helena. Muito obrigado por toda ajuda e amizade. Parabéns pela competência de vocês.

A todos os amigos e amigas do LABiN, por toda ajuda, acolhimento e amizade fundamentais em todos esses anos. Também não poderia deixar de agradecer aos demais amigos e colegas dos laboratórios LBV, LGI, LBCM e LIB. Quero agradecer de coração toda a equipe que trabalhou comigo neste projeto e dizer que o trabalho de vocês é inspirador.

Agradeço aos meus familiares e amigos que me proporcionaram experiências de vida únicas, as quais influenciaram na percepção que tenho hoje sobre a vida. Em especial a Natália Matos, a qual agradeço de coração pelo seu companheirismo, sua paciência, seus sorrisos, suas palavras e gestos de apoio, amor e amizade em todos os momentos que passamos juntos nesse período. Sou feliz e grato porque fui abençoado com um extraordinário conjunto de pessoas únicas com quem tenho o prazer de compartilhar cada vitória que Deus me permitiu conquistar. Amo vocês!

E a todos que de alguma forma contribuíram com a realização deste sonho. Muito obrigado!

“Feliz é a pessoa que encontra sabedoria,  
aquela que adquire entendimento”.

Provérbios 3:13

“Feliz aquele que transfere o que sabe e  
aprende o que ensina”.

Cora Coralina

## RESUMO

**Introdução:** A aterosclerose é caracterizada por estresse oxidativo crônico e alterações inflamatórias no tecido vascular. As lesões endoteliais causadas pela lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDLox) desempenham um papel fundamental na gênese dessa doença. Estudos anteriores mostraram que o fucoidan, um polissacarídeo sulfatado extraído de algas marinhas, está associado a efeitos benéficos na prevenção da aterosclerose. Entretanto, o papel do fucoidan na regulação da função endotelial vascular e nos mecanismos associados ao efeito antiaterogênico ainda não está bem compreendido. **Objetivo:** Investigar o efeito do fucoidan no desenvolvimento da aterosclerose, avaliando os mecanismos moleculares envolvidos na proteção contra inflamação e estresse oxidativo endotelial. **Métodos:** Para testar o efeito antiateroscleróticos do fucoidan, camundongos com oito a dez semanas de idade, deficientes em apolipoproteína E (*ApoE*<sup>-/-</sup>) foram alimentados durante dez semanas com uma dieta rica em colesterol (DHC) ou dieta padrão (DP), com ou sem 1% de fucoidan. Ao final deste período, amostras de sangue foram coletadas para análise bioquímica e as aortas foram removidas para quantificação de lesões ateroscleróticas (coloração *en face* com Sudan IV). Nós também avaliamos a absorção e a distribuição tecidual do fucoidan, bem como interação leucócito-endotélio na veia mesentérica (por microscopia intravital), após uma administração oral de dose única de fucoidan. Para investigar o efeito do fucoidan na disfunção endotelial induzida pela LDLox, anéis da aorta torácica de camundongos e células endoteliais humanas (EA.hy926) foram pré-incubados com fucoidan (1, 5 ou 10 µg / mL), por 30 minutos, seguida de co-incubação com LDLox (50 µg / mL) por 4 horas. Após a incubação, os anéis aórticos foram utilizados para realização de estudos de reatividade vascular. As células endoteliais foram utilizadas para ensaio de viabilidade celular e adesão de monócitos, bem como para analisar a produção de citocinas, expressão de moléculas de adesão e geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). Além disso, a correlação entre o fucoidan e a via de sinalização EROs/NF-κB foi explorada. Todos os experimentos com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética e Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais, conforme o Protocolo nº 284/2016. **Análise estatística:** One-way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey foi realizado para comparar grupos, usando o software GraphPad Prism 7. Todos os dados foram apresentados como média ± SD. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas com  $p < 0,05$ . **Resultados:** O tratamento com fucoidan reduziu significativamente a área de lesão na aorta de camundongos *ApoE*<sup>-/-</sup> alimentados com dieta rica em colesterol (DHC  $7,61 \pm 1,48$  vs DHC + Fuc 1%  $4,39 \pm 1,95$ ), sem alterações entre os grupos DP. Esse resultado foi associado à diminuição dos níveis séricos de colesterol total (22%), triglicérides (35%) e frações do colesterol não-HDL (21%). Observamos que a LDLox reduziu o relaxamento induzido pela acetilcolina (ACh) na aorta, mas o tratamento com fucoidan reverteu essa disfunção. Em estudos *in vitro*, o pré-tratamento com fucoidan reduziu as respostas inflamatórias, reduzindo a adesão de monócitos à camada de células endoteliais pré-tratadas com LDLox (> 50%), bem como reduzindo a produção de mediadores pró-inflamatórios (MCP-1, IL-6 e TNF) e a expressão de moléculas de adesão (P-Selectina e VCAM). Além disso, o fucoidan atenuou a geração de EROs e reduziu a ativação da via de sinalização do NF-κB (diminuindo a fosforilação da subunidade p65). **Conclusões:** Nosso estudo demonstrou que o fucoidan reduziu a aterosclerose em camundongos *ApoE*<sup>-/-</sup>, e os mecanismos ateroprotetores estão associados à redução da inflamação e estresse oxidativo. Assim, o fucoidan possui propriedades vasoprotetoras, sugerindo possíveis efeitos terapêuticos contra as doenças cardiovasculares.

**Palavras-chave:** Polissacarídeos sulfatados; Nutracêuticos; antiaterogênico; Doença cardiovascular.



## ABSTRACT

**Introduction:** Atherosclerosis is characterized by chronic oxidative stress and inflammatory changes in the vascular tissue. Endothelial injuries caused by oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) play a key role in this disease. Previous studies have shown that fucoidan, a sulfated polysaccharide extracted from brown seaweed, is associated to beneficial effects on atherosclerosis prevention. However, the role of fucoidan in regulating vascular endothelial function and mechanisms associated to atherogenesis is not well understood. **Objective:** Investigate the effect of fucoidan in the atherosclerosis development, assessing the molecular mechanisms involved in protection against vascular cell damage: inflammation and oxidative stress. **Methods:** To test the anti-atherosclerotic effect of fucoidan, eight to ten-week-old male apolipoprotein E-deficient (*ApoE*<sup>-/-</sup>) mice were fed during ten weeks with either a high-cholesterol diet (HCD) or standard diet (SD), with or without 1% of fucoidan. At the end of this period, blood sample was collected for biochemical analysis, and aorta for *en face* quantification of atherosclerotic lesions (Sudan IV staining). We also evaluated the absorption and tissue distribution of fucoidan, as well as the leukocyte-endothelial interactions in *ApoE*<sup>-/-</sup> after a single-dose oral administration. To investigate the effect of fucoidan on endothelial dysfunction induced by oxLDL, thoracic aortic rings from wild type mice and human endothelial cells (EA.hy926) were pre-incubated with fucoidan (1, 5 or 10 µg/mL), by 30 minutes before 4 hours of coincubation with oxLDL (50 µg/mL). After incubation, the aortic rings were used to perform vascular reactivity studies. The endothelial cells were used to perform cell viability and adhesion assay, and to analyze the cytokines production, adhesion molecules expression and intracellular reactive oxygen species (ROS) generation. Further, the correlation between fucoidan and ROS/NF-κB signaling pathway was explored. All animal experiments were approved by the Federal University of Minas Gerais Animals Care and Use Committee according to the Protocol n° 284/2016. **Statistical analyses:** One-way ANOVA followed by Tukey post-test was performed to compare groups, using the GraphPad Prism 7 software. All data were presented as mean ± SD. Differences were considered statistically relevant at p<0.05. **Results:** Fucoidan treatment significantly reduced the lesion area in aorta of *ApoE*<sup>-/-</sup> mice fed on a high-cholesterol diet (HCD 7.61 ± 1.48 vs HCD + Fuc 1% 4.39 ± 1.95), without changes between SD groups. This result was associated with a decrease in serum levels of total cholesterol (22%), triglycerides (35%) and non-HDL cholesterol fractions (21%). We observed that oxLDL reduced acetylcholine (ACh)-induced vasodilation in mouse aorta, but the treatment with fucoidan reversed oxLDL-induced endothelial dysfunction. In *in vitro* studies, pretreatment with fucoidan reduced the inflammatory responses. Fucoidan reduced the oxLDL-induced monocyte adherence to endothelial cells (>50%), production of proinflammatory mediators (MCP-1, IL-6 e TNF), and the expression of adhesion molecules (P-Selectin and VCAM). In addition, fucoidan attenuated ROS generation, and reduced the NF-κB signaling pathway (decreasing NF-κB phosphorylation). **Conclusions:** Our study demonstrated that fucoidan reduced atherosclerosis in *ApoE*<sup>-/-</sup> mice suppressing oxLDL-induced vascular inflammation and oxidative stress. Thus, fucoidan has a vasoprotective property, suggesting possible therapeutic effects in atherosclerotic diseases.

**Keywords:** Sulfated polysaccharides; Nutraceuticals; anti-atherogenic; cardiovascular disease.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Atividades biológicas de fucoïdãns de diferentes espécies de algas marinhas marrons. .... 30
- Tabela 2.** Composição das dietas experimentais ofertadas durante 10 semanas aos animais.41
- Tabela 3.** Ingestão alimentar, crescimento corporal e peso relativo do baço, do fígado, do músculo e da gordura epididimal em camundongos ApoE<sup>-/-</sup> alimentados com DP ou DHC com ou sem fucoïdan durante 10 semanas. .... 57

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Papel da LDLox na disfunção endotelial.....	23
<b>Figura 2.</b> Papel da LDLox na formação de células espumosas.....	25
<b>Figura 3.</b> Estrutura química do fucoidan.....	28
<b>Figura 4.</b> Mecanismos de ação anti-inflamatório exercidos pelo fucoidan.....	35
<b>Figura 5.</b> Ações biológicas dos fucoidans que potencialmente influenciam no combate de doenças cardiovasculares ateroscleróticas (DCVA). ....	37
<b>Figura 6.</b> Efeito do fucoidan no perfil lipídico e na glicemia em camundongos ApoE <sup>-/-</sup> . ....	59
<b>Figura 7.</b> Efeito do fucoidan sob lesões ateroscleróticas na íntima da aorta em camundongos ApoE <sup>-/-</sup> .....	60
<b>Figura 8.</b> Estabilidade in vitro do <sup>99m</sup> Tc-Fuc.....	61
<b>Figura 9.</b> Cinética de absorção de <sup>99m</sup> Tc-Fuc em camundongos ApoE <sup>-/-</sup> .....	62
<b>Figura 10.</b> Imagens cintilográficas e biodistribuição do <sup>99m</sup> Tc-Fucoidan no trato gastrointestinal (TGI) e tireóide. ....	62
<b>Figura 11.</b> Perfil de biodistribuição do <sup>99m</sup> Tc-Fuc em camundongos ApoE <sup>-/-</sup> . ....	63
<b>Figura 12.</b> Avaliação do rolamento e adesão de leucócitos. ....	64
<b>Figura 13.</b> Efeito do fucoidan na adesão aumentada de THP-1 em células EA. hy926 estimuladas com LDLox. ....	66
<b>Figura 14.</b> Efeito do fucoidan na viabilidade de células EA.hy926 e THP-1 estimuladas com LDLox. ....	67
<b>Figura 15.</b> Efeito do fucoidan sobre a produção de MCP-1, IL-6 e TNF induzidos por LDLox em EA. hy926.....	68
<b>Figura 16.</b> Efeito do fucoidan na expressão de moléculas de adesão (P-selectina e VAM-1) em células EA. hy926 estimuladas com LDLox. ....	69
<b>Figura 17.</b> Efeito do fucoidan sobre o estresse oxidativo induzido por LDLox em EA. hy926. ....	71
<b>Figura 18.</b> Efeito do fucoidan na via de NF-κB em células EA. hy926 estimuladas com LDLox. ....	72
<b>Figura 19.</b> Efeito do fucoidan sobre a migração de células endoteliais EA. hy926, estimuladas com LDLox. ....	73
<b>Figura 20.</b> Efeito do fucoidan na vasodilatação induzida por ACh em aortas de camundongos ApoE <sup>-/-</sup> e C57BL/6. ....	74
<b>Figura 21.</b> Efeito do fucoidan sobre a captação de LDLox em macrófagos de ApoE <sup>-/-</sup> e RAW 264.7.....	75
<b>Figura 22.</b> Efeito do fucoidan sobre a expressão SR-A e CD36 em RAW 264.7 incubados com LDLox. ....	76
<b>Figura 23.</b> O tratamento com fucoidan diminui a formação de células espumosas mediadas por LDLox. ....	77
<b>Figura 24.</b> Hipótese sobre os mecanismos antiaterogênico do fucoidan. ....	82

## LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

99mTc-FUC	Fucoidan radiomarcado com tecnécio
99mTcO <sub>2</sub>	Tecnécio hidrolisado
99mTcO <sub>4</sub> -	Tecnécio livre
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
µg/mL	Micrograma por mililitro
µmol/g	Micromol por grama
µmol/L	Micromol por litro
µM	Micromolar
AIN-93M	American Institute of Nutrition-93 Maintain
Apo	Apoproteínas
ApoE <sup>-/-</sup>	Deficiente na apoproteína E
BHT	Hidroxitolueno butilado
°C	Grau centígrado
CCL2	Molécula quimiotática para monócito
CD36	Cluster of Differentiation
CEMEL	Centro de Microscopia Eletrônica
CETEA	Comitê de Ética de Experimentação Animal
CETP	Proteína de transferência de ésteres de colesterol
CT	Colesterol total
Cu <sup>2+</sup>	Íon cuproso
CuCl <sub>2</sub>	Cloreto de cobre
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride
DAF-FM	4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein
DCF	2',7'-dichlorofluorescein
DCFH	2,7-Dichlorodihydrofluorescein
DHC	Dieta hipercolesterolemiantes
DP	Dieta Padrão
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EA.hy926	Células endoteliais da veia umbilical humana
EDTA	Ácido etileno diamino tetraacético
ELISA	“Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”
GPR	Receptores acoplados à proteína G
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
GSSH	Glutathione oxidada
HDL-c	HDL-colesterol
HUVEC	Células endoteliais umbilicais humanas
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico
ICAM	Molécula-1 de adesão intercelular
IDL	Lipoproteínas de densidade intermediária
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
LABiN	Laboratório de Aterosclerose e Bioquímica Nutricional
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
mg/dL	Miligrama por decilitro

mg/kg	Miligramas por quilograma de peso
MDA	Malondialdeído
MCP1	Moléculas quimiotáticas para monócitos
MMP2	Metaloproteinase 2 de matriz extracelular
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NF- $\kappa$ B	Fator de transcrição nuclear- $\kappa$ B
n-HDL	Colesterol Não-HDL
nm	Nanômetro
NOS	Óxido nítrico sintase
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ânion superóxido
OH-	Radical hidroxila
ONOO-	Peroxinitrito
PBS	Salina tamponada com fosfato
PMN	Células polimorfonucleares
PPAR- $\alpha$	receptor- $\alpha$ ativado por proliferador de peroxissomas
QM	Quilomícrons
ROS	Espécies reativas de oxigênio
rpm	Rotações por minute
SOD	Superóxido dismutase
SR-A	Scavenger receptor-A
TG	Triglicerídeos
U/mg	Unidades por miligrama
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VCAM-1	Molécula-1 de adesão vascular
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa
VSMC	Células musculares lisas

# SUMÁRIO

1. Introdução.....	16
2. Revisão de Literatura.....	18
2.1    Papel da LDL oxidada na aterosclerose .....	18
2.1.1 Metabolismo lipídico e aterosclerose .....	18
2.1.2 Estresse oxidativo e oxidação da LDL.....	19
2.1.3 Disfunção endotelial.....	21
2.1.4 Formação de células espumosas.....	24
2.3    Aspectos químicos e farmacológicos do fucoidan .....	27
2.3.1 Estrutura e natureza química do fucoidan .....	27
2.3.2 Atividades biológicas do fucoidan .....	29
2.3.3 Fucoidan como alvo terapêutico em aterosclerose.....	31
3. Justificativa.....	38
4. Objetivos.....	39
4.1    Objetivo geral .....	39
4.2    Objetivos específicos .....	39
5. Material e Métodos.....	40
5.1    Animais e dietas.....	40
5.2    Desenho experimental .....	41
5.3    Dosagens dos parâmetros bioquímicos.....	42
5.4    Avaliação de lesões ateroscleróticas da aorta “ <i>en face</i> ” .....	42
5.5    Cinética de absorção e da biodistribuição do fucoidan .....	43
5.6    Avaliação do rolamento e adesão de leucócitos - Microscopia Intravital .....	45
5.7    Obtenção e oxidação da LDL .....	46
5.8    Preparo da solução estoque de fucoidan.....	47
5.9    Cultura de EA. hy926 e tratamento .....	47
5.10   Avaliação da adesão de monócitos a células endoteliais ( <i>in vitro</i> ) .....	48
5.11   Avaliação da viabilidade celular.....	48

5.12	Dosagem de citocinas no sobrenadante de células EA. hy926 por ELISA .....	49
5.13	Avaliação da expressão de moléculas de adesão de superfície .....	49
5.14	Análise cinética da produção intracelular de EROs, superóxido e óxido nítrico .....	50
5.15	Ensaio Multiplex para análise da via NF-κB.....	51
5.16	Ensaio de migração celular (EA. hy926).....	52
5.17	Reatividade vascular para análise da função endotelial .....	52
5.18	Isolamento e cultivo de macrófagos peritoneais.....	53
5.19	Avaliação da captação de LDLox em macrófagos peritoneais de camundongos.....	54
5.20	Avaliação da captação de LDLox e expressão de CD36 e SRA de superfície em RAW 264.7 .....	54
5.21	Avaliação da formação de células espumosas em RAW 264.7.....	55
5.22	Análise estatística .....	56
6.	RESULTADOS .....	56
6.1	Efeito do fucoidan sobre os parâmetros de crescimento e ingestão alimentar .....	57
6.2	Fucoidan melhora os parâmetros lipídicos séricos em camundongos <i>ApoE<sup>-/-</sup></i> .....	58
6.3	Fucoidan reduziu o desenvolvimento de placas ateroscleróticas em camundongos <i>ApoE<sup>-/-</sup></i> .....	60
6.4	Absorção do fucoidan e biodistribuição em tecidos periféricos.....	61
6.5	Fucoidan reduz o rolamento e adesão de leucócitos no endotélio vascular .....	64
6.6	Fucoidan reduz a adesão de THP-1 à monocamada de células endoteliais estimuladas com LDLox.....	65
6.7	Fucoidan não afeta a viabilidade das células EA. hy926 e THP-1 .....	67
6.8	Fucoidan diminui a resposta inflamatória em EA. hy926 estimuladas com LDLox. 68	
6.9	Fucoidan diminui o estresse oxidativo em EA. hy926 estimuladas com LDLox.....	70
6.10	Fucoidan diminui a ativação de NF-κB em EA. hy926 estimulada com LDLox.....	72
6.11	Fucoidan inibe a ação anti-migratória da LDLox em células EA. hy926 .....	73
6.12	Fucoidan atenua a disfunção endotelial em aortas de C57BL/6 e <i>ApoE<sup>-/-</sup></i> .....	74
6.13	Fucoidan diminui a captação de LDLox, via SRA, por macrófagos.....	75

6.14	Fucoidan diminui a formação de células espumosas em RAW 264.7.....	77
7.	Discussão.....	78
8.	Hipótese final.....	82
9.	Considerações finais.....	83
10.	Conclusão.....	83
11.	Referências.....	84
	Anexos.....	102



## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, embora as pesquisas básicas e clínicas tenham feito grandes progressos, houve um aumento considerável na incidência de morbidade e mortalidade ligadas a doenças cardiovasculares (DCV) (WHO, 2015). Em um relatório divulgado recentemente, estima-se que às DCV são responsáveis por mais de 30% de todas as mortes globais e espera-se que esse número aumente nos próximos anos, devido a maior incidência dos fatores de riscos, impondo assim uma carga maior aos serviços de saúde (BENJAMIN et al., 2018).

A principal causa associada ao surgimento das DCV é a aterosclerose, uma doença inflamatória crônica arterial, que leva à formação de lesões ateroscleróticas na parede dos vasos. Essas lesões podem provocar a obstrução do fluxo sanguíneo, o que pode desencadear doenças isquêmicas, tais como o infarto agudo do miocárdio e acidente vascular cerebral (BENTZON et al., 2014). Vários fatores de risco incluindo, dislipidemia, diabetes, tabagismo, estilo de vida sedentário, histórico familiar, obesidade e hipertensão podem induzir lesão endotelial que contribui para o início e progressão da aterosclerose (RAFIEIAN-KOPAEI et al., 2014)

Os mecanismos fisiopatológicos e a etiologia da aterosclerose são bastante complexos (DOUGLAS; CHANNON, 2010; FALK, 2006), entre os quais o estresse oxidativo e a inflamação desempenham um papel crítico (HANSSON, 2009; LEOPOLD; LOSCALZO, 2008). A aterosclerose é precedida por uma disfunção endotelial, que pode ser em decorrência do acúmulo de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e sua subsequente oxidação na parede arterial, gerando a LDL oxidada (LDLox) (BUCKLEY; RAMJI, 2015). As partículas de LDLox induzem uma ativação endotelial que leva a uma secreção de mediadores inflamatórios e expressão de moléculas de adesão desencadeando o recrutamento de células imunes, particularmente monócitos (GIMBRONE; GARCÍA-CARDEÑA, 2016). Na íntima, os monócitos diferenciam-se em macrófagos e captam a LDLox através de receptores *scavengers* transformando-se em células espumosas e dando início à lesão aterosclerótica. Ao longo do tempo, as células espumosas sofrem apoptose, levando à formação de um núcleo necrótico rico em lipídios associado a uma resposta inflamatória crônica (MCLAREN et al., 2011). As lesões são recobertas por uma capa fibrosa formada por matriz extracelular de colágeno produzida pelas células musculares lisas, as quais se proliferam e migram da camada média para a íntima (AMMANN et al., 2015). A capa fibrosa proporciona estabilidade à lesão, enquanto a degradação do colágeno na matriz extra celular, em decorrência da atividade de proteases em

resposta a mediadores inflamatórios, podem levar à ruptura da placa, ocasionando os subsequentes eventos trombóticos e complicações clínicas da aterosclerose (LIBBY, 2013).

Com o entendimento de que a hipercolesterolemia, o estresse oxidativo e a inflamação estão associados à etiologia da aterosclerose, a busca por terapias antiaterogênicas tem dado foco nestes fatores. Apesar do crescente número de drogas desenvolvidas para prevenção e tratamento da aterosclerose, algumas comumente usadas podem causar efeitos colaterais, sendo necessário a suspensão do uso desses medicamentos, o que aumenta o risco de eventos cardio e neurovasculares (MACH et al., 2018). Consequentemente, há uma grande necessidade clínica de terapias que possam reduzir a incidência e a progressão da doença vascular aterosclerótica além do que é possível com os tratamentos atuais. Obviamente, medicamentos anti-ateroscleróticos baseados em produtos naturais seriam uma alternativa, uma vez que em muitos casos não apresentam efeitos colaterais podendo permitir o uso ao longo da vida. Além disso, podem ter uma gama mais ampla de efeitos do que outras drogas, afetando vários fatores de risco para aterosclerose (OREKHOV et al., 2015).

Assim, alternativas para a prevenção e o tratamento da aterosclerose vem sendo amplamente estudadas, incluindo diversos nutrientes presentes em alimentos funcionais (MOSS; RAMJI, 2016; MOSS; WILLIAMS; RAMJI, 2018). Neste contexto, muito tem sido comentado sobre o fucoïdan e seus potenciais efeitos terapêuticos contra a doença vascular aterosclerótica (BRAGA; AGUILAR; ALVAREZ-LEITE, 2019; PATIL et al., 2018; ZAPOROZHETS; BESEDNOVA, 2016). Fucoïdan é um polissacarídeo sulfatado, encontrados principalmente em algas marinhas marrons, que apresenta várias atividades biológicas, incluindo efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, antidislipidêmico, antiobesidade, antialérgicos, antitumorais, anticoagulante, antiviral e dentre outros (VO; KIM, 2013). Recentemente, foi mostrado seu efeito antiaterogênico em modelo murino de aterosclerose, particularmente pela redução da dislipidemia (WANG et al., 2016; YOKOTA et al., 2016). No entanto, os mecanismos bioquímicos e imunológicos envolvidos nas ações antiaterogênicas do fucoïdan não foram totalmente esclarecidos. Assim, nos propomos a investigar o efeito nutracêutico do fucoïdan em camundongos *ApoE<sup>-/-</sup>*, animais modificados geneticamente para manifestar uma dislipidemia e desenvolverem placas ateroscleróticas, sendo usado como modelo de estudo em doenças cardiovasculares. Além disso, buscamos explorar os efeitos sobre a disfunção vascular, bem como os possíveis mecanismos moleculares associados à ação do fucoïdan, utilizando células endoteliais e macrófagos estimulados com LDLox, principal agente desencadeador da inflamação e estresse oxidativo na gênese e progressão da aterosclerose.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Papel da LDL oxidada na aterosclerose

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica da parede arterial que culmina com a formação da placa ateromatosa. É uma doença de lenta progressão, e sua evolução envolve uma combinação de fatores, entre os quais destacam-se: disfunção endotelial, extensiva deposição de lipídeos na íntima arterial, respostas imunes inata e adaptativa exacerbadas, proliferação de células musculares lisas e remodelamento de matriz extracelular, o que resulta na formação de uma placa aterosclerótica (LIBBY, 2012).

Vários estudos fornecem evidências sugerindo que alterações no metabolismo da LDL (*low-density lipoprotein*) podem resultar em uma forma oxidativa (LDLox), a qual desempenha um papel fundamental na etiologia e patogênese da aterosclerose (LEIVA et al., 2015). Tendo em vista que é um processo complexo, aqui, apenas evidenciaremos os princípios que levam o acúmulo e oxidação da LDL na parede vascular, contribuindo para a disfunção endotelial e a formação de células espumosas.

#### 2.1.1 Metabolismo lipídico e aterosclerose

Sabe-se que um fator de risco primário que predispõe à patogênese da aterosclerose é o acúmulo prolongado de lipídeos no sangue. O aumento das concentrações séricas de LDL e de triglicérides é responsável pelo surgimento de placas ateroscleróticas (ALBERTINI; MORATTI; LUCA, 2002).

A LDL é o principal transportador de colesterol no plasma sanguíneo, distribuindo-o para os tecidos periféricos, desempenhando importantes papéis fisiológicos na função celular e na regulação das vias metabólicas (PFRIEGER, 2003). Porém, condições patológicas de hiperlipidemia, hipertensão arterial, diabetes mellitus, estresse oxidativo, distúrbios genéticos, dentre outras, podem levar a uma anomalia no metabolismo desta e de outras lipoproteínas contribuindo para o surgimento e a progressão da aterosclerose (MILLER et al., 2010).

O transporte da maioria dos lipídeos no plasma sanguíneo, ocorre através de lipoproteínas de vias exógenas e endógenas. A via exógena, é a via pela qual os lipídeos da dieta são transportados do intestino para os tecidos periféricos, após os processos de digestão e absorção. Essa via começa com a síntese e secreção de quilomícrons (QM) pelo intestino. Os QM contêm apolipoproteínas (Apo) B-48, ApoC-II e ApoE que possuem papel tanto estrutural quanto

metabólico. A Apo C-II é um cofator essencial do transporte de ácidos graxos para o tecido adiposo por ativar a LPL (*lipoprotein lipase*). Após a atividade da LPL, o remanescente de quilomícron é relativamente enriquecido em colesterol devido à perda de triacilglicerol e é absorvido pelo fígado por ligação da ApoE ao receptor de LDL (BAYNES; DOMICZAK, 2015).

A via endógena é responsável pelo transporte de lipídeos sintetizados no fígado, que são exportados para os demais tecidos. Essa via começa com a síntese de VLDL (*very low-density lipoprotein*), que são ricas em triglicérides e contêm Apo B-100, ApoC-II e ApoE. Após a remoção dos triglicérides para o tecido adiposo, uma porção de remanescentes de VLDL é metabolizada em partículas de LDL que transportam ésteres de colesterol e quantidades menores de triglicérides (NGUYEN et al., 2008). As pequenas partículas de LDL penetram na barreira endotelial e se depositam na matriz extracelular dos espaços subendoteliais pela ligação da Apo B-100 aos proteoglicanos, que estão entre as moléculas mais importantes para a retenção dessas lipoproteínas (BORÉN; WILLIAMS, 2016; KHALIL; WAGNER; GOLDBERG, 2004). A retenção de partículas de LDL em regiões do endotélio vascular que são predispostas à formação de lesão é considerada o primeiro passo na patogênese da aterosclerose (FOGELSTRAND; BORÉN, 2012).

Uma vez aprisionadas na parede arterial, as partículas de LDL podem sofrer modificações oxidativas progressivas dando início a uma cascata de eventos celulares pró-inflamatórios, resultando em disfunção vascular e a formação de placa aterosclerótica ao longo do tempo (LEOPOLD; LOSCALZO, 2008). A maioria das placas permanece assintomática (doença subclínica), algumas se tornam obstrutivas (angina estável) e outras provocam trombose aguda, podendo levar ao infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral ou doença arterial periférica (BENTZON et al., 2014).

### **2.1.2 Estresse oxidativo e oxidação da LDL**

Quimicamente, o estresse oxidativo está associado a um aumento da produção de espécies oxidantes ou a uma diminuição significativa da eficácia das defesas antioxidantes, como glutatona, superóxido dismutase, catalase, peroxidases e outras. Esse desequilíbrio no meio redox pode levar a mudanças de processos fisiológicos importantes com consequências fisiopatológicas (CIRCU; AW, 2010).

A aterosclerose é uma desordem que constitui num estado de altos níveis de estresse oxidativo, sendo esse fenômeno associado à oxidação lipídica e proteica na parede vascular

(LEIVA et al., 2015). Acredita-se que os eventos envolvendo o processo de aterosclerose começam com a oxidação de LDL na íntima, devido à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) por células endoteliais e macrófagos residentes (KARIMI et al., 2013).

No processo de oxidação da LDL, as EROs inicialmente modificam ácidos graxos poli-insaturados (principalmente ácido araquidônico e ácido linoleico), os quais são convertidos em hidroperóxidos, que se quebram para formar moléculas altamente reativas, como malondialdeído e 4-hidroxinonenal entre outros produtos metabólicos. Estes aldeídos reativos reagem com resíduos de lisina da apolipoproteína B-100 alterando a carga superficial das partículas de LDL (LEVITAN; VOLKOV; SUBBAIAH, 2010). Na ausência de modificação oxidativa da apolipoproteína B-100, a LDL pode ser oxidada em outros locais, e estas formas minimamente oxidadas de LDLox ajudam no recrutamento de mediadores inflamatórios induzindo a síntese de quimiocinas (STOCKER; KEANEY JR., 2005). Foi demonstrado que a LDL quando apresenta modificações oxidativas substanciais, um grande número de neoepitopos são gerados transformando-a em uma LDL altamente imunogênica (FRIEDMAN et al., 2002).

Deve-se ressaltar que a oxidação da LDL ocorre principalmente no espaço subendotelial das artérias, em relação à circulação. Enquanto estão no plasma, as partículas de LDL estão protegidas da oxidação pela abundância de antioxidantes, como tocoferol, ascorbato, urato, apolipoproteínas e albumina sérica (LEIVA et al., 2015). Entretanto, no espaço subendotelial, a LDL é retida através da ligação de aminoácidos básicos da apolipoproteína B a grupos de sulfatos de proteoglicanos carregados negativamente presentes na matriz extracelular (BORÉN; WILLIAMS, 2016). Desta forma, a LDL perde o seu acesso a antioxidantes, e os ácidos graxos e os fosfolípidios se tornam propensos à oxidação. No entanto, quantidades pequenas, mas significativas de LDL oxidada (predominantemente a LDL minimamente modificada) são detectáveis no plasma normal, e aumentam substancialmente em vários estados de doença, incluindo doença cardíaca coronária, diabetes e doença renal (ITABE et al., 2003; TSIMIKAS, 2006).

Diversas linhas de estudos, trazem evidências que a oxidação da LDL *in vivo*, particularmente sob condições de hiperlipidemia e quando retida na parede vascular, é mediada por uma variedade de mecanismos enzimáticos, bem como não enzimáticos induzidos por EROs (MILLER et al., 2010; PODREZ; ABU-SOUD; HAZEN, 2000). As EROs intracelulares podem ser geradas por várias vias, sendo o radical ânion superóxido (um produto de redução

de um elétron de oxigênio) a principal fonte pela qual a maioria das outras EROs são derivadas. O superóxido é gerado por fontes metabólicas e enzimáticas, incluindo a respiração mitocondrial (TURRENS; BOVERIS, 1980), NAD(P)H oxidases (GRIENGLING; SORESCU; USHIO-FUKAI, 2000), xantina oxidase (JARASCH et al., 1981), ciclooxygenases e lipoxigenases (ROMANO; CLARIA, 2003), e pela óxido nítrico sintase desacoplada quando seu substrato ou cofatores estão deficientes (VÁSQUEZ-VIVAR et al., 1998). Uma vez formados, os radicais superóxidos são livres para reagir com outras espécies que contêm elétrons não emparelhados, como o óxido nítrico, ou com compostos não radicais, como cadeias laterais de lipídios e proteínas no ambiente local. Desta forma, são formadas outras espécies reativas com relevância fisiopatológica para a patogênese da aterosclerose, tais como radicais hidroxilos, peróxidos lipídico e de hidrogênio e peroxinitrito (MADAMANCHI; VENDROV; RUNGE, 2005).

Nos ensaios *in vitro*, um modelo de LDL oxidada muito utilizado, é o de LDL submetida à incubação prolongada com sulfato de cobre (STEINBRECHER et al., 1984). Este tipo de ataque oxidativo catalisado por  $\text{Cu}^{2+}$  nos ácidos graxos poli-insaturados presentes em fosfolipídios pode levar à oxidação de 40% da fosfatidilcolina (ESTERBAUER et al., 1987). A apolipoproteína B também sofre alterações drásticas, em parte pelo ataque oxidativo direto e parcialmente pela conjugação de fragmentos lipídicos oxidados com a proteína. A oxidação não enzimática catalisada por  $\text{Cu}^{2+}$  depende da presença de hidroperóxidos lipídicos na LDL isolada. Na presença de  $\text{Cu}^{2+}$  estes hidroperóxidos se decompõem para formar radicais peroxi e alcoxi, que por sua vez podem iniciar reações em cadeia que geram muitos outros hidroperóxidos (ESTERBAUER et al., 1992).

Assim, as modificações oxidativas que acontecem na LDL, principalmente quando se encontram retidas na parede vascular, seriam um dos fatores cruciais que podem levar ao início de uma cascata de eventos celulares pró-inflamatórios resultando em disfunção vascular e consequente formação da placa aterosclerótica (LEOPOLD; LOSCALZO, 2008).

### **2.1.3 Disfunção endotelial**

A disfunção endotelial é caracterizada como uma condição patológica em que as propriedades-chaves envolvidas na regulação da homeostase vascular no endotélio estão comprometidas. Propriedades como anti-inflamatórias, anticoagulantes e regulação do tônus-vascular são afetadas principalmente devido à influência da maioria dos fatores de risco cardiovascular (LEIVA et al., 2015). Sob o status de tabagismo, hipertensão, hiperglicemia e

hiperlipidemia, a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) aumenta e supera a resposta antioxidante endógena, levando a oxidação da LDL e prejudicando a função endotelial (BLOOMER, 2007; FROSTEGÅRD et al., 2003; ZHOU et al., 2013).

A alteração na função endotelial é considerada um evento inicial crítico no desenvolvimento da aterosclerose e têm como principal ativador a LDLox formada e retida no espaço subendotelial (CYBULSKY; GIMBRONE, 1991). O aumento da produção de EROs induzido pela LDLox contribui para uma disfunção do equilíbrio do tônus-vascular, por prejudicar a expressão e função da eNOS (*endothelial NO synthase*), diminuindo a produção de NO (*nitric oxide*) pelas células endoteliais (STEYERS et al., 2014). O NO é gerado pela eNOS a partir da conversão de L-arginina em L-citrulina nas células endoteliais. O comprometimento da produção e secreção de NO é considerado uma das características mais importantes da disfunção endotelial (FÖRSTERMANN, 2010), uma vez que o NO exerce propriedades vasodilatadoras e inibe a adesão de leucócitos e plaquetas ao endotélio. Sendo assim, o NO é reconhecido como uma importante molécula protetora cardiovascular (WANG et al., 2017).

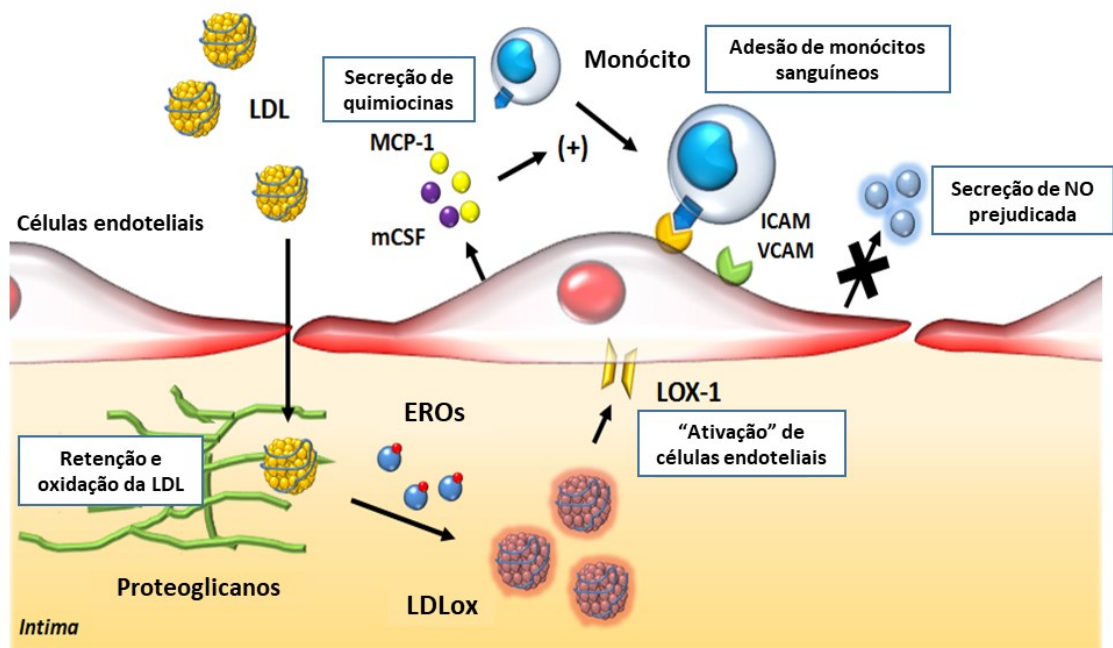
A produção e biodisponibilidade de NO pelas células endoteliais pode ser prejudicada pela ação das EROs. Foi demonstrado que a LDLox induz a produção significativas de superóxido, que inativa quimicamente o NO, formando peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>). O ONOO<sup>-</sup> resultante não só oxida DNA, proteínas e lipídios, mas também interfere com importantes vias de sinalização vascular (COMINACINI et al., 2001). Assim, o aumento de EROs induzido pela LDLox, reduzem a biodisponibilidade do NO, levando a disfunção endotelial.

Além do comprometimento da vasodilatação dependente do endotélio, a disfunção endotelial também compreende um estado de ativação endotelial, que se caracteriza por um *status* pró-inflamatório que favorece a aterogênese. A ativação endotelial causada por LDLox induz a expressão de moléculas de adesão e citocinas pró-inflamatórias, as quais interagem com leucócitos e plaquetas circulantes, desencadeando mecanismos inflamatórios direcionados ao local de formação da lesão (HANSSON, 2005; KITA et al., 1999).

Foi demonstrado que a LDLox induz a expressão de ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*), VCAM-1 (*Vascular cell adhesion molecule-1*) e P-selectina, aumentando as propriedades adesivas do endotélio de maneira típica aos efeitos de citocinas pró-inflamatórias como TNF, IL-6 e IL-1 $\beta$  (FROSTEGARD et al., 1991; GEBUHRER et al., 1995; KHAN et al., 1995). Além disso, a LDLox, estimulam as células endoteliais e as células musculares lisas a secretarem moléculas quimiotáticas para monócitos (MCP1/CCL2) e fator de estimulação de

colônias de monócitos (mCSF) que induzem o recrutamento de monócitos para a parede endotelial (RAJAVASHISTH et al., 1990; YLA-HERTTUALA et al., 1991).

Vários estudos demonstraram que a ativação da maquinaria molecular pró-inflamatória induzida por LDLox é em grande parte devido a ligação desta lipoproteína modificada a receptores *scavenger* presente na superfície das células endoteliais (PARTHASARATHY et al., 2010). O principal receptor *scavenger* presente em células endoteliais é o LOX-1 (*Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor 1*), a ligação da LDLox ao LOX-1 facilita a absorção de LDLox pelas células endoteliais, que leva a ativação de vários fatores de transcrição responsáveis pela regulação de genes inflamatórios, aumentando a adesão de monócitos ao endotélio (FRANCONE et al., 2009). Além do estímulo inflamatório, a ligação de LDLox ao LOX-1 em células endoteliais resulta na formação de EROs intracelular, dando início à uma cascata de eventos de sinalização sensíveis ao redox desencadeante da ativação de MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) e NF- $\kappa$ B (*Nuclear factor kappa B*), levando ao aumento da expressão de moléculas de adesão e citocinas pró-inflamatórias (COMINACINI et al., 2000). Um resumo do papel da LDLox na disfunção endotelial está apresentado na figura a seguir:



**Figura 1.** Papel da LDLox na disfunção endotelial.

Lipoproteínas de baixa densidade (LDLs) penetram na barreira endotelial e se ligam a proteoglicanos via apolipoproteína B100, retendo-se no espaço subendotelial (íntima). A LDL é oxidada (LDLox), por espécies reativas de oxigênio (EROs) e induz várias condições pró-inflamatórias via LOX-1 (*lectin-like oxidized LDL receptor-1*). A regulação positiva de molécula de adesão, tais como ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) e VCAM-1 (*vascular-cell adhesion molecule-1*) pela LDLox aumenta a adesão de monócitos e outras células inflamatórias ao endotélio. As partículas de LDLox estimulam as células endoteliais e células musculares lisas a secretarem MCP-1 (*monocyte chemotactic protein-1*) e mCSF (*monocyte colony stimulating factor*), com ambos os fatores induzindo o recrutamento de monócitos. A LDLox promove um aumento nas espécies reativas de oxigênio (EROs) e inibe a produção de óxido nítrico.

Fonte: Adaptado de (LEIVA et al., 2015)



#### 2.1.4 Formação de células espumosas

A expressão aumentada de moléculas de adesão na superfície das células endoteliais ativadas leva a adesão de monócitos ao endotélio. Essas células aderidas eventualmente transmigram através do endotélio e se acumulam na camada íntima da parede da artéria. Uma vez dentro do espaço subendotelial, os monócitos se diferenciam em macrófagos e, sob a influência de citocinas inflamatórias e lipoproteínas modificadas acumuladas, adquirem um fenótipo pró-inflamatório promovendo a progressão da inflamação (MOORE; SHEEDY; FISHER, 2013). Essa diferenciação em macrófagos que o meio pró-inflamatório promove, faz parte de uma "armadilha de macrófagos", um círculo vicioso que envolve a retenção de células, a oxidação de novas LDL e o recrutamento de mais monócitos (PARK, 2014).

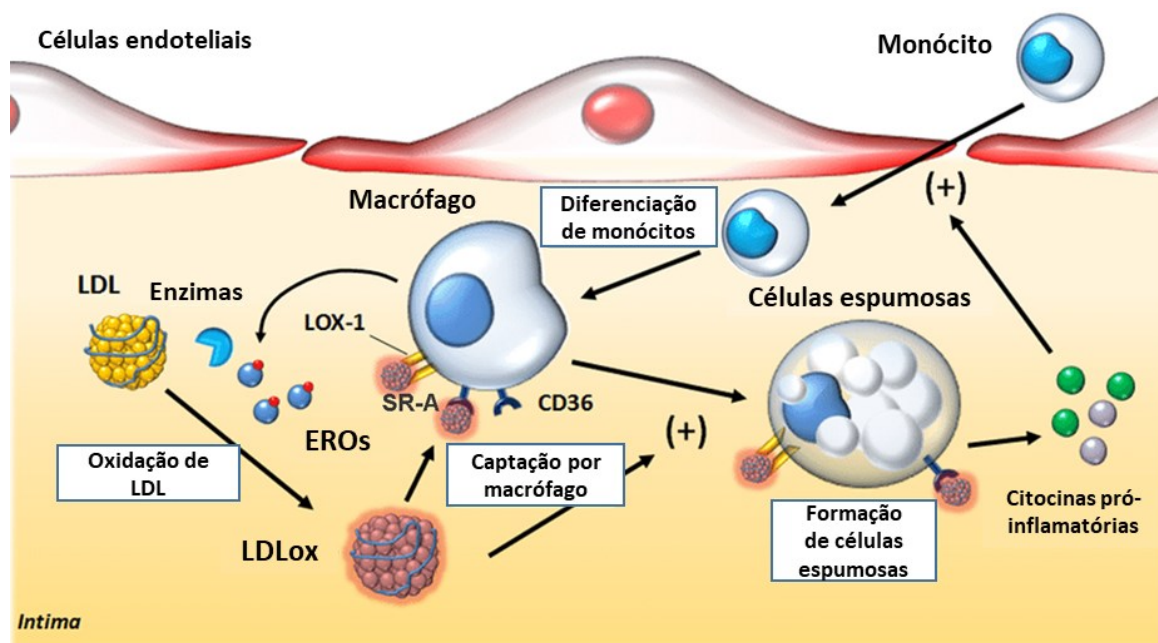
Os macrófagos derivados de monócitos expressam vários receptores *scavenger* que possuem um papel importante na aterosclerose e foram originalmente caracterizados pela capacidade de reconhecer e processar a LDL modificada (MOORE; FREEMAN, 2006). Membros da família de receptores *scavenger* com efeitos pró-aterogênico, incluem SR-A, CD36 e LOX-1, os quais podem ligar-se a LDLox e promover a formação de células espumosas (KZHYSHKOWSKA; NEYEN; GORDON, 2012). Esses receptores facilitam a internalização da LDLox e, no compartimento endossômico tardio, os ésteres de colesterol dessas lipoproteínas são hidrolisados para colesterol livre e ácidos graxos. O colesterol livre no compartimento endossomal é então transferido para o retículo endoplasmático, onde sofre reesterificação pela enzima ACAT1 (*acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase types I*) resultando no éster de colesterol que é embalado em gotículas de lipídios citoplasmáticos, que fornece a característica de "espuma" das células espumosas (MAXFIELD; TABAS, 2005). Estes receptores *scavenger*, ao contrário do receptor de LDL, não sofrem regulação por retroalimentação negativa e como possui uma alta afinidade por LDLox leva a um acúmulo intracelular desordenado de lipídios, o que resulta na formação de células espumosas (KZHYSHKOWSKA; NEYEN; GORDON, 2012).

Há muitas evidências experimentais que demonstram o papel crítico dos receptores *scavenger* na formação de células espumosas. Dentre esses receptores, os mais investigados e quantitativamente mais presente na formação de células espumosas são o CD36 e SR-A. Usando macrófagos peritoneais de camundongos com eliminação genética de SR-A e CD36, demonstrou-se que SR-A e CD36 representam 75-90% da captação de LDL modificada, seja por acetilação ou oxidação (KUNJATHOOR et al., 2002). Em outro estudo, compararam a área de lesões aórticas em camundongos deficientes na apolipoproteína E com a exclusão desses

receptores. A eliminação de CD36 resultou na diminuição de mais de 60% e a ausência de SR-A culminou em uma redução de mais de 30% na área de lesão aórtica total. A ausência combinada de CD36 e SR-A não proporcionou proteção adicional, sugerindo um papel limitante do CD36 na formação da lesão (KUCHIBHOTLA et al., 2008).

A contribuição patológica dos receptores *scavenger* para a progressão da aterosclerose é mais complexa do que apenas o suporte mecânico da acumulação de lipídios intracelulares, resultando em um fenótipo de célula espumosa. A internalização e acumulação de LDLox resulta no desencadeamento de vias inflamatórias nos macrófagos, podendo levar a apoptose ou necrose de células espumosas, formando detritos celulares depositados no núcleo da placa aterosclerótica e contribuindo para a progressão inflamatória. Os macrófagos de fenótipo M1 inflamatório exibem o estresse oxidativo aumentado, efluxo de colesterol prejudicado e secreção de citocinas e quimiocinas também aumentadas, levando a mais oxidação de LDL, ativação de células endoteliais, recrutamento de monócitos e formação de mais células espumosas (ADAMSON; LEITINGER, 2011; COLIN; CHINETTI-GBAGUIDI; STAELS, 2014; PELED; FISHER, 2014).

Um resumo do papel da LDLox na formação de células espumosas de macrófagos, está apresentado na Figura 2.



**Figura 2.** Papel da LDLox na formação de células espumosas.

Na íntima, a LDLox induz à diferenciação de monócitos em macrófagos, os quais expressam receptores *scavenger*, SR-A, CD36 e LOX-1. A interação da LDLox com esses *scavenger* contribui para ativação dos macrófagos e a captação de LDLox. A retenção de LDLox no interior dos macrófagos, leva à formação de células espumosas, apoptose dessas células e à progressão inflamatória.

Fonte: Adaptado de (LEIVA et al., 2015)

## 2.2 Apoproteína E e modelo murino de aterosclerose

A apoproteína E (ApoE) é uma glicoproteína sintetizada em numerosos tecidos incluindo cérebro, fígado e tecido adiposo, servindo como ligante de receptores de lipoproteínas na superfície celular (MEIR; LEITERSDORF, 2004). A ApoE medeia a ligação de remanescentes de VLDL e quilomícrons ao receptor de LDL, impedindo o acúmulo de partículas ricas em colesterol no plasma (HEEREN; BEISIEGEL; GREWAL, 2006). Assim, a ApoE participa da captação de partículas aterogênicas demonstrando sua importância no *clearance* de colesterol e, portanto, na proteção cardiovascular (MEIR; LEITERSDORF, 2004). Além do transporte reverso de colesterol, a ApoE também é antioxidante e anti-inflamatória, reduz a agregação plaquetária, aumenta o efluxo de colesterol de macrófagos e está envolvida na inibição da proliferação de linfócitos T (GREENOW; PEARCE; RAMJI, 2005).

Numerosos estudos foram realizados em modelos de camundongos geneticamente modificados, como o camundongo deficiente para ApoE, para se compreender os mecanismos fisiopatológicos subjacentes à doença cardiovascular e o desenvolvimento de terapias (ZARAGOZA et al., 2011). Os camundongos selvagens são altamente resistentes ao desenvolvimento de aterosclerose, tendo como principal fator as elevadas concentrações sanguíneas das lipoproteínas HDL. Estas são responsáveis pelo transporte de mais de 85% do colesterol plasmático em camundongos, o que difere dos seres humanos nos quais as principais carreadoras de colesterol são as LDL, com 65-85% (FAZIO; LINTON, 2001; HOFKER; VAN VLIJMEN; HAVEKES, 1998).

Estudos em camundongos demonstraram que a perda de ApoE resulta no acúmulo sanguíneo de remanescentes de lipoproteínas ricas em triglicerídeos e colesterol levando ao desenvolvimento de lesões ateroscleróticas (ISHIBASHI et al., 1993). Essas lesões podem ser aceleradas por dietas aterogênicas, ricas em gordura e colesterol (ZHANG et al., 1994). As lesões ateroscleróticas progridem para fases avançadas semelhantes às humanas, caracterizadas pela presença de núcleos necróticos, capas fibrosas, componentes da matriz extracelular e cristais de colesterol (MOGHADASIAN et al., 2001; NAKASHIMA et al., 1994).

Assim, os camundongos *ApoE<sup>-/-</sup>* contêm componentes celulares e uma sucessão de lesões similares às observadas durante a aterogênese humana, tornando-se um modelo importante para o estudo dos vários fatores que controlam ou influenciam o desenvolvimento da placa aterosclerótica. Além disso, a ausência da ApoE confere a esses animais um elevado estado oxidativo e inflamatório basal o que propicia um bom modelo para estudo do estresse oxidativo

e inflamação envolvida no desenvolvimento da aterosclerose (PEREIRA et al., 2012; VASQUEZ et al., 2012).

### **2.3 Aspectos químicos e farmacológicos do fucoidan**

Os mares e oceanos são uma fonte importantíssima de alimentos para a população do mundo inteiro, devido a sua abundância de recursos biológicos e naturais. A diversidade de espécies marinhas de peixes, moluscos, crustáceos e vegetação possibilita múltiplas fontes de nutrientes para uma alimentação saudável. As algas marinhas constituem uma parte importante da dieta em muitos países e reservam nutrientes com capacidade nutricional e medicinal. Dentre os compostos presentes nas algas, o fucoidan tem se destacado, sendo cada vez mais estudado desde a sua identificação até o seu isolamento, sendo correlacionado a inúmeras atividades biológicas em patologias distintas. Muito de suas propriedades terapêuticas, deve a natureza química de sua estrutura. A abordagem de seus aspectos químicos e farmacológicos torna-se, assim, essencial para o entendimento dos mecanismos de ação e para um possível tratamento de doenças como a aterosclerose.

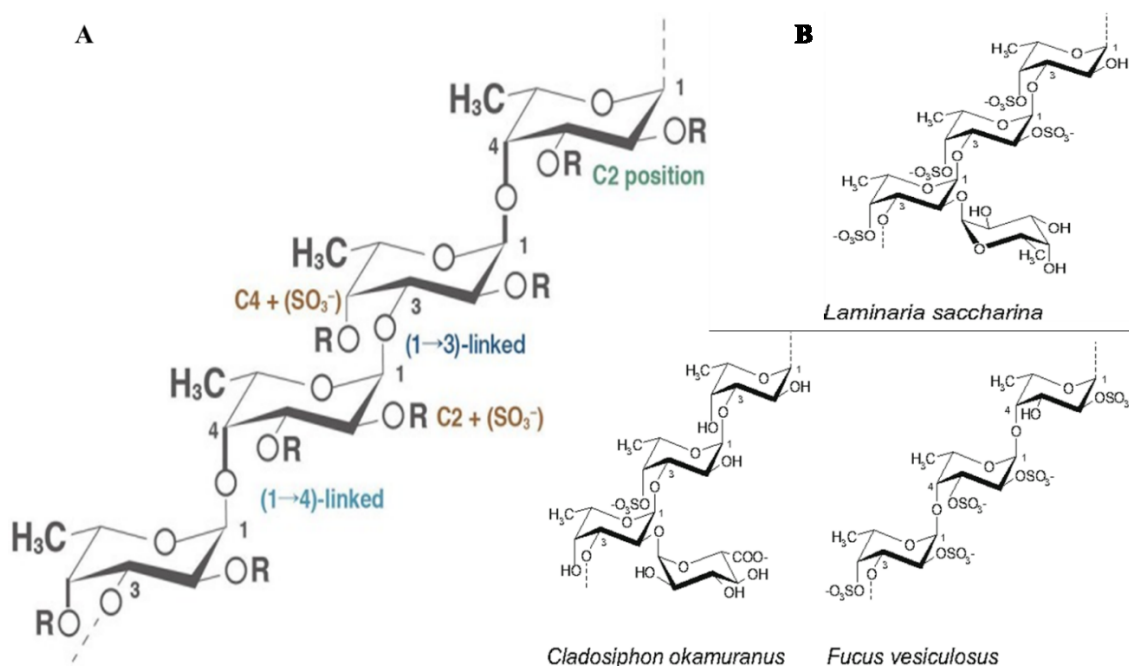
#### **2.3.1 Estrutura e natureza química do fucoidan**

Fucoidan pertence a uma grande família de polissacarídeos sulfatados marinhos, chamadas fucanas, constituídos principalmente de L-fucose sulfatada. Esse polissacarídeo sulfatado foi isolado pela primeira vez em 1913 pelo DR. Kylin da Universidade de Uppsala, Suécia, a partir de algas marrons, o qual nomeou de *fucoidin* (KYLIN, 1913). Porém, essa denominação foi alterada para fucoidan para adequar as recomendações da IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada), mas, na literatura também pode ser encontrado como fucana, fucosan ou fucana sulfatada (LI et al., 2008). O fucoidan é encontrado principalmente nas paredes celulares fibrilares e nos espaços intercelulares das algas marrons da classe Phaeophyceae. Embora, podem ser encontrados em certos invertebrados marinhos (como o pepino-do-mar e ouriço-do-mar) e mais recentemente identificados em *seagrasses* (KANNAN; ARUMUGAM; ANANTHARAMAN, 2013).

A composição de fucoidans isolados a partir de algas marinhas varia de acordo com a espécie, localização geográfica, estação do ano em que foi extraído, clima e o método de extração utilizado para isolá-los (BERTEAU; MULLOY, 2003). Geralmente, os fucoidans contêm uma alta proporção de fucose na estrutura principal de açúcar do polímero. Eles são

sulfatados, podem ser acetilados e podem conter ácidos urônicos. Porém, outras estruturas de fucoidans relatadas na literatura continham vários outros monossacarídeos incluindo glicose, galactose, ácido glucurônico, xilose e/ou manose, assim como proteína, cálcio, cobre, magnésio, manganês, potássio, selênio, sódio, zinco e outros minerais (ALE; MIKKELSEN; MEYER, 2011).

Apesar das variações relativamente grandes na composição dos fucoidans, as propriedades estruturais de fucoidan obtidos a partir de diferentes espécies de algas marrons apresentam uma predominância de um núcleo na maioria dos polissacarídeos (Figura 3A). Verifica-se em primeiro lugar uma estrutura principal de resíduos repetidos de  $\alpha$ -(1,3) L-fucopiranosose ligados e em segundo lugar a estrutura principal composta de L-fucopiranosose unidas por ligações glicosídicas  $\alpha$ -(1,3) e  $\alpha$ -(1,4) alternadas, bem como variações nas extensões de substituições de sulfato em cada um (ALE; MEYER, 2013). Porém, esta estrutura básica não é consistente, apresentando variações nas propriedades estruturais dos fucoidans de diferentes espécies de algas marinhas, devido a sua própria biodiversidade natural (Figura 3B).



**Figura 3.** Estrutura química do fucoidan.

**A)** Estrutura geral. **B)** Motivos estruturais para fucoidans de três diferentes algas marinhas marrons.

Fonte: Adaptado de (CUMASHI et al., 2007; HSU; HWANG, 2019).

Além da heterogeneidade das algas marinhas, a caracterização desses extratos também é influenciada pelos processos de extração e purificação. A maioria dos laboratórios baseia-se no método de extração clássica descrito por Black e colaboradores em 1952. Este método consiste na extração ácida (0,1 M HCl, pH 2,0-2,5) em meios aquosos usando calor (70°C) durante uma

hora repetindo três vezes. Após o tratamento com hidrólise ácida, os polissacarídeos de fucoidan bruto são isolados por precipitação fracionada com etanol (até 60% v/v) e purificadas adicionalmente por precipitação após adição de formaldeído. Porém, a falta de um procedimento de purificação padronizado, leva a abundância de técnicas de isolamento para fucoidan podendo obter estruturas distintas.

As mudanças nos traços estruturais e composicionais proporcionado pela utilização de metodologias de extração diferentes, obviamente, podem ter efeitos importantes nos resultados quando os produtos de polissacarídeos de fucoidan estão sendo avaliados para atividade biológica. No entanto, as cápsulas de fucoidan são comercializadas como suplementos nutracêuticos e extratos de algas marinhas foram utilizados como remédio na medicina tradicional em partes da Ásia, principalmente no Japão, Filipinas e Coreias durante séculos (ALE; MEYER, 2013). Além disso, na última década, a disponibilidade de extratos de fucoidans em escala comercial validados, permite uma abordagem mais sistemática entre as características moleculares e estruturais dos fucoidans com suas bioatividades.

### **2.3.2 Atividades biológicas do fucoidan**

Durante a última década, os fucoidans isolados de diferentes espécies de algas marrons foram extensivamente estudados devido às suas atividades biológicas variadas. O interesse recente centrou-se principalmente nas atividades biológicas potencialmente benéficas de fucoidan em humanos, incluindo antitumoral, antiobesidade, antipatogênica, anti-inflamatório, anticoagulante e antioxidante dentre outras (Tabela 1).

Essa variedade de propriedades especiais dos polissacarídeos sulfatados é determinada de forma significativa pelo peso molecular, a estrutura da molécula, a heterogeneidade dos locais de sulfato e, especialmente, pelo grau de sulfatação dos dissacarídeos, a posição dos grupos sulfato e a organização de domínios sulfatados (VOLPI, 2006). Acredita-se que certas porções do fucoidan de cadeia polissulfatada podem servir como miméticos de receptores de proteína de ligante natural à glicosaminoglicanos (GAG) incluindo heparan sulfato (KRYLOV; USTYUZHANINA; NIFANTIEV, 2011; MARINVAL et al., 2015; WIJESINGHE; JEON, 2012). A ligação de GAG a várias proteínas nos tecidos leva a modificações pós-traducionais, que determinam o comportamento celular, migração celular, proliferação, diferenciação, inflamação e angiogênese (TURNBULL; POWELL; GUIMOND, 2001). Consequentemente, os miméticos de GAG podem interagir com outras macromoléculas e podem modular os efeitos das moléculas sinalizadoras nas células (VOLPI, 2006)

Assim, essa variedade de funcionalidades do fucoïdan, torna uma substância de interesse econômico em indústrias terapêuticas, nutracêuticas, assim como, o apoiam como alimento funcional para efeitos benéficos à saúde, juntamente com a prevenção de diferentes doenças (VO; NGO; KIM, 2012; WIJESINGHE; JEON, 2012).

**Tabela 1.** Atividades biológicas de fucoïdanas de diferentes espécies de algas marinhas marrons.

<b>Atividade</b>	<b>Alga</b>	<b>Referência</b>
<b>Hipolipidêmica</b>	<i>Fucus vesiculosus</i> <i>Laminaria japonica</i> <i>Cladosiphon okamuranus</i>	(YOKOTA et al., 2009) (PARK et al., 2016) (HUANG et al., 2010) (THOMES et al., 2010) (YOKOTA et al., 2016)
<b>Antioxidante</b>	<i>Fucus vesiculosus</i> <i>Laminaria japonica</i> <i>Ascophyllum nodosum</i>	(OMAR et al., 2013) (RODRIGUEZ et al., 2014) (ROCHA et al., 2007) (XUE et al., 2005) (YUAN; MACQUARRIE, 2015)
<b>Anti-inflamatório</b>	<i>Fucus vesiculosus</i> <i>Ecklonia cava</i> <i>Sargassum horneri</i>	(PARK et al., 2011) (KWAK et al., 2010) (DO; PYO; SOHN, 2010) (LEE et al., 2013) (SANJEEWA et al., 2017)
<b>Antiadipogênica e Antiobesidade</b>	<i>Undaria pinnatifida</i> <i>Fucus vesiculosus</i>	(KIM; CHANG; LEE, 2009) (KIM; LEE; LEE, 2010) (KIM; JEON; LEE, 2014) (PARK; JUNG; ROH, 2011)
<b>Anticoagulante e Antitrombótica</b>	<i>Fucus vesiculosus</i> <i>Fucus evanescens</i> <i>Canistrocarpus cervicornis</i>	(KWAK et al., 2010) (YE et al., 2016) (DROZD et al., 2011) (CAMARA et al., 2011)
<b>Cardioprotetora</b>	<i>Cladosiphon okamuranus</i> <i>Laminaria japonica</i>	(THOMES et al., 2010) (LI et al., 2011)
<b>Antitumoral</b>	<i>Cladosiphon okamuranus</i> <i>Undaria pinnatifida</i> <i>Fucus vesiculosus</i>	(AZUMA et al., 2012) (YANG et al., 2013) (XUE et al., 2012) (PARK et al., 2013) (XUE et al., 2017)
<b>Antipatogênica</b>	<i>Fucus vesiculosus</i> <i>Undaria pinnatifida</i> <i>Cladosiphon okamuranus</i> <i>Ascophyllum nodosum</i>	(SHARMA et al., 2014) (HAYASHI et al., 2013) (TREJO-AVILA et al., 2014) (KANDASAMY et al., 2015)

### 2.3.3 Fucoïdan como alvo terapêutico em aterosclerose

Nos últimos anos, uma série de estudos têm realizado investigações mais aprofundadas sobre os efeitos do fucoïdan no sistema cardiovascular onde demonstram que os fucoïdanas de diferentes algas marrons possuem um grande potencial nutracêutico e farmacológico no combate de doenças que afetam as funções vasculares (BRAGA; AGUILAR; ALVAREZ-LEITE, 2019; PATIL et al., 2018; ZAPOROZHETS; BESEDNOVA, 2016). Aqui discutiremos as principais atividades biológicas do fucoïdan que o tornam um potencial alvo terapêutico contra as doenças cardiovasculares ateroscleróticas (DCVA).

#### Fucoïdan como um agente hipolipidêmico

Um potencial mecanismo de ação para a atividade do fucoïdan na aterosclerose é a alteração na absorção e metabolismo lipídico. A hiperlipidemia está associada ao aumento do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Huang e colaboradores em 2010, demonstraram efeitos do fucoïdan sobre a redução de lipídios em modelos de animais hiperlipidêmicos. Neste estudo, os animais foram alimentados com uma dieta rica em gordura durante 28 dias para estabelecer hiperlipidemia, fucoïdan de *Laminaria japonica*, foi administrado por gavagem durante 28 dias adicionais. As concentrações séricas de colesterol total (TC), triglicerídeos (TG) e colesterol de lipoproteínas de baixa densidade (LDL-c) foram reduzidas, enquanto a concentração de colesterol em lipoproteínas de alta densidade (HDL-c) foi aumentada. Os achados desse estudo podem estar associados aos mecanismos que o fucoïdan exerce sobre a expressão e ativação de enzimas envolvidas no metabolismo de lipídios.

Yokota e colaboradores em 2009, utilizando cultura de adipócitos, observaram que o fucoïdan de *Fucus vesiculosus* induziu a secreção da enzima lipoproteína lipase (LPL) e da apolipoproteína C-II (ApoC-II) de uma maneira dependente da dose e do tempo. Fucoïdan também aumentou o mRNA e a expressão da proteína LPL. A secreção de LPL e ApoC-II induzida por fucoïdan podem estar envolvidas na regulação da depuração de triglicerídeos plasmáticos. As ações de fucoïdan foram semelhantes às ações da heparina, que libera LPL, além de aumentar o transporte intracelular e diminuir a degradação de LPL.

O fucoïdan também pode melhorar os níveis de lipídios no soro regulando a expressão de enzimas chave na síntese de colesterol e de triglicerídeos no fígado. Um estudo utilizando cultura de hepatócitos e camundongos hiperlipidêmicos induzidos por poloxâmero-407 (250 mg/kg i.p.) demonstrou que o fucoïdan de *Fucus vesiculosus* melhora os níveis anormais de lipídios séricos e reduz a aterogênese em ratos hiperlipidêmicos induzidos por P407. Os autores



mostraram que os mecanismos moleculares subjacentes a este efeito podem estar relacionados à inibição da expressão hepática de enzimas lipogênicas (ácido graxo sintase e Acetil-CoA carboxilase), bem como, genes colesterolêmicos (diminuição de HMG-CoA redutase e aumentos de receptor de LDL) através da modulação de SREBP-2 (PARK; YEOM; HAHM, 2016).

Em outro estudo, a administração oral de fucoidan de *Cladosiphon okamuranus* reduziu os níveis de lipídios em um modelo de infarto do miocárdio induzido por isoproterenol em ratos (THOMES et al., 2010). A administração de isoproterenol (150 mg / kg, i.p. durante 2 dias) produziu danos grave no miocárdio, altos níveis de peroxidação lipídica e níveis elevados de lipídios séricos. Fucoidan reduziu os níveis de CT, TG e LDL-c e aumentou a concentração de HDL-c, alterados pela administração do isoproterenol. Além disso, o fucoidan reduziu o dano do miocárdio e os níveis de peroxidação e enzimas cardíacas.

Recentemente, foi publicado um estudo avaliando os efeitos do fucoidan na dislipidemia e aterosclerose em camundongos deficientes de apolipoproteína E (ApoE<sup>shl</sup>). Durante 12 semanas os animais receberam dieta rica em gordura suplementada com 1% ou 5% de fucoidan de *Cladosiphon okamuranus*. Foi observado redução dos níveis séricos de TC, TG, LDL-c e aumento de HDL-c e da atividade de LPL. Fucoidan também reduziu a esteatose hepática, bem como a espessura da placa rica em lipídios, a peroxidação lipídica e o acúmulo de macrófagos na aorta. Assim, fucoidan parece ter efeitos não só como antidislipidêmico, mas também, anti-ateroscleróticos induzindo a atividade de LPL e inibindo os efeitos da inflamação e do estresse oxidativo em camundongos ApoE<sup>shl</sup> (YOKOTA et al., 2016).

#### Fucoidan como um agente antioxidante

Numerosos estudos também relataram o potencial efeito antioxidante do fucoidan. Através de uma bateria de ensaios *in vitro* e *in vivo* para a avaliação da eficácia antioxidante do fucoidan contra artrite, PHULL e colaboradores em 2017, relataram o potencial efeito antioxidantes do fucoidan de *Undaria pinnatifida*, incluindo o sequestro de radicais livres DPPH (2,2- difenil-1-picril-hidrazil), óxido nítrico, superóxido e antioxidante total. Outros estudos, também relataram esse potencial efeito de eliminação de DPPH e radicais de hidroxila (CAMARA et al., 2011; WANG et al., 2009). Fucoidan derivados de *F. vesiculosus* foram relatados para prevenir a peroxidação lipídica, e inibirem formações de radicais hidroxila, superóxido (MORYA; KIM; KIM, 2012).

Outros estudos *in vitro*, mostram que o fucoïdan apresenta atividade antioxidante significativa. XUE e colaboradores em 2005, mostraram que a atividade antioxidante de fucoïdan refere-se ao peso molecular e ao teor de sulfato. Frações de fucoïdan extraídas de *L. japonica* tiveram excelente capacidade de eliminação de radicais superóxido e ácido hipocloroso, com exceção da fração altamente sulfatada. No sistema de oxidação de LDL, as frações de baixo peso molecular identificada no estudo, apresentaram grandes efeitos inibitórios sobre a oxidação de LDL induzida por  $\text{Cu}^{2+}$ . Porém, as frações de alto peso molecular tiveram poucos efeitos inibitórios neste sistema. Em outro estudo, fucoïdan de *F. vesiculosus* mostrou impedir consideravelmente a formação de radicais superóxido (IC 50 58  $\mu\text{g/mL}$ ), radicais hidroxila (IC 50 157  $\mu\text{g/mL}$ ) e peroxidação lipídica (IC 50 1250  $\mu\text{g/mL}$ ), indicando potente efeito antioxidante (ROCHA DE SOUZA et al., 2007).

Em outro estudo com camundongos deficientes para o receptor de LDL ( $\text{LDLR}^{-/-}$ ), foi observado que o receptor para LDL oxidada (LOX-1) juntamente com proteínas relacionadas à ERO foram negativamente regulados na aorta desses animais após o tratamento com fucoïdan (WANG et al., 2016). Como as EROs podem modificar a LDL e a LOX-1 é regulada positivamente sob condições pró-inflamatórias, sua expressão diminuída sob tratamento com fucoïdan sugere que o fucoïdan reduz o estresse oxidativo na aterosclerose. Um estudo feito em camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina e tratados com 100 mg/kg/dia de fucoïdan (via administração intragástrica durante 12 semanas), demonstrou que a produção de ERO foi significativamente diminuída nas células musculares lisas na aorta (LIANG et al., 2016).

Fucoïdan mostrou alterar a sinalização através de ERO. KIM e colaboradores em 2012, trabalhando com fucoïdan de baixo peso molecular de *Undaria pinnatifida*, relataram o efeito anti-inflamatório do fucoïdan por meio da supressão do estresse oxidativo e de MAPK, em macrófagos RAW264.7. Recentes estudos, também demonstraram que o fucoïdan diminuiu o estresse oxidativo através da regulação mediada pela sinalização Nrf2/ERK das expressões de HO-1 (*Heme oxygenase 1*) e SOD1 (*superóxido dismutase 1*) em queratinócitos humanos (RYU; CHUNG, 2016). Outro estudo mostrou que o tratamento com fucoïdan reduziu a produção de óxido nítrico (NO) e diminuiu a expressão de iNOS (*inducible nitric oxide synthase*) em células de glioma expostas ao interferon gama ( $\text{IFN}\gamma$ ) e TNF, sendo sugerido como um potencial alvo terapêutico para inflamação que acompanha os efeitos prejudiciais em doenças neurológicas (DO; PYO; SOHN, 2010).

### Fucoidan como um agente anti-inflamatório

A inflamação é composta por diversos e complicados processos associados a condições patológicas, incluindo doenças cardiovasculares. Vários estudos têm explorado o potencial efeito anti-inflamatório do fucoidan para retardar ou prevenir o processo inflamatório crônico ou doenças associadas à inflamação (PHULL; KIM, 2017). Fucoidans são potentes inibidores da migração leucocitária durante a resposta inflamatória, devido à sua interação com as selectinas (FITTON, 2011). Fucoidan pode atuar como um ligante para a L- ou P-selectina, ambas as quais interagem com os oligossacarídeos sulfatados. Em particular, a P-selectina está presente na superfície das plaquetas ativadas e é expressa de forma transiente em células endoteliais ativadas e, portanto, é um objetivo atraente para o tratamento direcionado na aterosclerose. A adesão rápida de neutrófilos e monócitos ao endotélio vascular ativado é facilitada pela P-selectina, bem como a adesão de leucócitos a plaquetas ativadas nas fases iniciais da inflamação (WOOLLARD; CHIN-DUSTING, 2007). Simonis e colaboradores em 2007, demonstraram a especificidade da interação entre P-selectina e fucoidan. Assim, o fucoidan provavelmente age de forma semelhante a heparina ou ao heparan sulfato, apresentando um padrão espacial de estruturas de sacarídeos sulfatados que imitam o agrupamento de oligossacarídeos sulfatados, sialilados e fucosilados na superfície celular (BERTEAU; MULLOY, 2003).

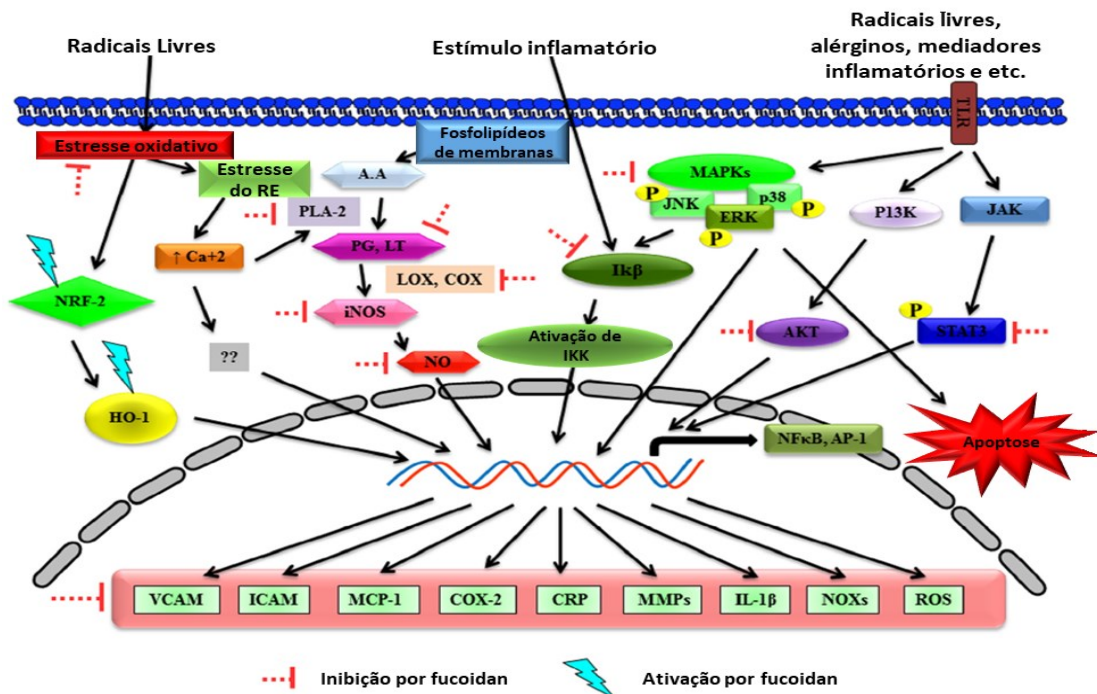
Além de inibir a selectina, os fucoidans podem diminuir a atividade de MMP (*Matrix metalloproteinases*) na neointima e assim, desempenhar um papel importante na patogênese da reestenose após angioplastia arterial (HLAWATY et al., 2011). Recentes estudos têm demonstrado a participação ativa de MMPs nos mecanismos patogênicos das doenças cardiovasculares, incluindo MMP-9, MMP-2, MMP-3, MMP-1 e MMP-8 (VACEK et al., 2015). As MMPs degradam o colágeno e permitem a migração de células do músculo liso na área lesionada, podendo levar a oclusão do vaso e eventos isquêmicos nos tecidos que necessitam de nutrientes (JOHNSON, 2017). Muitos inibidores sintéticos de MMP ficaram aquém das expectativas durante os ensaios clínicos e, por esse motivo, os compostos naturais, incluindo os polissacarídeos sulfatados de algas, devem ser recursos muito promissores (THOMAS; KIM, 2014).

Os mecanismos moleculares da atividade anti-inflamatória dos fucoidans também envolvem a participação de moléculas de sinalização, bem como fatores de transcrição. Os efeitos anti-inflamatórios do fucoidan foram documentados em vários estudos e estão relacionados à inibição de NF- $\kappa$ B, ERK (*extracellular signal-regulated kinases*), MAPK, JNK

(*c-Jun N-terminal kinases*) e AKT (*serine-threonine kinase*), bem como a atenuação da atividade transcricional de proto-oncogene *c-Fos* ou *c-Jun*, que evita a transativação da proteína ativadora 1 (AP-1) (DO et al., 2010; DU et al., 2010; LEE et al., 2008; OOMIZU et al., 2006; PARK et al., 2011; PATEL et al., 2002).

Li e colaboradores em 2011 estudaram os mecanismos da ação anti-inflamatória do fucoidan em um modelo de isquemia-reperusão miocárdica de ratos. Fucoidan reduziu área de infarto do miocárdio, os níveis de TNF, IL-6 e a atividade da mieloperoxidase. Fucoidan reduziu a expressão da proteína de grupo de alta mobilidade B1 (HMGB1), I $\kappa$ B- $\alpha$  fosforilado e NF- $\kappa$ B, enquanto aumentou o conteúdo de IL-10 em comparação com o controle. Além disso, a infiltração de leucócitos polimorfonucleares e danos histopatológicos no miocárdio diminuíram em grupos tratados com fucoidan. Esses achados revelaram que a administração de fucoidan pode diminuir a resposta inflamatória através da inativação de HMGB1 e NF- $\kappa$ B no dano do miocárdio induzido por isquemia/ reperusão.

Assim, os fucoidans exercem um efeito bifuncional, atuando como promotores e inibidores de reações biológicas, incluindo aqueles ligados a processos inflamatórios (USTYUZHANINA et al., 2014). Alguns dos mecanismos de ação anti-inflamatória do fucoidan, foi revidado por (PHULL; KIM, 2017) e estão esquematizados na Figura 4.



**Figura 4.** Mecanismos de ação anti-inflamatório exercidos pelo fucoidan.

VCAM: molécula de adesão celular vascular; ICAM: molécula de adesão intracelular; MCP-1: proteína quimiotática de monócitos-1; PCR: proteína C reativa; A.A: Ácido araquidônico; LOX: lipoxigenases; iNOS: óxido nítrico sintase indutível; PG: prostaglandina; LT: leucotrienos; PLA-2: fosfolipase A2; AP-1: proteína ativadora-1.

Fonte: Adaptado de (PHULL; KIM, 2017)

### Fucoidan como um agente anticoagulante e antitrombótica

A heparina é amplamente conhecida pela sua aplicação como agente antitrombótico e anticoagulante. Porém, sua aplicação farmacológicas é limitada por seus efeitos hemorrágicos e pela ocorrência de trombocitopenia induzida por heparina (SULERIA et al., 2017). Conseqüentemente, a busca por alternativas terapêuticas seguras e eficazes, com menos efeitos colaterais foram necessários. Devido à semelhança com a heparina, vários fucoidans foram testados quanto a sua capacidade de estimular moléculas fibrinolíticas e como anticoagulantes, mostrando-se promissor como um anticoagulante novo, eficaz e não tóxico, com menos efeitos colaterais (MIN et al., 2011; WANG et al., 2019).

Em um modelo murino de trombose, o fucoidan mostrou um efeito antitrombótico mais forte que a heparina (KWAK et al., 2010). Quando os mecanismos foram explorados, verificou-se que os efeitos do fucoidan no fator Xa e trombina eram mais fracos em comparação com a heparina. Esses resultados sugerem que os efeitos do fucoidan são devidos à ligação com o cofator II da heparina e não com antitrombina, como ocorre com a heparina (KWAK et al., 2010). Além disso, diferentemente da heparina, o fucoidan estimula o tPA (*tissue plasminogen activator*) e a fibrinólise induzida, protegendo a atividade da plasmina do inibidor da  $\alpha$ 2-plasmina e diminuindo a formação de polímeros de fibrina (SOEDA S, SAKAGUCHI S, SHIMENO H, 1992).

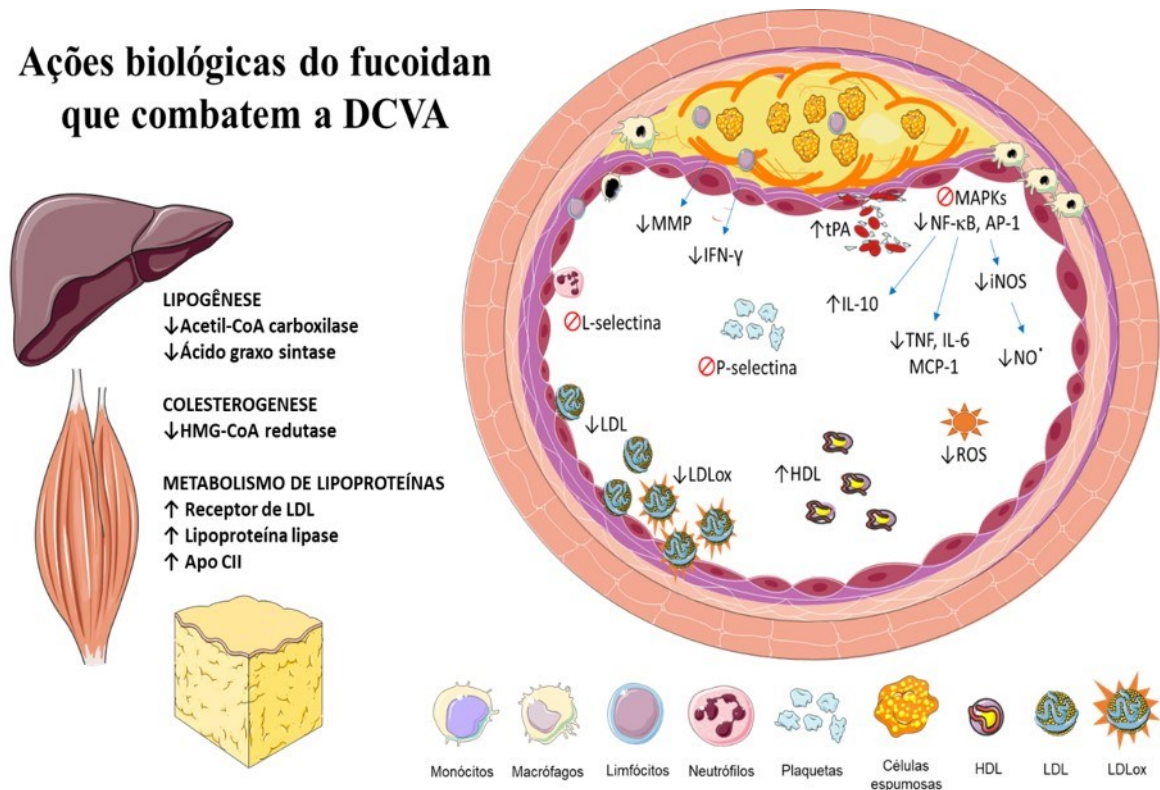
As evidências indicam que a atividade anticoagulante do fucoidan depende fortemente de seu peso molecular, grau de sulfatação, modo de sulfatação, razão sulfato/açúcar total e ramificação de glicosídeos (ATHUKORALA et al., 2006; NISHINO et al., 1991). De acordo com estudos anteriores, os polímeros de fucoidan que exibem atividade anticoagulante mais forte, possuem um peso molecular variando de 10 kDa a 300 kDa (NISHINO et al., 1991). Todavia, fucoidans com frações acima de 850 kDa não possuem atividade anticoagulante (SHANMUGAM; MODY, 2000). Além disso, estudos descobriram que o fucoidan com alto teor de sulfato e baixo teor de ácido urônico exibe alta atividade anticoagulante (ATHUKORALA et al., 2006).

A atividade antitrombótica do fucoidan é amplamente atribuída à sua atividade anticoagulante. Foi demonstrado que os fucoidanos com diferentes pesos moleculares possuem diversas atividades antitrombóticas (ZHAO et al., 2012). A atividade antitrombótica parece ocorrer apenas com fucoidans com uma densidade de carga mínima de 0,5 grupos sulfato por unidade de açúcar e um tamanho de pelo menos 70 unidades de açúcar (ZHANG et al., 2014).

Assim, o fucoidan tem efeitos anticoagulantes e antitrombóticos significativos, mas são complexos, uma vez que dependem da estrutura do composto purificado.

Em suma, o fucoidan possui várias ações biológicas que o tornam um potencial adjuvante na prevenção ou tratamento de DCVA. A contribuição do fucoidan na redução dos eventos que causam as DCVA, incluindo a dislipidemia, estresse oxidativo, inflamação e a formação de trombos estão exemplificados na (Figura 5).

### Ações biológicas do fucoidan que combatem a DCVA



**Figura 5.** Ações biológicas dos fucoidans que potencialmente influenciam no combate de doenças cardiovasculares ateroscleróticas (DCVA).

O fucoidan reduz a lipoproteína de baixa densidade (LDL) inibindo a enzima chave de síntese do colesterol hidróxi-metil-glutaril-CoA (HMG-CoA) redutase e estimulando os receptores de LDL no fígado e outros tecidos periféricos. A redução da síntese de ácidos graxos associada ao aumento da lipoproteína lipase (LPL) e seu cofator ApoC-II no tecido adiposo leva a níveis mais baixos de lipoproteína rica em triglicerídeos e aumenta os níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL). Os fucoidans também diminuem o estresse oxidativo e, conseqüentemente, a disfunção endotelial e a formação de LDL oxidada. A formação de células espumosas é reduzida na presença de fucoidan devido à inibição de moléculas de adesão, o que reduz a migração de células imunes para a camada íntima. Além disso, o fucoidan está relacionado com uma menor expressão de receptores *scavenger* de LDLox e menor ativação das vias de sinalização, tais como da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e fatores de transcrição como o fator nuclear kappa B (NFκB) e a proteína ativadora-1 (AP-1). Como resultado, há uma menor produção de mediadores inflamatórios como interleucina (IL) -6 e fator de necrose tumoral (TNF), proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP1-CCL2) e óxido nítrico e aumento da IL-10. A produção de metaloproteínas da matriz (MMP) por macrófagos e interferon-gama (IFN-γ) por células T na presença de fucoidan diminuiu, reduzindo a degradação da capa fibrosa e a vulnerabilidade da placa. O fucoidan também possui ações anticoagulantes e antitrombóticas, reduzindo as P-selectinas (relacionadas à agregação de plaquetas), a trombina e o fator Xa e aumentando o ativador do plasminogênio tecidual (tPA) e, conseqüentemente, a fibrinólise. iNOS: óxido nítrico sintase induzível; NO: óxido nítrico; ERO: espécies reativas de oxigênio; ↑: aumentando; ↓: decrescente; Ø: inibição.

Fonte: Adaptado de (BRAGA; AGUILAR; ALVAREZ-LEITE, 2019)

### 3. JUSTIFICATIVA

A aterosclerose constitui-se uma importante doença cardiovascular associada à elevada morbidade e mortalidade em todo o mundo. Seu desenvolvimento é multifatorial, sendo dislipidemia, inflamação e estresse oxidativo importantes condições envolvidas. Diversos trabalhos têm sido desenvolvidos utilizando nutrientes como alvos de estudos sobre seus efeitos em doenças cardiovasculares e, recentemente, estudos apontaram efeitos antiaterogênico do fucoidan em modelo murino de aterosclerose. É essencial, agora, compreendermos os mecanismos envolvidos na proteção exercida pelo fucoidan no desenvolvimento da aterosclerose. A capacidade desse composto em exercer efeitos sobre fatores cruciais na aterogênese, como inflamação e estresse oxidativo, o torna um nutriente promissor em pesquisas sobre seus efeitos em componentes celulares diretamente associados ao desenvolvimento da doença cardiovascular aterosclerótica, como monócitos/macrófagos e células endoteliais. Assim, nossa hipótese é que o efeito antiaterogênico do fucoidan se deve não apenas ao seu efeito antidislipidêmico, mas também à sua propriedade anti-inflamatória e antioxidante.

Um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na ação do fucoidan na aterogênese irá, sem dúvida, abrir perspectivas para a descoberta de novos agentes terapêuticos que possam contribuir para a redução da morbidade e mortalidade de pacientes que possuem fatores de riscos para doenças cardiovasculares.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do fucoïdan no desenvolvimento da aterosclerose em camundongos *ApoE<sup>-/-</sup>*, bem como os possíveis mecanismos envolvidos na proteção contra a inflamação e estresse oxidativo induzidos pela LDLox.

### 4.2 Objetivos específicos

Com a finalidade de estudar os efeitos antiaterogênicos, anti-inflamatórios e antioxidativos do fucoïdan os objetivos específicos foram:

#### *In vivo*

- Investigar o efeito da suplementao de fucoïdan em dietas AIN padrão e hipercolesterolêmica sobre os parâmetros bioquímicos plasmáticos e no desenvolvimento da aterosclerose em camundongos *ApoE<sup>-/-</sup>*;
- Investigar a absorção intestinal do fucoïdan e a sua biodistribuição após administração oral, bem como o seu efeito sobre o rolamento e adesão de leucócitos na veia mesentérica de camundongos *ApoE<sup>-/-</sup>*;

#### *Ex vivo e in vitro*

- Investigar o efeito do fucoïdan na resposta inflamatória de células endoteliais estimuladas com LDLox, bem como os mecanismos moleculares envolvidos.
- Investigar o efeito do fucoïdan sobre a disfunção endotelial em aortas de camundongos C57BL/6 estimuladas com LDLox e em aortas de camundongos *ApoE<sup>-/-</sup>*.
- Investigar o efeito do fucoïdan na captao de LDLox por macrófagos, bem como na expressão de receptores *scavenger* e na formação de células espumosas.



## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### Experimentos *in vivo*

#### 5.1 Animais e dietas

Foram utilizados camundongos nocautes para a Apoproteína E (*ApoE*<sup>-/-</sup>, *background* C57BL/6), machos, com 8-10 semanas de idade, provenientes do biotério de criação Ênio Cardillo Vieira, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB-UFMG). Os experimentos foram realizados na sala experimental do mesmo biotério, a qual se dispunha de um ambiente arejado com controle de temperatura ( $27 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas). Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (até 3 animais) contendo maravalha e com livre acesso a dieta e água. Todos os experimentos com animais foram realizados de acordo com o Guia do Instituto Nacional de Saúde para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG), protocolo nº. 284/2016 (Anexo I).

Durante 10 semanas, os animais foram alimentados com dieta padrão AIN-93M ou dieta hipercolesterolemiantes (AIN-93M com 0,25% de colesterol), suplementadas ou não com 1% de fucoïdan, conforme a Tabela 2. O valor de 1% de fucoïdan suplementado foi baseado na literatura (YOKOTA et al., 2016). O fucoïdan utilizado foi derivado da alga marinha marrom *Cladosiphon okamuranus* (Kanehide Bio Co., Ltd.), (Anexo II). Para cada quilo de dieta preparada foram utilizados 11 gramas de extrato. As dietas foram confeccionadas no Laboratório de Aterosclerose e Bioquímica Nutricional da UFMG e acondicionadas em potes plásticos devidamente identificados e armazenadas a  $-20^\circ\text{C}$  durante o período experimental.

**Tabela 2.** Composição das dietas experimentais ofertadas durante 10 semanas aos animais.

<b>INGREDIENTES (g)</b>	<b>DP</b>	<b>DP + Fuc 1%</b>	<b>DHC</b>	<b>DHC + Fuc 1%</b>
Amido de milho	465,692	465,692	465,692	465,692
Caseína	140,0	140,0	140,0	140,0
Sacarose	100,0	100,0	100,0	100,0
Matodextrina	155,0	155,0	155,0	155,0
Óleo de soja	40,0	40,0	40,0	40,0
Celulose	50,0	50,0	50,0	50,0
Mix de minerais	35,0	35,0	35,0	35,0
BHT	0,008	0,008	0,008	0,008
Mix de vitaminas	10,0	10,0	10,0	10,0
Bitartarato de colina	2,5	2,5	2,5	2,5
Cistina (Metionina)	1,8	1,8	1,8	1,8
Colesterol	-	-	2,5	2,5
Fucoidan	-	11,0	-	11,0

DP: Dieta Padrão; DHC: Dieta Hipercolesterolemiantes; Fuc: Fucoïdan.

## 5.2 Desenho experimental

Os animais foram divididos em quatro grupos de 10 animais de acordo com a dieta recebida, sendo os seguintes grupos: grupo DP (recebeu dieta padrão), grupo DP + Fuc 1% (recebeu dieta padrão suplementada com 1% de fucoïdan), grupo DHC (recebeu dieta hipercolesterolemiantes) e grupo DHC + Fuc 1% (recebeu dieta hipercolesterolemiantes suplementada com 1% de fucoïdan). Para garantir a homogeneidade entre os grupos, os animais foram distribuídos conforme o seu peso e valor de colesterol inicial (determinado a partir de uma gota de sangue da veia caudal).

Os camundongos foram pesados semanalmente para acompanhamento da evolução ponderal. O ganho de peso corporal total foi obtido pela diferença entre peso final e peso inicial. A ingestão alimentar foi quantificada a cada semana, por meio do cálculo da diferença entre o peso da dieta ofertada e do resto não consumido. O valor final foi ajustado pelo número de animais por gaiola e apresentado em gramas por dia por animal.

Ao final das dez semanas de experimento procedeu-se a eutanásia após jejum noturno. A eutanásia se deu por exsanguinação após anestesia intraperitoneal com solução de cetamina (70mg/kg) e xilazina (15mg/kg), conforme preconizado pelo CEUA/UFMG (Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG). O sangue foi coletado através do plexo braquial e colocado em tubo de 2,0 mL sem anticoagulante, para obtenção de soro, e com anticoagulante (contendo fluoreto de sódio como antiglicolítico), para obtenção de plasma. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 2000 x g por 10 minutos para obtenção do soro ou plasma, os quais foram

guardados sob refrigeração (4°C). As diversas dosagens bioquímicas foram realizadas imediatamente ou em até três dias.

Os tecidos (fígado, tecido adiposo epididimal, baço e o músculo gastrocnêmico) foram retirados no momento da eutanásia, pesados e armazenados a -80 °C, para análises posteriores. O coração e aorta dos animais também foram retirados, após perfusão com salina tamponada com fosfato (PBS) e armazenados em formol 10%.

### **5.3 Dosagens dos parâmetros bioquímicos**

O perfil lipídico e glicêmico dos animais foi avaliado utilizando-se kits comerciais Labtest Diagnóstica S.A., sendo eles: Colesterol total (CT), HDL-colesterol (HDL-c), Triglicerídeos (TG) e Glicose. Os princípios dos mesmos e seus respectivos protocolos são descritos no Anexo III. A concentração do colesterol não-HDL (colesterol VLDL e LDL) foi calculada a partir da diferença do colesterol total pelo colesterol HDL e expressa em mg/dL.

### **5.4 Avaliação de lesões ateroscleróticas da aorta “*en face*”**

Para avaliar o desenvolvimento da aterosclerose foi quantificado o percentual da área da aorta acometida pela lesão aterosclerótica. Inicialmente, cada aorta foi cuidadosamente retirada no momento da eutanásia, a partir de 1 mm acima da válvula aórtica até a bifurcação ilíaca e, em seguida, foram dissecadas para completa remoção do tecido adiposo adjacente. Ao final desse processo, a aorta foi lavada em PBS e armazenada em tubo de 2,0 mL contendo formol à 10%, sendo mantidas em temperatura ambiente, até a coloração com SUDAN IV.

Durante o processo de coloração, as aortas foram distribuídas em placas de Petri devidamente identificadas, as quais foram submersas em uma solução de etanol 70% por 5 minutos para desidratação e, posteriormente, coradas em uma solução previamente filtrada (em papel filtro) contendo 0,5% de SUDAN IV, 35% de etanol, e 50% de acetona, por 10 minutos. Em seguida, essas aortas foram descoradas por 5 minutos em solução de etanol 80%, de maneira que apenas as placas de gordura permaneceram coradas, devido à afinidade do SUDAN IV por lipídios (PALINSKI et al., 1994). Vale ressaltar que todos esses procedimentos foram efetuados sob agitação, utilizando-se o *shaker*.

Após a coloração, as aortas foram mantidas em tubos de 2,0 mL contendo PBS a 4 °C, até o momento em que foi realizado a abertura longitudinal das aortas e obtenção da imagem.

As imagens foram capturadas por meio de scanner e digitalizadas em computador. O programa analisador de imagens Image-Pro Plus versão 6.3 (ImagePro Plus Software, Bethesda Maryland - USA) foi utilizado para análise das imagens. O cálculo das lesões nas aortas foi realizado considerando-se a porcentagem de área acometida por lesão em relação à área total da artéria.

### 5.5 Cinética de absorção e da biodistribuição do fucoïdan

A cinética de absorção intestinal e a biodistribuição foi avaliada por meio da administração oral de fucoïdan marcado com o radionuclídeo tecnécio 99m ( $^{99m}\text{Tc}$ ). Conforme descrito a seguir:

#### Radiomarcção do fucoïdan com tecnécio 99m ( $^{99m}\text{Tc}$ -Fuc)

Para a radiomarcção, utilizou-se o fucoïdan de *Fucus vesiculosus* (Sigma-Aldrich, com pureza de  $\geq 95\%$ ) e o tecnécio-99m ( $^{99m}\text{Tc}$ ) na forma de pertecnato de sódio ( $\text{Na}^+ \text{}^{99m}\text{TcO}_4^-$ ) obtido do gerador de Molibdênio-99m/tecnécio-99m (IPEN, Brasil). A radiomarcção do fucoïdan e posterior determinação do rendimento de radiomarcção foram otimizadas a partir de protocolo proposto por Rouzet et al. (2011). Resumidamente, em frasco de vidro, do tipo penicilina, foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  de uma solução de cloreto de estanho ( $\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) em 0,25 mol/L de HCl (2,0 mg / mL) e 50  $\mu\text{L}$  de uma solução de borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ) em 0,1 mol/L de NaOH (1,0 mg / mL). Em seguida, o pH foi ajustado para próximo de 7 usando solução de NaOH (1 mol / L). Posteriormente, 50  $\mu\text{L}$  de uma solução de fucoïdan em solução salina a 0,9% (1,0 mg/mL) foram adicionados. O frasco foi lacrado para a realização de vácuo e uma alíquota de 0,1 mL de salina contendo 3,7 MBq de  $\text{Na}^+ \text{}^{99m}\text{TcO}_4^-$  foi adicionada. A solução foi mantida à temperatura ambiente durante 45 min para a marcação.

#### Determinação da pureza

O rendimento da marcação foi determinado por cromatografia em camada delgada (CCD). Resumidamente, para determinação do percentual de tecnécio livre ( $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ), uma placa cromatográfica de sílica gel de fase normal (cromatofolha de alumínio com sílica gel) foi cortada em tira de 1x10 cm. Com o auxílio de uma pipeta, 5  $\mu\text{L}$  do fucoïdan marcado com  $^{99m}\text{Tc}$  foram aplicados no ponto de origem. Após a secagem (em temperatura ambiente) a corrida foi

realizada em tubo contendo metil etil cetona como fase móvel e quando a fase móvel atingiu a marca superior da tira (0,5 cm da extremidade superior) a corrida foi paralisada. Após a corrida, a tira foi deixada em temperatura ambiente para secagem e, em seguida, foi cortada ao meio. A radioatividade das porções inferiores e superiores foi determinada por um contador gama (Wizard-Perkin Elmer). O  $^{99m}\text{TcO}_2$  foi removido da preparação usando um filtro de seringa de 0,22  $\mu\text{M}$ , conforme descrito por Fernandes et al., (2016).

#### Avaliação da estabilidade da marcação do $^{99m}\text{Tc}$ -Fuc

Para análise da estabilidade da marcação do complexo radiomarcado foram realizados testes em solução salina (NaCl 0,9%) e em plasma fresco de camundongos. No teste de estabilidade em solução salina, o frasco contendo a radiomarcação foi mantido em temperatura ambiente e analisada por CCD em triplicata nos tempos de 1, 2, 6 e 24 horas. Para determinação da estabilidade radioquímica no plasma de camundongos, foi adicionado 90  $\mu\text{L}$  de  $^{99m}\text{Tc}$ -Fuc em um tubo contendo 1,0 mL de plasma. A mistura foi incubada a 37°C, sob agitação (Dubnoff Bath MA-095/CF). Alíquotas foram retiradas nos tempos de 1, 2, 6 e 24 horas e a atividade na fração do plasma foi analisada por CCD, em triplicata.

#### Estudo da cinética de absorção e da biodistribuição do fucoidan

A cinética de absorção intestinal foi estudada em camundongos *ApoE*<sup>-/-</sup>, em jejum por cerca de doze horas e sem nenhum tratamento prévio. Os Camundongos (n = 5, 15 semanas de idade) receberam 100 $\mu\text{L}$  de solução de  $^{99m}\text{Tc}$ -Fuc via gavagem e, após a administração, os animais foram anestesiados com mistura de xilazina (15 mg / kg) e cetamina (70 mg / kg). Uma incisão foi feita na cauda dos animais e o sangue foi coletado em tubos pré-pesados nos tempos de 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240, 360, 480 e 1440 minutos. Após a última coleta, os tubos foram novamente pesados e sua radioatividade determinada por um contador gama. Os dados obtidos foram usados para traçar uma curva de porcentagem da dose administrada por grama de tecido (% ID/g) em relação ao tempo.

Para os estudos de biodistribuição, camundongos *ApoE*<sup>-/-</sup>, em jejum por cerca de doze horas e sem nenhum tratamento prévio (n = 4, 15 semanas de idade) receberam por gavagem 100 $\mu\text{L}$  de solução de  $^{99m}\text{Tc}$ -Fuc. Após 4 horas da administração do  $^{99m}\text{Tc}$ -Fuc, os animais foram anestesiados para coleta de sangue e, em seguida, eutanasiados por exsanguinação para coleta dos tecidos (aorta, coração, fígado, baço, rins, estômago, intestino delgado, intestino grosso e

tireóide). Esses tecidos foram secos em papel de filtro, pesados e a radioatividade em cada órgão determinada por um contador gama. Foi utilizado um padrão dose, contendo a mesma dose administrada nos camundongos, para corrigir o decaimento físico do  $^{99m}\text{Tc}$ . O percentual da dose administrada por grama de tecido (% ID / g), foi calculado, dividindo-se a atividade radioativa (cpm) de cada órgão pela massa de tecido correspondente (g), pela atividade do padrão (cpm) e multiplicando-se por 100.

### Imagens cintilográficas

Neste estudo, camundongos *ApoE<sup>-/-</sup>*, em jejum por cerca de doze horas e sem nenhum tratamento prévio (n= 3, 15 semanas de idade), receberam por via oral (gavagem) 3,7 MBq de  $^{99m}\text{Tc}$ -Fuc. Após 4h da administração, os animais foram anestesiados com solução de cetamina (70mg/kg) e xilazina (15mg/kg) e, em seguida, colocados em decúbito dorsal sob gama câmara (Nucleine TM TH 22, Hungria). As imagens foram obtidas com um colimador LEHR (Low Energy High Resolution) e matrizes de dimensão 128x128x32 com um tempo de aquisição de 300 segundos cada, utilizando uma janela simétrica de 20% com pico de energia fixa a 140 KeV. Imagens dos intestinos foram realizadas após remoção seguindo o mesmo protocolo.

## **5.6 Avaliação do rolamento e adesão de leucócitos - Microscopia Intravital**

Para a avaliação do efeito do fucoidan no rolamento e na adesão de leucócitos, foram utilizados camundongos C57BL/6 e *ApoE<sup>-/-</sup>* (n=5, com 18 -20 semanas de idade). Fucoidan de *Fucus vesiculosus* (Sigma-Aldrich, com pureza de  $\geq 95\%$ ) foi aplicado via gavagem (100mg/kg). A dose utilizada nesse ensaio e o tempo foram baseados em estudos que investigaram o efeito antiaterogênico, bem como a farmacocinética do fucoidan em camundongos que receberam o composto via oral (POZHARITSKAYA et al., 2018; WANG et al., 2016). Após 4 horas da gavagem foi realizado o preparo dos animais para o intravital conforme descrito anteriormente (HERR et al., 2015). Resumidamente, os animais foram submetidos à anestesia, via da aplicação intraperitoneal de solução salina contendo Cetamina (70mg/kg) e Xilazina (15mg/kg). Em seguida, posicionou-se o animal em decúbito lateral dentro de uma placa de petri, e fez-se uma pequena incisão na região onde se localiza o intestino delgado. As alças intestinais foram cirurgicamente expostas e afixadas, de forma que os vasos da microcirculação se tornassem visíveis. Após isso, os leucócitos foram marcados injetando 50 $\mu$ l de Rodamina 6G (1 mg/ml) retro-orbitalmente e prosseguiu para a avaliação do rolamento

na veia mesentérica: especificamente naquelas com diâmetro variando entre 200 e 300 $\mu$ m. Foram realizados vídeos de duração aproximada de um minuto, utilizando o microscópio de fluorescência (Apotome.2 Zeiss), acoplado com uma câmera de vídeo (AxioCam 503Mono, Zeiss - Alemanha), onde foram registradas e analisadas as imagens através do Software Zein.

Interações entre leucócitos e endotélio foram analisadas pela contagem do número de leucócitos rolantes ou aderidos ao vaso, após análise de 1 minuto de vídeo, num campo de área demarcada pelo posicionamento de um retângulo de 300x400  $\mu$ m na tela do vídeo. Leucócitos nitidamente visíveis e em movimento pelo endotélio, foram considerados como estando em rolamento. Para investigar as interações de adesão, consideraram-se como aderidos leucócitos estáticos por pelo menos 30 segundos. Os resultados foram expressos como número de células rolando/aderidas por campo.

## **Experimentos *ex vivo* e *in vitro***

### **5.7 Obtenção e oxidação da LDL**

LDL nativa de humanos (LDL,  $d = 1,019-1,063$ g/ml) foi isolada do plasma de doadores saudáveis, por gradiente de densidade sequencial, através de ultracentrifugação, conforme descrito por Chung e colaboradores, (1986). Resumidamente, o sangue foi coletado de voluntários saudáveis, não fumantes, em tubo *vacutainer* e imediatamente centrifugado a 2.000 x g durante 10 minutos. Após coletar o plasma, a este foi adicionado os seguintes conservantes e inibidores de proteases: Aprotinina (5 $\mu$ L/mL), benzamidina 2mM (5 $\mu$ L/mL), solução de azida sódica 5% e clorafenicol 0,1% (10 $\mu$ L/mL), solução de clorafenicol 0,25% (20 $\mu$ L/mL) e PMSF 0,5 mM em DMSO (0,5 $\mu$ L/mL). A densidade do plasma foi ajustada para 1,21g/ml adicionando brometo de potássico (KBr) sólido mexendo suavemente. A solução de plasma foi, então, distribuída em tubos de polipropileno de 10 mL (aproximadamente 3 a 4 mL) e um gradiente descontínuo de densidade foi feito por adição de uma solução de KBr de densidade 1,006 até completar o volume total do tubo. O plasma foi ultracentrifugado a 50.000 rpm por duas horas e meia a 4°C em ultracentrífuga Sorvall Ultra pro-80/DU Pont, utilizando o rotor fixo 875T. Após a centrifugação, os tubos foram cuidadosamente retirados do rotor e colocados na posição vertical. A fração de LDL foi coletada por sucção usando seringa de 1mL. A LDL coletada foi dialisada em solução de tampão fosfato (PBS, pH 7,4), por um período de 24 horas a 4°C no escuro, com duas trocas do tampão. Em seguida, o material foi filtrado com filtro de 0,22 $\mu$ m e armazenado na geladeira a 4°C por no máximo 30 dias.

Para avaliar o efeito de concentrações suprafisiológicas de LDL oxidada, a LDL nativa foi diluída em água Milli-Q a uma concentração de 500µg/mL de proteína, sendo incubada com cloreto de cobre a 1mM (5µM, concentração final) durante 18 horas a 37°C sob agitação constante e protegida da luz. A reação de oxidação foi parada com a adição de EDTA 0,5M (proporção de 2 EDTA: 1 CuCl<sub>2</sub>) e, em seguida foi dialisada em PBS durante 24 horas e filtrada com filtro de seringa de 0,22 µm para esterilização. A concentração de proteína da LDL foi determinada pelo método de (LOWRY et al., 1951).

### **5.8 Preparo da solução estoque de fucoidan**

O fucoidan usado em nossos estudos *ex vivo* e *in vitro* é derivado da alga marinha marrom *Fucus vesiculosus* (Sigma-Aldrich, com uma pureza de ≥ 95%). Para os ensaios experimentais, uma solução estoque de 1,0mg/mL foi preparada em água Milli-Q e, em seguida, filtrada com filtro de seringa de 0,22µm e armazenada a 4 °C por no máximo 60 dias. A partir desta solução estoque, as concentrações de interesse foram obtidas por diluições feitas diretamente no meio de cultura utilizado durante o ensaio.

### **5.9 Cultura de EA. hy926 e tratamento**

Para elucidar o efeito do fucoidan no endotélio vascular, foram realizados diversos ensaios *in vitro* utilizando uma linhagem de células endoteliais humanas (as células híbridas EA.hy926, derivadas das células primárias HUVEC - *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) comercialmente disponível (ATCC, USA). As células foram cultivadas em garrafas de culturas contendo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) completo, enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina. As células foram mantidas em estufas de CO<sub>2</sub> a 5%, e temperatura constante de 37°C. Foram realizadas passagens sucessivas das células a cada 2-3 dias, após atingirem uma confluência de aproximadamente 80%. Como parte do controle de qualidade dos experimentos realizados em nosso laboratório, a cultura das células foi monitorada quanto a possível contaminação por micoplasma, conforme descrito no Anexo IV.

Para realização dos experimentos, o SFB do meio de cultura era reduzido a 1% por pelo menos 12h de antecedência e durante o experimento era totalmente retirado. Os ensaios experimentais foram realizados em placas de culturas e a densidade celular ajustada conforme



cada experimento. As células foram pré-tratadas com diferentes concentrações de fucoidan (1, 5 e 10  $\mu\text{g/mL}$ ), durante 30 min e, então, co-incubadas com LDLox (50  $\mu\text{g/mL}$ ) por 4 horas. As concentrações e tempo de incubação utilizada, foram baseados em ensaios e concentrações obtidas em animais e humanos (IRHIMEH et al., 2005; POZHARITSKAYA et al., 2018)

### **5.10 Avaliação da adesão de monócitos a células endoteliais (*in vitro*)**

A adesão de monócitos a células endoteliais foi avaliada utilizando células de linhagem de monócito humano (THP-1), marcadas com sonda fluorescente sob uma monocamada de células endoteliais. Para obtenção da monocamada, as células EA. hy926 foram semeadas em placas de 24 poços em meio DMEM contendo 10% de SFB na concentração de  $1 \times 10^5$  células/poço. Após 48 horas, as células foram lavadas e mantidas em meio DMEM sem SFB, sendo pré-tratadas com fucoidan (1, 5 e 10  $\mu\text{g/mL}$ ) durante 30 min, e depois co-incubadas com 50  $\mu\text{g/mL}$  de LDLox durante 4 horas. Após o período de tratamento, as células THP-1 previamente marcadas com a sonda CellTrace FarRed DDAO-SE, Molecular Probes (10  $\mu\text{M/mL}$  de sonda para  $1 \times 10^6$  células/mL de célula em PBS por 30 minutos a 37°C), foram adicionadas sob a monocamada de células endoteliais ( $4 \times 10^3$ /poço) e incubadas na estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C durante 30 minutos. Em seguida, as células co-incubadas foram lavadas duas vezes com meio sem soro para a remoção de célula não aderidas. A adesão de monócitos foi visualizada em cinco campos aleatórios de cada poço com uma excitação de 620/60nm e emissão de 700/75nm através do microscópio de fluorescência Nikon Eclipse Ti, equipado com câmera EMCCD Luca<sup>EM</sup> R (Andor Technology, USA) e controlado pelo software NIS AR. A contagem de células THP-1 aderidas, foi realizada utilizando o software ImageJ e a média por poço foi calculada a partir dos cinco campos fotografados, sendo os dados expressos como porcentagem do controle.

### **5.11 Avaliação da viabilidade celular**

A viabilidade das células EA. hy926 e THP-1 foi determinada através da alteração na permeabilidade da membrana ao iodeto de propídeo e analisada por meio de citometria de fluxo. Vinte e quatro horas antes do ensaio de viabilidade, foram semeadas 1,5  $\times 10^5$  células por poço, em placa de 12 poços contendo meio DMEM (EA. hy926) ou RPMI (THP-1) com 10% de SFB. Posteriormente, as células foram lavadas com os respectivos meios sem SFB e pré-incubadas

com fucoidan (1; 5 e 10µg/mL) e co-incubadas com 50µg/mL de LDLox. Após 4 horas de tratamento, as células de cada poço foram transferidas para tubos de 5mL (específicos para citometria de fluxo) e centrifugadas a 500 x g, por 5 minutos a 4 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 500 µL de HBSS contendo 10 µg/mL de iodeto de propídeo (BD Pharmingen). As amostras foram mantidas no gelo e lidas no citômetro de fluxo FACS Calibur (Beckton Dickinson, EUA), utilizando laser de Argônio de excitação 488nm e filtro de emissão de 585/42. A aquisição de dados foi realizada utilizando o software BD CellQuest Pro fornecido pelo fabricante. A delimitação da população das células foi realizada com base no tamanho e complexidade interna (parâmetros FSC e SSC, respectivamente), sendo estes dados dispostos sob a forma de *dot-plots* bidimensionais. Foram adquiridos 10.000 eventos por amostra e os dados de fluorescência da população de células viáveis foram analisados sob a forma de histogramas. Para análise dos dados adquiridos, foi utilizado o software FlowJo v10.0.6 (Tree Star Inc., EUA).

#### **5.12 Dosagem de citocinas no sobrenadante de células EA. hy926 por ELISA**

A concentração de citocinas, Interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral (TNF) e da proteína quimiotática para monócitos (MCP-1) foi medida no sobrenadante das células EA. hy926, para ser investigado possíveis efeitos do fucoidan na produção desses mediadores inflamatórios, após estímulo com LDLox. O sobrenadante (livre de células), foi aliquoteado e estocado a -80°C até a sua utilização para detecção da concentração dos mediadores de interesse por meio da técnica de ELISA (Ensaio imunoenzimático: *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*), seguindo as instruções dos fabricantes.

#### **5.13 Avaliação da expressão de moléculas de adesão de superfície**

A expressão de moléculas de adesão, P-selectina e VCAM-1, na superfície da célula endotelial, foi avaliada por imunofluorescência. Em resumo, as células em meio contendo 10% de SFB, foram semeadas ( $1 \times 10^5$  por poço) em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro. Após 12 horas, o meio foi trocado para o de 1% de SFB e mantidas por mais doze horas. Os estímulos com fucoidan e LDLox foram realizados conforme descritos anteriormente. Após 4 horas de incubação, as células aderidas foram fixadas com paraformaldeído a 4%, lavadas com PBS, seguido de bloqueio (3% de BSA, em PBS) por 30 minutos, à temperatura ambiente.

Procedeu-se em seguida à incubação com anticorpo primário diluídos em tampão de bloqueio (1:150; anti-P-selectina camundongo, Santa Cruz, # sc-8419) e (1:150; anti-VCAM rato, Santa Cruz, # sc-733253), sendo deixado *overnight* à 4°C. No dia seguinte, após lavar as lâminas novamente com PBS 1x, aplicaram-se os anticorpos secundários (Alexa Flúor 647 cabra anti-camundongo - Cell Signaling #4410; FITC cabra anti-rato - BD Pharmigen #A11007). Seguiu-se, então, à incubação por 2h, no escuro, à temperatura ambiente. Finalmente, efetuou-se a preparação das lâminas com meio de montagem contendo DAPI (ProLong<sup>®</sup> Gold Antifade Reagent with DAPI; Invitrogen, USA). As imagens das células foram capturadas utilizando-se microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse Ti, USA, 2012) com objetivas de 10x e excitação no comprimento de 488 nm e 647nm. A intensidade de fluorescência emitida foi analisada com auxílio do software Image-J e corrigida por tamanho de cada célula, definida pelo campo claro e a marcação do núcleo.

#### **5.14 Análise cinética da produção intracelular de EROs, superóxido e óxido nítrico**

A produção intracelular de EROs, superóxido mitocondrial e óxido nítrico foi detectada por fluorimetria através de sondas fluorescentes durante as 4 horas de incubação das células EA. hy926 com os diferentes tratamentos. Foram plaqueadas  $2,5 \times 10^4$  células por poço em placa de 96 poços, em meio contendo 10% de SFB. Após um período de 24 horas, o meio foi trocado para DMEM sem SFB e foi deixado durante 12 horas antes do início do experimento. Para a marcação, as células foram lavadas duas vezes com PBS e marcadas com sondas fluorescentes para a detecção intracelular de EROs (diacetato de dihidroclorofluoresceína, H<sub>2</sub>DCF-DA, 10µM, Invitrogen, EUA), superóxido mitocôndria (MitoSOX, 5µM, Invitrogen, EUA) e óxido nítrico (4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorescein, DAF-FM, 10µM, Invitrogen, EUA), durante 30 minutos (10 minutos para MitoSOX) a 37°C em meio DMEM, sem fenol red e sem SFB. Após a marcação, foi realizado o tratamento na célula e imediatamente após a adição da LDLox iniciou-se a medição da intensidade de fluorescência das sondas. As leituras da intensidade de fluorescência foram realizadas a partir do fundo da placa a cada 15 minutos durante o período de estímulo de 4 horas com uso de monocromador, nos comprimentos 490/530nm (emissão/excitação) para as sondas H<sub>2</sub>DCF-DA e H<sub>2</sub>DAF-DA e 510/580nm para a sonda MitoSOX. Para as leituras, foi utilizado um leitor de microplacas Cytation<sup>™</sup> 5 (Bio Tek Instruments) configurado para manter a temperatura a 37°C e CO<sub>2</sub> a 5%. Foram utilizados como

controles positivos, 100 $\mu$ M de tBOOH (*Tert-Butyl hydroperoxide*), 10 $\mu$ M de SNAP (*S-nitroso-N-acetylpenicillamine*- doador de NO) e 10 $\mu$ M de antimicina A, para EROs total, óxido nítrico e superóxido mitocôndria, respectivamente. A produção intracelular para cada espécie reativa foi calculada a partir da intensidade de fluorescência para cada ponto de tempo descontando o valor inicial de cada poço. Os poços sem sonda foram utilizados como controle interno de autofluorescência.

### 5.15 Ensaio Multiplex para análise da via NF- $\kappa$ B

A fim de quantificar possíveis alterações na via de NF- $\kappa$ B, utilizamos o kit *NF- $\kappa$ B Signaling 6-plex Magnetic Bead Kit 96-well Plate* (Cat. # 48-630MAG) para a detecção multiplex quantitativa da fosforilação de proteínas da via do NF- $\kappa$ B (Ser536), FADD (Ser194), IKK $\alpha$ / $\beta$  (Ser177/Ser181) e I $\kappa$ B $\alpha$  (Ser32), bem como os níveis de proteína total de TNFR1 e c-Myc, em lisados celulares usando o sistema Luminex<sup>®</sup>. Para obtenção do lisado, foram plaqueadas 2x10<sup>5</sup> de EA. hy926 por poço em meio DMEM contendo 10% de SFB em placas de 12 poços. Após atingir a confluência, o meio foi trocado para DMEM sem SFB e realizado os tratamentos conforme descritos anteriormente. Após o tratamento, as células foram lavadas com PBS1x e adicionado 100  $\mu$ L por poço do tampão de lise MAP MILLIPLEX<sup>®</sup> gelado contendo inibidores de protease. O lisado celular foi recolhido, centrifugado à 16000 x g por 20 minutos à 4°C para extração das proteínas, e então, o sobrenadante foi alíquotado e mantido a -80°C até o momento do uso.

Para o ensaio multiplex, as beads magnéticas, soluções controles, tampão de lavagem, soro matriz e padrões foram preparados e homogeneizados conforme as instruções descritas no kit. Resumidamente, foram adicionados 25  $\mu$ L dos padrões, soluções controles e amostras na placa magnética de 96 poços, lavada previamente com o tampão de lavagem. Em seguida, 25  $\mu$ L de tampão de ensaio foi adicionado às amostras, 25  $\mu$ L do soro matriz aos padrões e, 25  $\mu$ L de beads magnéticas revestidas com anticorpos específicos a todos os poços (controles, padrões e amostras). A placa foi selada com selante próprio, revestida com papel alumínio e incubada por 20 horas a 4°C, sob agitação no *shaker*. Após esse período, a placa foi lavada duas vezes com 200  $\mu$ L de tampão de lavagem e incubada com 25  $\mu$ L de anticorpo de detecção ligado a biotina à temperatura ambiente, por uma hora, no *shaker*. Para completar a reação, 25  $\mu$ L de ficoeritrina conjugada à estreptavidina foi adicionada e incubada por 15 minutos, protegida da luz à temperatura ambiente, sob agitação. Transcorrido esse tempo, foi acrescentado 25  $\mu$ L

tampão de amplificação e incubada à temperatura ambiente, por uma hora, no *shaker*. A placa foi então lavada duas vezes e incubada com 150 µL de tampão de ensaio MILLIPLEX® MAP por cinco minutos à temperatura ambiente, no *shaker*. Em seguida, foi realizada a leitura da placa pelo equipamento LUMINEX xMAP MAGPIX, utilizando o *software* xPONENT (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). Após leitura das amostras, os dados foram analisados pelo programa *Analyst* (Merck Millipore). Os resultados foram expressos em intensidade mediana de fluorescência corrigido pela proteína da amostra.

#### 5.16 Ensaio de migração celular (EA. hy926)

A atividade de migração de EA. hy926 foi medida por meio do ensaio de migração celular por cicatrização de fenda (*Wound Healing*). Foram utilizadas para este ensaio placas de 24 poços, nas quais foram semeadas  $1 \times 10^5$  células por poço em meio DMEM contendo 10% de SFB. Após atingir 80% de confluência, as células foram mantidas *overnight* em meio reduzido de soro contendo 1% SFB. As culturas de células foram riscadas uniformemente utilizando uma ponteira de 200µL esterilizada, para formação da fenda (área livre de células). Posteriormente, foram lavadas duas vezes com meio sem soro para a retirada de células não aderidas e incubadas com meio contendo 1% de SFB. Em seguida, as células foram pré-incubadas durante 30 minutos com fucoidan (1, 5 e 10 µg/mL) e co-incubadas com 50 µg/mL de LDLox até o fechamento de um dos tratamentos. A captura das imagens da área da ferida foi realizada por meio de microscópio invertido com contraste de fase (objetiva de 10x/0.25, Plan e câmera OPTON TCN-0.46x) nos tempos de (0, 6, 12, 18, 24 e 30 horas), sendo o tempo zero imediatamente após a realização da ferida. As imagens foram capturadas no mesmo ponto nos diferentes períodos de tempo totalizando cinco poços por tratamento. As imagens foram analisadas utilizando o software TScratch, o qual fornece a porcentagem de área livre de célula na imagem. Com este valor, foi calculado a taxa de fechamento (% de migração) segundo a fórmula:  $((\% \text{ de área aberta no tempo inicial} - \% \text{ de área aberta do tempo posterior}) / \% \text{ de área aberta no tempo inicial}) \times 100$ .

#### 5.17 Reatividade vascular para análise da função endotelial

A montagem da aorta foi feita conforme descrito anteriormente (CAPETTINI; CORTES; LEMOS, 2010). Camundongos *ApoE<sup>-/-</sup>* e C57BL/6 foram sacrificados por decapitação e a aorta

torácica foi cuidadosamente removida, retirando-se o excesso de tecido adiposo e conjuntivo. A artéria foi dividida em anéis de aproximadamente 2-3 mm. Os anéis aórticos dos animais *ApoE*<sup>-/-</sup> foram incubados somente com fucoidan e os anéis de animais C57BL/6 com LDLox e fucoidan conforme relatados para a cultura de células EA. hy926.

Para obtenção do registro de tensão isométrica, os anéis foram montados em cubas para órgão isolado contendo solução de Krebs-Henseleit (em mmol/L: NaCl, 118,3; KCl, 4,7; MgSO<sub>4</sub>, 1,2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2; CaCl<sub>2</sub>, 2,5; NaHCO<sub>3</sub>, 25; glicose, 11,1), aerada continuamente com mistura carbogênica (95% de O<sub>2</sub> + 5% de CO<sub>2</sub>), mantida à temperatura de 37°C e pH=7,4. Duas hastes metálicas triangulares foram colocadas através do lúmen dos vasos. Um dos triângulos foi fixado na base, e o outro conectado verticalmente a um transdutor de tensão isométrica. Após a montagem, os anéis aórticos foram submetidos a uma tensão de repouso de 0,5 g, regulada na primeira hora do experimento para estabilização da preparação. Durante esse período, a solução nutritiva foi trocada a cada 15 minutos, os registros experimentais foram feitos com o uso de transdutores de tensão isométrica, conectados a um amplificador, sendo este acoplado a um computador equipado com uma placa conversora analógico-digital utilizando-se o programa Windaq para aquisição e análise dos dados experimentais. Curvas concentração-resposta cumulativas foram construídas em resposta a acetilcolina, em vasos pré-contráídos com fenilefrina, contendo endotélio funcional.

#### **5.18 Isolamento e cultivo de macrófagos peritoneais**

Usando uma agulha 25G foi injetado 2 ml de meio de tioglicolato estéril 3%, no peritônio de camundongos *ApoE*<sup>-/-</sup>. Após 3 dias os animais foram submetidos a eutanásia para extração dos macrófagos peritoneais. Após anestesia, colocou-se o animal na câmara de fluxo laminar em decúbito dorsal sobre um tabuleiro revestido com um resguardo. Posteriormente, com uma seringa descartável de 10 ml foi injetado na cavidade abdominal PBS1x estéril, de modo a não atingir nenhum órgão ou vaso sanguíneo, usando uma agulha 25G com o bisel virado para cima. Após 1 minuto da aplicação, foi feita a colheita do líquido com a mesma seringa e transferido para um tubo de 15ml. Centrifugou-se o líquido recolhido da cavidade peritoneal do camundongo durante 10 minutos a 500 x g a 4°C. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensionado com a adição de meio de cultura (RPMI –completo com soro fetal bovino a 10%) para aderir em placa e posteriormente a realização do tratamento.

### 5.19 Avaliação da captação de LDLox em macrófagos peritoneais de camundongos

A análise da captação *ex vivo* de LDLox foi realizada nos macrófagos peritoneais obtidos de animais *ApoE*<sup>-/-</sup>, após marcação com *Nile Red* (Nile Red: Sigma, Brazil, Ltda) por citometria de fluxo. Resumidamente, macrófagos foram semeados em placas de 96 poços (fundo em U),  $5 \times 10^5$  células por poço em meio RPMI sem SFB. Posteriormente, foi acrescentado o fucoidan nas concentrações de 1, 5 e 10  $\mu\text{g/mL}$  30 minutos antes do estímulo com 50  $\mu\text{g/mL}$  de LDLox por 4 horas. Após a incubação, as células foram centrifugadas a 500 x g, por 5 minutos, lavadas uma vez com PBS-Wash e então, procedeu com a marcação. Foi realizado a marcação com anticorpo anti-F4/80-Pe-cy7 (eBioscience, San Diego, CA, USA), durante 30 minutos, a 4°C, na ausência de luz. Após essa etapa, as células foram lavadas novamente com PBS-Wash e prosseguiu-se com a marcação com *Nile Red* (0,1  $\mu\text{g/mL}$ , diluída em PBS) durante 10 minutos. Em seguida, foram lavadas 2 vezes com PBS e fixadas com 2% de paraformaldeído em PBS 1x durante 30 minutos. As leituras foram realizadas utilizando o citômetro de fluxo FACSCanto™ II (BD Biosciences, San Diego, CA USA) usando laser de excitação 488nm e filtro de emissão de 585/42 e 780/60 para *Nile Red* e F4/80, respectivamente. A aquisição de dados foi realizada utilizando o software BD Facs Diva fornecido pelo fabricante. Primeiramente, foi feita a exclusão de células agrupadas (*doublets*) utilizando os parâmetros (FSC-A x FSC-H). Posteriormente, utilizando os parâmetros SSC-A x FSC-A, foi selecionada a população com características de macrófagos. Para caracterizar os macrófagos, consideramos as células marcadas positivamente para F4/80. Foram adquiridos 10.000 eventos por amostra e os dados de intensidade mediana de fluorescência de células positivas para *Nile Red* foram analisados sob a forma de histogramas. Para análise dos dados adquiridos, foi utilizado o software FlowJo v10.0.6 (Tree Star Inc., EUA).

### 5.20 Avaliação da captação de LDLox e expressão de CD36 e SRA de superfície em RAW 264.7

A avaliação da captação *in vitro* de LDLox e expressão dos receptores *scavenger* CD36 e SRA de superfície, foram realizadas em macrófagos murino da linhagem RAW 264.7, por citometria de fluxo. Foram semeadas em placas de 96 poços (fundo em U)  $5 \times 10^5$  células por

poço em meio DMEM, sem SFB. Posteriormente, acrescentou o fucoidan nas concentrações de 1, 5 e 10µg/mL 30 minutos antes do estímulo com 50µg/mL de LDLox por 4 horas. Após a incubação, as células foram centrifugadas a 500 x g, por 5 minutos e procedeu com a marcação. Para avaliar a captação de LDLox, as células foram coradas com Nile Red (conforme descrito anteriormente). A marcação para avaliação da expressão de CD36 e SRA de superfície celular, foi realizada utilizando-se anticorpos primários anti-CD36 de camundongo (camundongo anti-camundongo, Santa Cruz) e anti-SRA (cabra anti-camundongo, Santa Cruz), incubados durante 30 minutos, a 4°C. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com PBS-Wash e incubadas durante 30 minutos com o anticorpo secundário. Foram utilizados como anticorpo secundário FITC-coelho anti-camundongo e APC-macaco anti-cabra para CD36 e SRA, respectivamente. Após a marcação, as células foram lavadas 2 vezes com PBS e fixadas com 2% de paraformaldeído em PBS1x durante 30 minutos em temperatura ambiente. As células coradas com Nile Red foram lidas utilizando laser de excitação 488nm e filtro de emissão de 585/42. As células marcadas com FITC-CD36 e APC-SRA foram lidas utilizando laser de excitação (488nm e 633nm) e filtro de emissão (530/30 e 661/16), respectivamente. A aquisição de dados foi realizada utilizando o citômetro de fluxo Calibur (Beckton Dickinson, EUA), através do software BD CellQuest Pro fornecido pelo fabricante. A delimitação da população das células foi realizada com base no tamanho e complexidade interna (parâmetros FSC e SSC, respectivamente). Foram adquiridos 10.000 eventos por amostra. Os dados foram calculados subtraindo a autofluorescência celular da fluorescência das amostras tratadas e expressas como intensidade mediana de fluorescência. Para análise dos dados adquiridos, foi utilizado o software FlowJo v10.0.6 (Tree Star Inc., EUA).

### **5.21 Avaliação da formação de células espumosas em RAW 264.7**

A formação de células espumosas foi avaliada, utilizando a marcação com o corante *Oil red O powder* (Sigma-Aldrich), com base em um protocolo previamente publicado (XU et al., 2010). Resumidamente, macrófagos RAW 264.7 foram semeados numa placa de 24 poços (1x 10<sup>5</sup> células/ poço; total 0,5 mL). Após 24 horas de tratamento com fucoidan e LDLox, as células tratadas foram lavadas com PBS, e fixada com paraformaldeído a 4% durante 10 minutos. As células fixadas foram lavadas com PBS três vezes e coradas durante 5 min com 200µL de solução de trabalho de *Oil Red O*, que continha 0,5g/ml de *Oil Red O* seco em 60% de isopropanol (v/v). O excesso de corante foi removido por uma rápida lavagem com isopropanol



a 60% e em seguida, foram lavadas com água destilada e contra-coradas com hematoxilina por 4 minutos. Finalmente, as células coradas foram lavadas com PBS três vezes e observadas com um microscópio invertido com contraste de fase (objetiva de 20x/0.25, Plan e câmera OPTON TCN-0.46x).

A quantificação do conteúdo lipídico total foi medida após coloração com *Oil red O*, e o lipídio intracelular foi extraído adicionando 200  $\mu$ L de isopropanol a cada poço. Após 5 min na temperatura ambiente, os 200  $\mu$ L de solução de cada poço foi transferido para uma placa de 96 poços. A absorbância foi medida a 500 nm com um leitor de microplacas. Os resultados quantificados foram corrigidos após experimentos paralelos de ensaio de viabilidade celular.

## 5.22 Análise estatística

Os dados foram verificados quanto à hipótese nula de distribuição Gaussiana através dos testes de D'Agostino & Pearson e Shapiro-Wilk (considerando  $p > 0,05$ ). A comparação estatística entre os grupos foi realizada por *One-way analysis of variance* (One-way ANOVA), seguida com pós teste de comparações múltiplas de Tukey. As análises foram realizadas utilizando-se o software *GraphPad Prism 7.0* (GraphPad Software, San Diego California - USA). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão, para os dados com distribuição normal, e como mediana, quando não paramétricos. As diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significantes nos valores de  $p \leq 0,05$ .

## 6. RESULTADOS

Já foi demonstrado que o fucoidan possui diversas atividades biológicas de potencial valor medicinal, dentre as quais foi demonstrado recentemente efeitos antiaterogênicos. No entanto, os mecanismos envolvidos na ateroproteção ainda não foram totalmente elucidados. Assim, nós avaliamos o efeito do fucoidan no desenvolvimento da aterosclerose em camundongos *ApoE<sup>-/-</sup>*, bem como em aspectos associados ao estresse oxidativo e inflamação frente ao estímulo com LDLox (principal agente desencadeador da aterosclerose).

### Experimentos *in vivo*

Nós avaliamos se a suplementação da dieta com o fucoidan de *Cladosiphon okamuramus* modificaria o perfil aterogênico em camundongos *ApoE<sup>-/-</sup>*. Além disso, para o

investigarmos se fucoidan poderia atingir a circulação sistêmica e órgãos periféricos, avaliamos a cinética de absorção intestinal e a sua biodistribuição. Também foi investigado o efeito da administração oral do fucoidan sobre o recrutamento de leucócitos durante a inflamação crônica.

### 6.1 Efeito do fucoidan sobre os parâmetros de crescimento e ingestão alimentar

Em um primeiro momento, examinamos como a suplementação do fucoidan (em dietas padrão e hipercolesterolemiantes) afetaria a ingestão alimentar e o peso corporal dos animais. Não foi encontrada diferença no consumo e no peso corporal, bem como, no ganho de peso entre os grupos (Tabela 3). Apesar do consumo e crescimento similar, o peso relativo do baço e do fígado foram influenciados pela dieta hipercolesterolemiantes (DHC), sendo observado um aumento de aproximadamente 27% e de 8%, respectivamente, quando comparado aos grupos que receberam as dietas padrão (DP e DP + Fuc 1%). Porém, os animais que receberam o fucoidan na dieta hipercolesterolemiantes (DHC + Fuc 1%) tiveram os mesmos valores de peso que os demais grupos. Em relação ao peso relativo do músculo e do tecido adiposo epididimal (TAE), não foi observado diferença entre os diferentes grupos.

**Tabela 3.** Ingestão alimentar, crescimento corporal e peso relativo do baço, do fígado, do músculo e da gordura epididimal em camundongos *ApoE<sup>-/-</sup>* alimentados com DP ou DHC com ou sem fucoidan durante 10 semanas.

Parâmetros	DP	DP + Fuc 1%	DHC	DHC + Fuc 1%
<b>Ingestão diária/animal (g)</b>	3,17 ± 0,49	3,08 ± 0,36	3,03 ± 0,32	3,19 ± 0,33
<b>Peso inicial (g)</b>	18,49 ± 1,54	18,51 ± 1,36	19,18 ± 1,61	19,02 ± 1,32
<b>Peso final (g)</b>	27,09 ± 1,85	26,27 ± 2,00	26,70 ± 1,35	26,91 ± 1,31
<b>Ganho de peso (g)</b>	8,03 ± 0,93	7,75 ± 0,95	7,52 ± 1,21	7,88 ± 1,67
<b>Baço (% PC)</b>	0,36 ± 0,11 <sup>a</sup>	0,36 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,49 ± 0,09 <sup>b</sup>	0,43 ± 0,08 <sup>ab</sup>
<b>Fígado (% PC)</b>	3,77 ± 0,19 <sup>a</sup>	3,65 ± 0,35 <sup>a</sup>	4,02 ± 0,18 <sup>b</sup>	3,93 ± 0,29 <sup>ab</sup>
<b>Músculo (% PC)</b>	1,15 ± 0,16	1,18 ± 0,06	1,22 ± 0,09	1,22 ± 0,08
<b>TAE (% PC)</b>	0,87 ± 0,44	0,90 ± 0,25	0,96 ± 0,39	0,92 ± 0,40

Fuc, fucoidan; DP, dieta padrão; DHC, dieta hipercolesterolemiantes; TAE, tecido adiposo epididimal.

% PC = peso do tecido/peso corporal x 100.

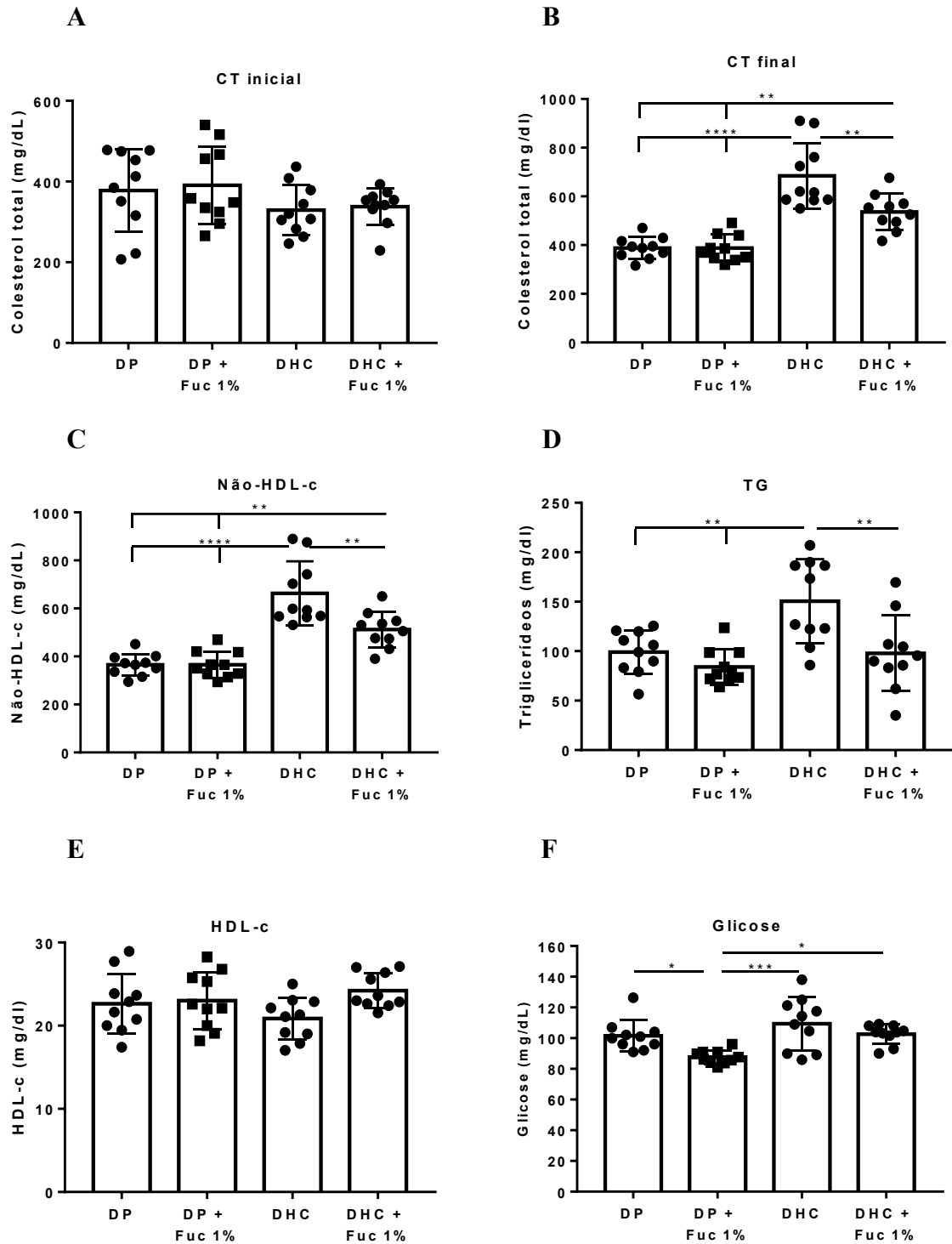
Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=10). Médias com diferentes letras sobrescritas indicam diferença significativa na mesma linha (p<0,05. One-way ANOVA + teste de Tukey).

## 6.2 Fucoidan melhora os parâmetros lipídicos séricos em camundongos *ApoE*<sup>-/-</sup>

Em seguida, avaliamos se a suplementação da dieta com o fucoidan modificaria o perfil sérico de lipídios e de glicose em camundongos *ApoE*<sup>-/-</sup> alimentados com a dieta padrão e hipercolesterolemiantes após 10 semanas de tratamento. Para isso, o colesterol total (CT), colesterol-HDL (HDL-c), colesterol não-HDL (não-HDL-c), triacilgliceróis (TG) e a glicemia foram mensurados.

Não houve diferença no conteúdo de colesterol total sanguíneo no início do experimento ( $358,87 \pm 81,42$  mg/dL) (Fig. 6A). No entanto, após as 10 semanas, os camundongos que foram alimentados com DHC tiveram um aumento da dislipidemia, como indicado por um aumento acentuado nos níveis plasmáticos de aproximadamente 76% de CT ( $684,21 \pm 133,93$ ), 81% de não-HDL-c ( $663,27 \pm 132,73$ ) e 52% de TG ( $150,52 \pm 42,56$ ) em comparação aos que receberam dieta padrão (DP) (Fig. 6B, C e D). Todavia, essa dislipidemia foi melhorada significativamente pelo consumo da dieta contendo fucoidan (DHC + Fuc 1%), onde foi observado uma redução de aproximadamente 22% ( $536,12 \pm 74,98$ ), 21% ( $512,16 \pm 74,77$ ) e 35% ( $97,80 \pm 38,34$ ) dos níveis séricos de CT, não-HDL-c e TG, respectivamente. Porém, não foram observadas diferenças estatísticas para a média das concentrações desses lipídeos entre os grupos que receberam as dietas padrão, CT (DP  $388,17 \pm 47,18$  vs. DP + Fuc 1%  $387,79 \pm 58,50$ ), não-HDL-c (DP  $365,65 \pm 47,64$  vs. DP + Fuc 1%  $365,36 \pm 58,44$ ) e TG (DP  $99,11 \pm 23,28$  vs. DP + Fuc 1%  $83,97 \pm 19,15$ ).

Quando nos remetemos à análise dos dados para HDL-c, observamos que os diferentes grupos foram estatisticamente iguais entre si, demonstrando que não foram influenciados pela dieta ou pelo fucoidan (Fig. 6E). A concentração de glicose foi influenciada pela suplementação do fucoidan na dieta padrão, sendo observado uma diminuição de  $101,56 \pm 10,10$  mg/dL no grupo DP, para  $87,61 \pm 4,42$  mg/dL no grupo suplementado (Fig. 6F).



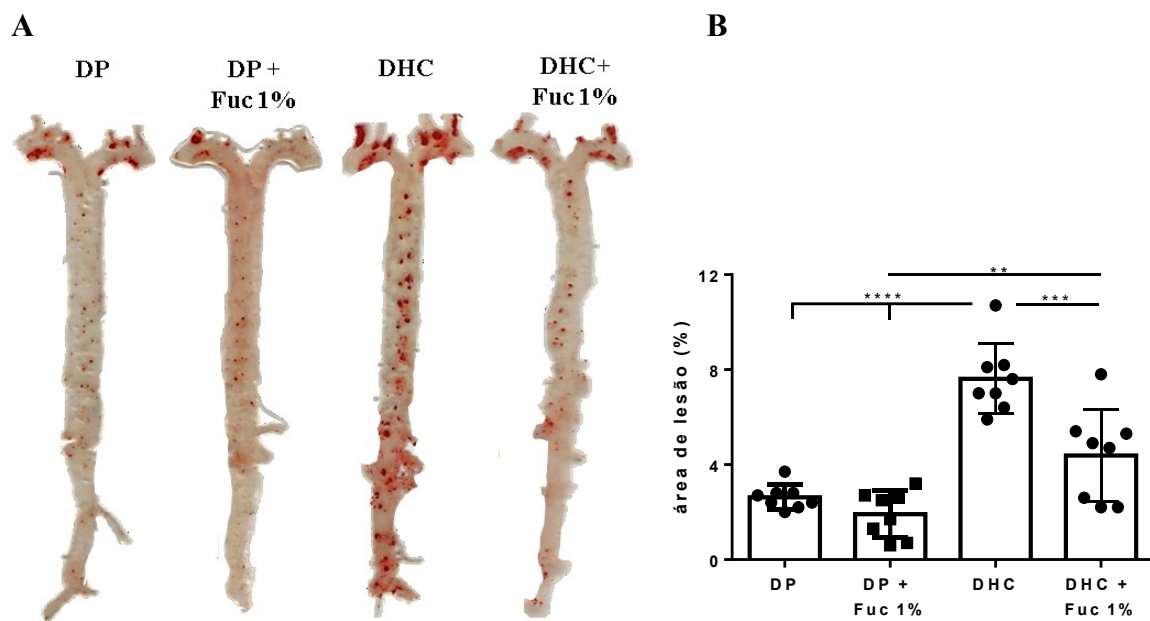
**Figura 6.** Efeito do fucoidan no perfil lipídico e na glicemia em camundongos *ApoE<sup>-/-</sup>*.

Os animais foram alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hipercolesterolemia (DHC) com ou sem fucoidan (Fuc 1%) durante 10 semanas. As amostras de soro foram coletadas após 12 h de jejum. Foram avaliados os níveis de **A:** colesterol total inicial (CT inicial), **B:** Colesterol total final (CT final), **C:** fração aterogênica (não-HDL-c), obtido através do CT - HDL-c, **D:** triglicerídeos (TG), **E:** colesterol de lipoproteína de alta densidade (HDL-c) e **F:** glicose. As barras representam a média e as linhas verticais representam o desvio padrão da média (n=10). \* P < 0,05, \*\* P < 0,01 e \*\*\* P < 0,001, determinado por *One-way ANOVA*, seguida pelo teste de Tukey.

### 6.3 Fucoidan reduziu o desenvolvimento de placas ateroscleróticas em camundongos *ApoE*<sup>-/-</sup>

A fim de avaliar o efeito do consumo de fucoidan no desenvolvimento de lesões ateroscleróticas, foi quantificado a área de lesão na aorta pelo método de coloração de aortas *en face*, utilizando o corante lipofílico SUDAN-IV.

É possível notar que a dieta hipercolesterolemia induziu significativamente a formação de lesões na artéria aorta em camundongos *ApoE*<sup>-/-</sup>, enquanto a administração de fucoidan foi capaz de atenuar o desenvolvimento de placas ateroscleróticas causado pela DHC (Fig. 7A). Em comparação com a DP, a DHC quase triplicou (DP  $2,63 \pm 0,62$  vs. DHC  $7,61 \pm 1,48$ ) a porcentagem de lesões na íntima da aorta (Fig. 7B). Notadamente, a suplementação com fucoidan resultou em uma redução de quase 50% (DHC  $7,61 \pm 1,48$  vs. DHC + Fuc 1%  $4,39 \pm 1,95$ ) de lesões induzida pela DHC, não se diferenciando ao grupo DP. Por outro lado, não foi observada nenhuma influência da suplementação do fucoidan na quantidade de lesões na aorta dos animais que receberam dietas padrão (DP  $2,63 \pm 0,52$  vs. DP + Fuc 1%  $1,91 \pm 0,98$ ).

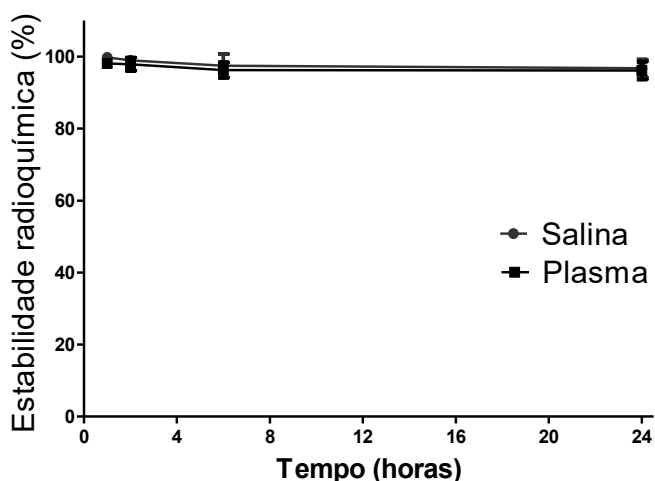


**Figura 7.** Efeito do fucoidan sob lesões ateroscleróticas na íntima da aorta em camundongos *ApoE*<sup>-/-</sup>. Os animais foram alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hipercolesterolemia (DHC) com ou sem fucoidan (Fuc 1%) durante 10 semanas. **A:** Imagens representativas mostrando a aparência da aorta em cada grupo dietético, coradas com Sudan IV. **B:** Quantificação da porcentagem de lesões ateroscleróticas. As barras representam a média e as linhas verticais o desvio padrão da média (n=8). \*\* P < 0,01 e \*\*\* P < 0,001, One-way ANOVA, seguida pelo teste de Tukey.

#### 6.4 Absorção do fucoïdan e biodistribuição em tecidos periféricos

Até o momento, foi demonstrado que a suplementação de fucoïdan reduziu a dislipidemia e atenuou o desenvolvimento da aterosclerose em camundongos *ApoE<sup>-/-</sup>* alimentados com dieta hipercolesterolemia após 10 semanas de tratamento. No entanto, não estava claro se o fucoïdan poderia atingir a circulação sistêmica para exercer esses efeitos. Assim, avaliamos a absorção e biodistribuição utilizando o fucoïdan radiomarcado com tecnécio-99m (<sup>99m</sup>Tc-Fuc) após a gavagem em camundongos *ApoE<sup>-/-</sup>*.

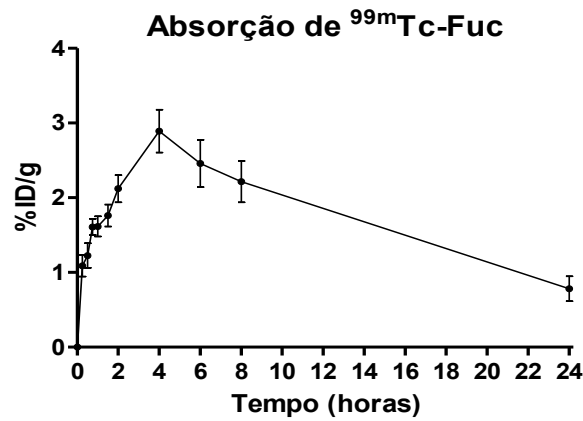
Inicialmente, foram confirmadas a pureza do <sup>99m</sup>Tc-Fuc usando cromatografia de camada delgada e a estabilidade em salina e no plasma de camundongos (Fig. 8). O resultado de rendimento da radiomarcção do composto <sup>99m</sup>Tc-Fuc apresentou uma pureza de  $98,22 \pm 1,24\%$ , sendo um valor aceitável de acordo com a Farmacopéia Americana que recomenda valores superiores a 90%. O <sup>99m</sup>Tc-Fuc apresentou alta estabilidade durante as 24 horas avaliadas tanto em salina e em plasma. Esse resultado, juntamente com a alta eficiência da radiomarcção, permite validar a utilização do <sup>99m</sup>Tc-Fuc para os ensaios de determinação de fucoïdan no plasma sanguíneo e nos tecidos.



**Figura 8.** Estabilidade *in vitro* do <sup>99m</sup>Tc-Fuc.

Estabilidade foi testada durante 24 horas na presença de solução salina, à temperatura ambiente e plasma murino, a 37 °C (n = 3).

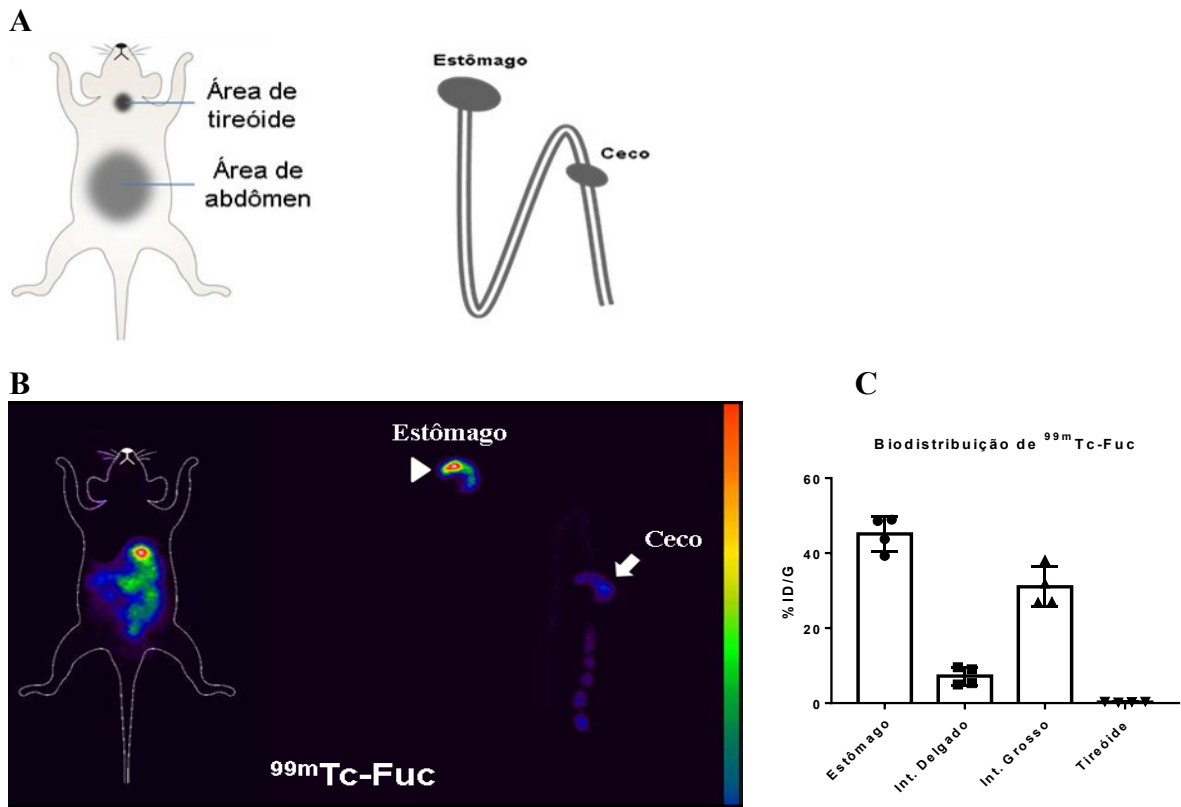
Uma vez confirmada a pureza e a estabilidade do complexo <sup>99m</sup>Tc-Fuc, foi avaliada a absorção desse composto em diferentes tempos durante 24 horas. A administração oral de <sup>99m</sup>Tc-Fuc demonstrou uma absorção fraca, sendo detectada inicialmente após 15 min ( $1,09 \pm 0,32\%$ ) da administração, chegando a uma detecção máxima no sangue de  $2,89 \pm 0,64\%$  da dose aplicada após 4 horas da gavagem (Fig. 9).



**Figura 9.** Cinética de absorção de  $^{99m}\text{Tc-Fuc}$  em camundongos  $ApoE^{-/-}$ .

Absorção de  $^{99m}\text{Tc-Fuc}$  no sangue após aplicação intragástrica em camundongos  $ApoE^{-/-}$ . Todos os pontos de dados representam a porcentagem média da dose aplicada por gavagem de 3,7MBq de  $^{99m}\text{Tc-fuc}$  e as linhas verticais o desvio padrão da média (n = 5).

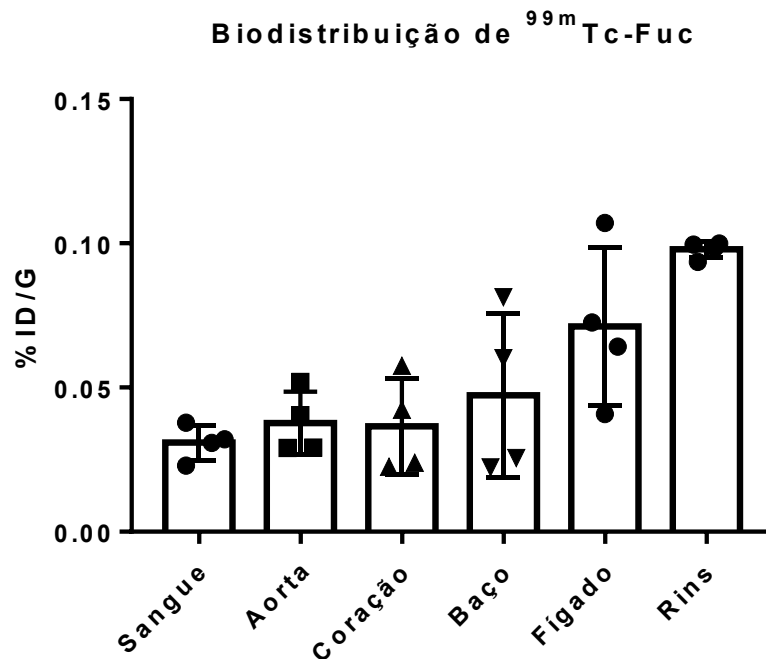
Foram realizadas imagens cintilográficas, usando camundongos  $ApoE^{-/-}$ , após 4 horas da administração do radiofármaco. Foi possível, evidenciar uma alta concentração de radioatividade na região abdominal e uma baixa radioatividade na região da tireóide (Fig.10B).



**Figura 10.** Imagens cintilográficas e biodistribuição do  $^{99m}\text{Tc-Fucoidan}$  no trato gastrointestinal (TGI) e tireóide. A biodistribuição foi realizada 4 horas após administração intragástrica de 3,7MBq de  $^{99m}\text{Tc-Fuc}$  em camundongos  $ApoE^{-/-}$ . **A:** Figura esquemática representando como o animal e o TGI foram dispostos. **B:** Imagens cintilográficas representativas de camundongos  $ApoE^{-/-}$  e do seu TGI capturadas por meio de uma gama câmara. **C:** Biodistribuição do  $^{99m}\text{Tc-Fuc}$  no TGI e tireóide. As barras representam a média e as linhas verticais representam o desvio padrão da média (n = 4).

Foi observado uma alta concentração da dose administrada de  $^{99m}\text{Tc}$ -Fuc pelo estômago ( $45,12 \pm 4,56\%$ ), intestino delgado ( $7,22 \pm 2,40\%$ ) e intestino grosso ( $31,03 \pm 5,30\%$ ), reforçando a baixa absorção do fucoïdan (Fig. 10C). A captação pela tireóide mostrou-se baixa ( $0,30 \pm 0,09\%$ ), indicando a pequena concentração de tecnécio livre ( $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ) e uma boa pureza do radiofármaco *in vivo*. Em casos de quebra da radiomarcagem e liberação do íon  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  teríamos alta captação na tireóide.

O próximo passo, foi avaliar o perfil de biodistribuição do  $^{99m}\text{Tc}$ -Fuc no tempo de 4 horas após a gavagem nos camundongos *ApoE*<sup>-/-</sup>. No geral, o estudo revelou baixa captação do complexo radiomarcado (Fig. 11).



**Figura 11.** Perfil de biodistribuição do  $^{99m}\text{Tc}$ -Fuc em camundongos *ApoE*<sup>-/-</sup>.

A biodistribuição foi realizada 4 horas após administração intragástrica de 3,7MBq de  $^{99m}\text{Tc}$ -Fuc em camundongos *ApoE*<sup>-/-</sup>. As barras representam a média e as linhas verticais representam o desvio padrão da média (n = 4).

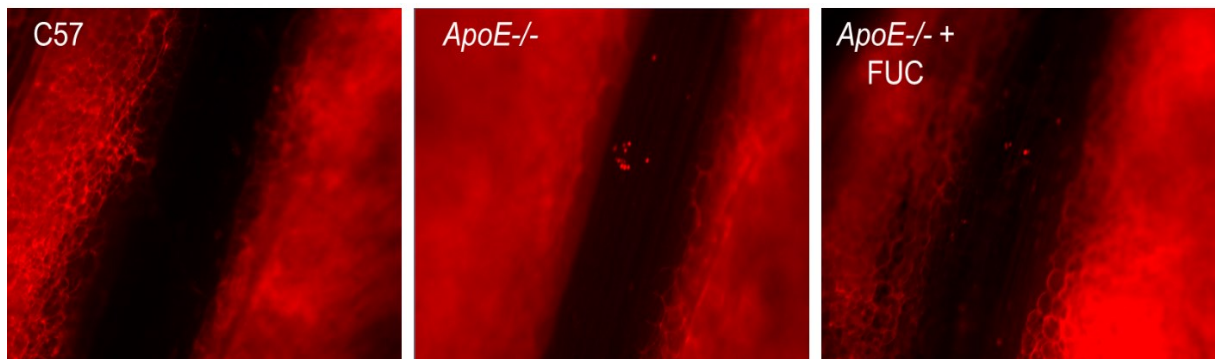
Assim, a presença do fucoïdan na circulação e nos tecidos após uma administração oral, apesar de ser pouco absorvido, indica que o fucoïdan pode exercer efeitos locais e sistêmicos. Os nossos próximos passos, foram para investigar os possíveis mecanismos pelos quais o fucoïdan exerce os seus efeitos.



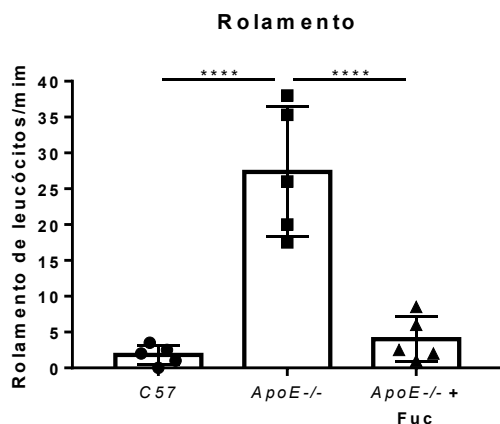
### 6.5 Fucoidan reduz o rolamento e adesão de leucócitos no endotélio vascular

Sabe-se que o recrutamento de monócitos se constitui num dos passos cruciais para o início e progressão da aterosclerose. Dessa forma, a fim de investigar se o fucoidan poderia interferir nesse processo, primeiramente, buscamos avaliar por microscopia de intravital o rolamento e adesão de leucócitos marcados com Rodamina 6G, na veia mesentérica de animais C57BL/6 (controle) e em camundongos *ApoE*<sup>-/-</sup>, após 4 h da administração intragástrica de fucoidan (100mg/kg) (Fig. 12A). Foi observado que o fucoidan reduziu significativamente tanto o rolamento (Fig. 12B), quanto a adesão (Fig. 12C) de leucócitos na veia mesentérica de animais *ApoE*<sup>-/-</sup>.

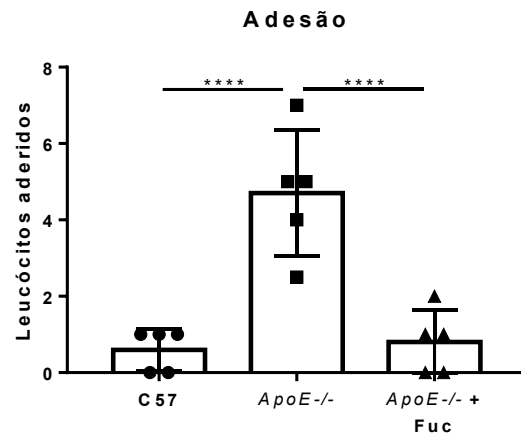
A



B



C



**Figura 12.** Avaliação do rolamento e adesão de leucócitos.

Os leucócitos foram marcados com rodamina 6G na veia mesentérica de animais *ApoE*<sup>-/-</sup>, após 4 horas da aplicação intragástrica de fucoidan (100mg/kg). (A) imagens representativas do ensaio (B) Rolamento; (C) Adesão leucocitária. As barras representam a média e as linhas verticais representam o desvio padrão, n= 5 \*\*\*\*p<0,0001; ANOVA seguido de teste de Tukey. As imagens foram capturadas usando objetiva 10x.

### **Experimentos ex vivo e in vitro**

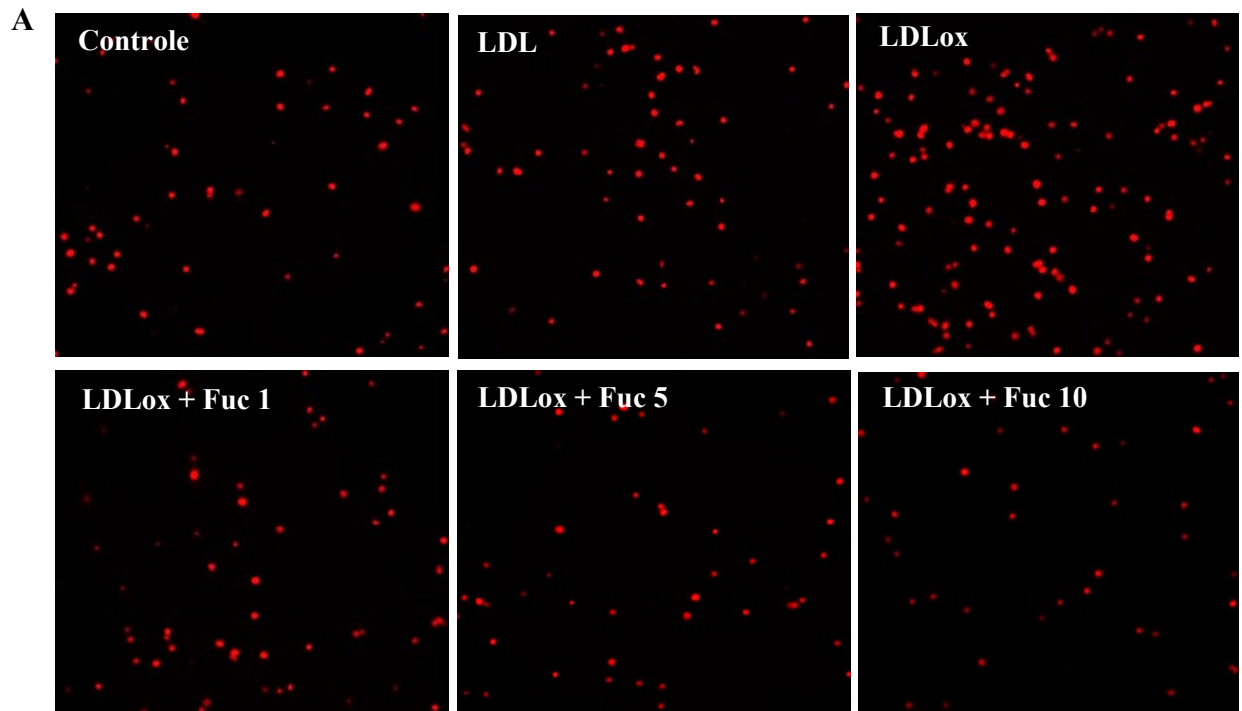
Conforme abordado anteriormente, a aterosclerose é uma doença de lenta progressão, e sua evolução envolve uma combinação de fatores, os quais levam a uma extensiva deposição e oxidação de LDL na íntima arterial. A presença de LDLox na íntima contribui para o estresse oxidativo e alterações inflamatórias no endotélio vascular, bem como para respostas imunes inata e adaptativa exacerbadas. Essa contínua resposta inflamatória, leva a um infiltrado progressivo de macrófagos, os quais são os principais precursores de células espumosas, que resulta, por fim, na formação de uma placa aterosclerótica.

Desta forma, para melhor entender o mecanismo pelo qual o fucoidan exerce uma atividade antiaterogênica, nós investigamos seus efeitos através de estudos *ex vivo* e estudos *in vitro*, utilizando aortas de camundongos C57BL/6 e ApoE<sup>-/-</sup>, bem como células endoteliais e macrófagos estimulados com LDL oxidada, principal componente desencadeador da aterogênese.

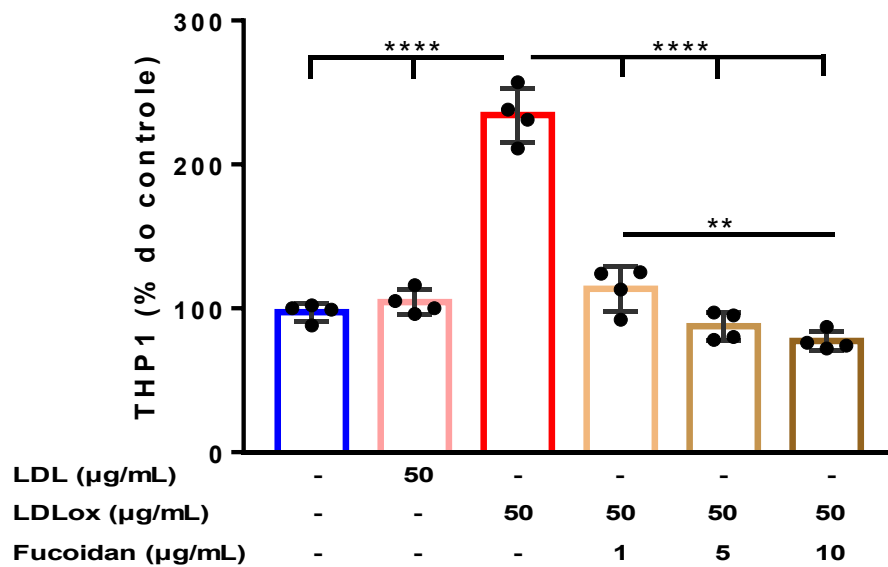
#### **6.6 Fucoidan reduz a adesão de THP-1 à monocamada de células endoteliais estimuladas com LDLox**

Como a LDLox é o principal desencadeador da adesão de leucócito no endotélio vascular durante o processo aterosclerótico, avaliamos se o fucoidan poderia prevenir a adesão de monócitos à monocamada de células endoteliais ativadas com LDLox. As imagens *in vitro* para a adesão de monócito THP-1 às células EA. hy926 estão apresentados na figura 13A.

A porcentagem de THP-1 aderida nas células endoteliais foi significativamente maior nas células estimulada com LDLox em relação as células dos controles (não tratada e tratada com LDL nativa) (Fig.13B). Por outro lado, os resultados mostraram que o fucoidan diminuiu a adesão de THP-1 às células endoteliais em todas as concentrações testadas. Este resultado corrobora com o resultado anterior observado no ensaio de intravital, onde após 4 horas da administração oral de fucoidan houve diminuição da adesão e rolamento de leucócitos totais na veia mesentérica de camundongos ApoE<sup>-/-</sup>.



**B**

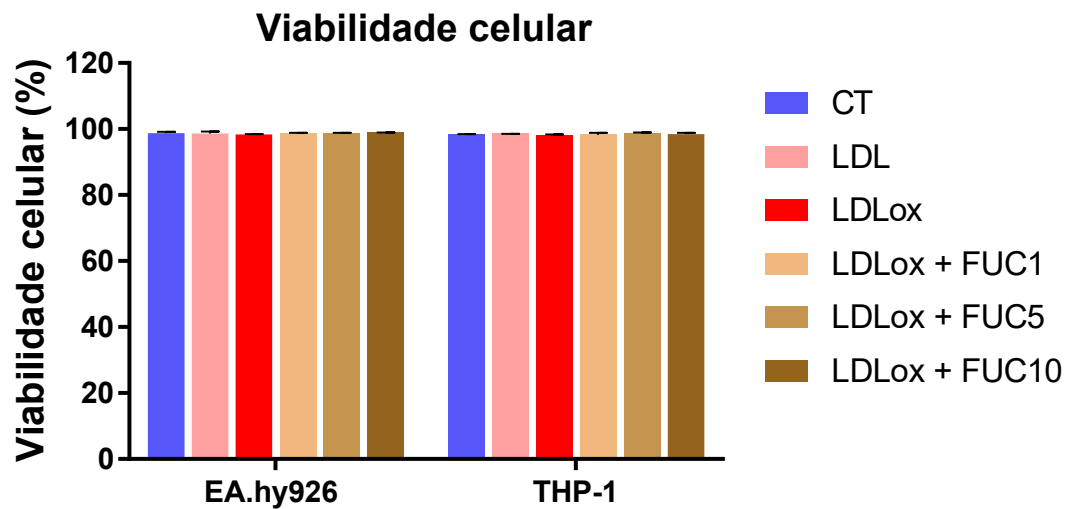


**Figura 13.** Efeito do fucoidan na adesão aumentada de THP-1 em células EA. hy926 estimuladas com LDLox. As células foram pré-incubadas com três concentrações de fucoidan (1; 5 e 10µg/mL) e após 30 min, co-incubadas com 50 µg/mL de LDLox por 4 (A) Microfotografias representativas dos diferentes tratamentos do ensaio de adesão de THP-1 marcado com CellTrace FarRed DDAO-SE (em vermelho) em monocamadas de células endoteliais. (B) Quantificação da porcentagem de THP-1 ligados por campo fotografado (5 campos para cada média). As barras representam a média e as linhas verticais representam o desvio padrão, n= 4 poços por grupo de pelo menos 2 experimentos separados. \*\*p<0,01 e \*\*\*\*p<0,0001; ANOVA seguido de teste de Tukey. As imagens foram capturadas usando objetiva 10x.

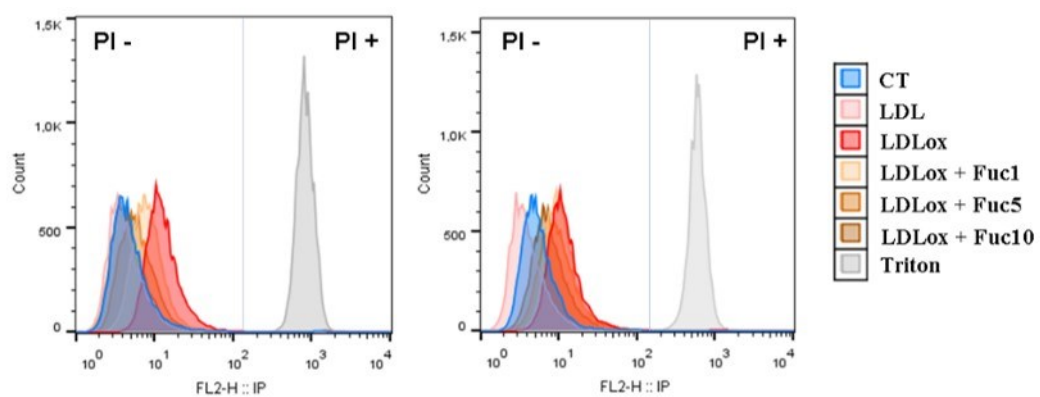
### 6.7 Fucoidan não afeta a viabilidade das células EA. hy926 e THP-1

A determinação da viabilidade celular é fundamental quando se avalia o efeito de uma droga para um determinado tipo celular, devido ao risco do comprometimento da investigação da resposta celular. Assim, neste estudo, o ensaio de viabilidade, foi realizado para saber se os tratamentos poderiam estar induzindo a morte das células (EA. hy926 e THP-1) e mascarando o efeito do fucoidan. Os dados de viabilidade obtidos usando iodeto de propídeo por citometria de fluxo após 4 horas de incubação com LDLox e fucoidan, mostraram que a viabilidade das células não foi afetada com os diferentes tratamentos utilizados (Figura 14).

A



B

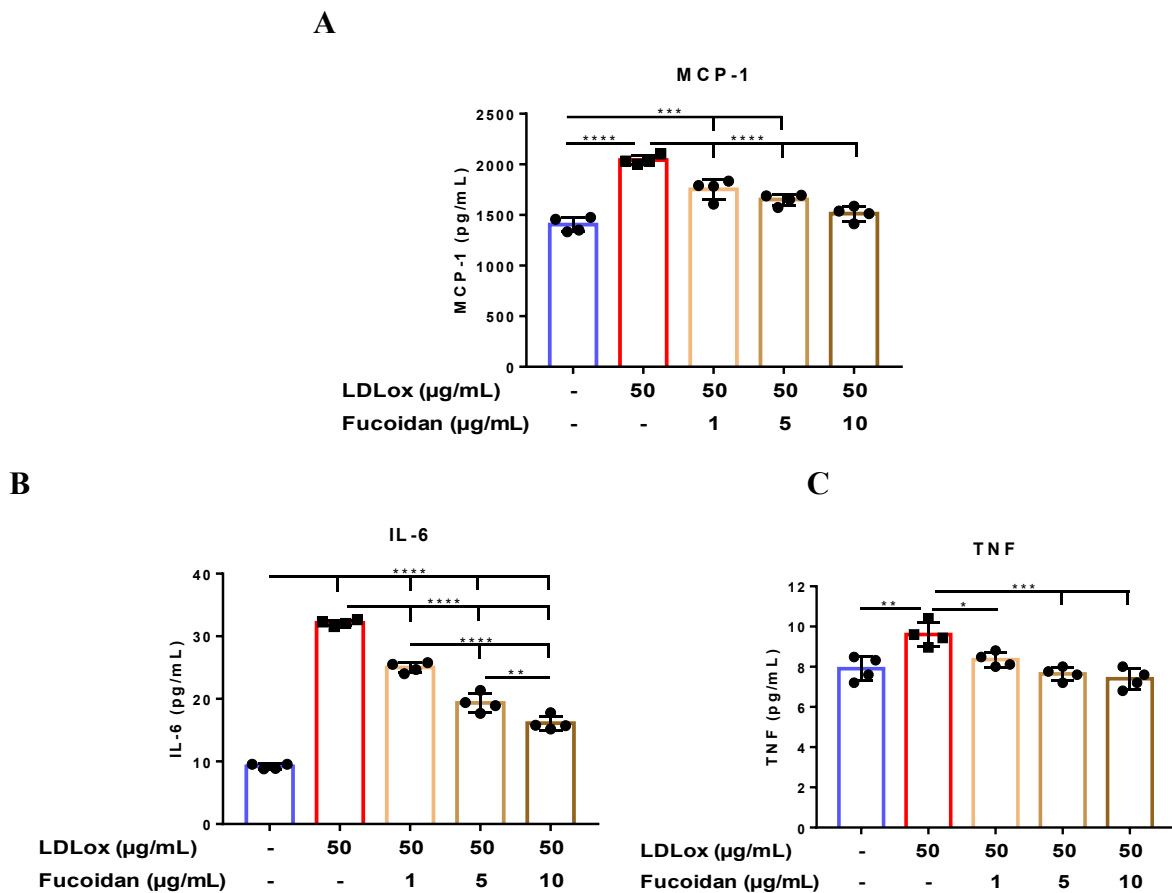


**Figura 14.** Efeito do fucoidan na viabilidade de células EA.hy926 e THP-1 estimuladas com LDLox.

As células foram pré-incubadas com três concentrações de fucoidan (1; 5 e 10 $\mu$ g/mL) e após 30 min, co-incubadas com 50  $\mu$ g/mL de LDL ou LDLox por 4 horas. **(A)** Viabilidade celular de EA. hy926 e THP-1, pelos diferentes tratamentos, obtida usando como marcador o iodeto de propídeo por citometria de fluxo. **(B)** Histogramas dos diferentes tratamentos sobrepostos, mostrando que a população negativa para iodeto de propídeo (PI-) não foi alterada em relação ao grupo controle (CT); Triton foi utilizado como controle positivo do ensaio (PI+). As barras representam a média e as linhas verticais representam o desvio padrão. ANOVA seguido de teste de Tukey, n= 4 poços por grupo de pelo menos 2 experimentos separados.

### 6.8 Fucoidan diminui a resposta inflamatória em EA. hy926 estimuladas com LDLox

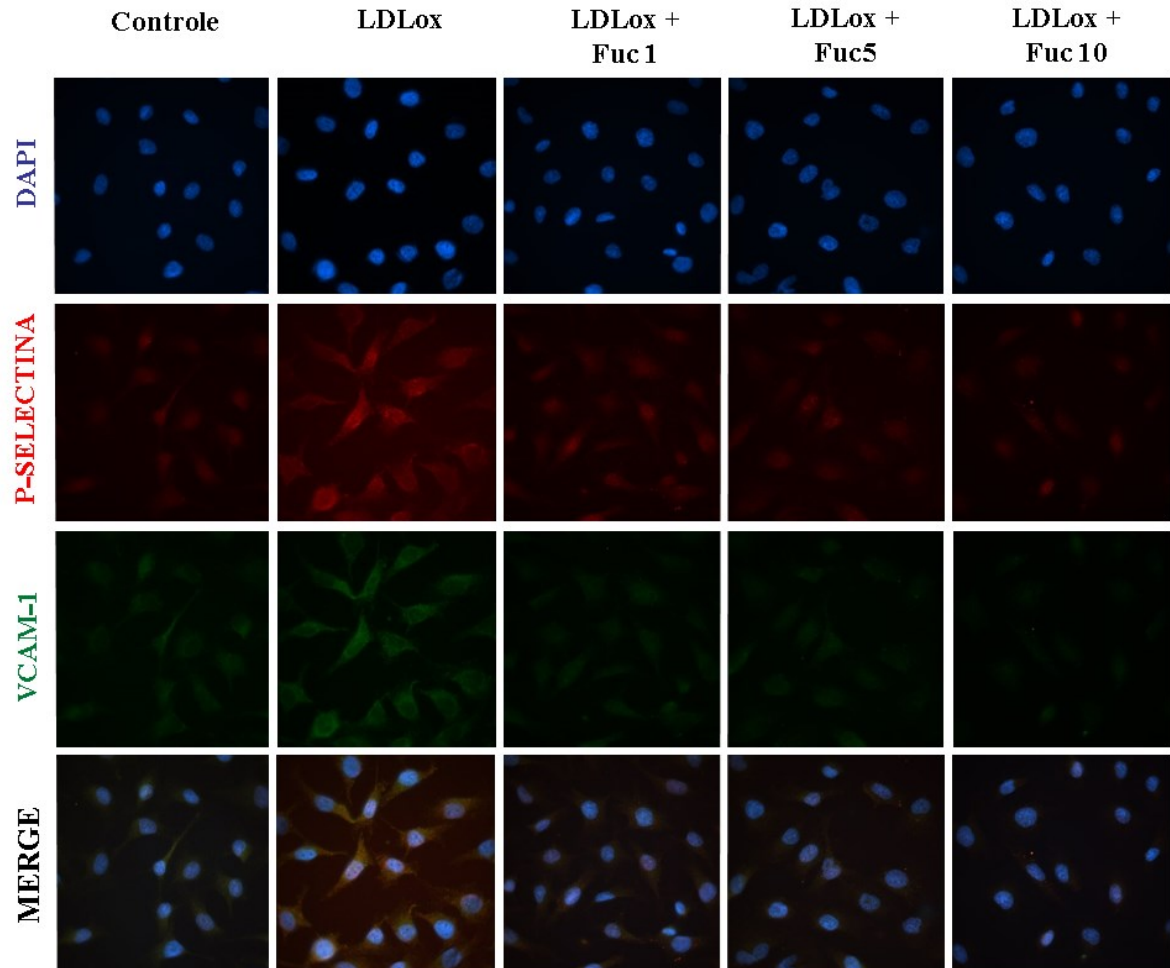
A presença de LDLox na camada íntima estimula a ativação das células endoteliais, levando à expressão de genes pró-inflamatórios, como os de moléculas de adesão, citocinas e quimiocinas, que induzem e guiam o recrutamento de monócito para o local inflamado. Assim, para explorar o efeito do fucoidan na resposta inflamatória em EA. hy926 estimuladas com LDLox, foi avaliado a produção de mediadores inflamatórios no sobrenadante e a expressão de moléculas de adesão na superfície celular. Foi observado um aumento significativo na concentração de MCP-1, IL-6 e TNF no sobrenadante das células estimuladas com LDLox quando comparado ao controle (Fig. 15 A, B e C). Porém, as células pré-tratadas com o fucoidan reduziram significativamente a produção de todos esses mediadores inflamatórios.



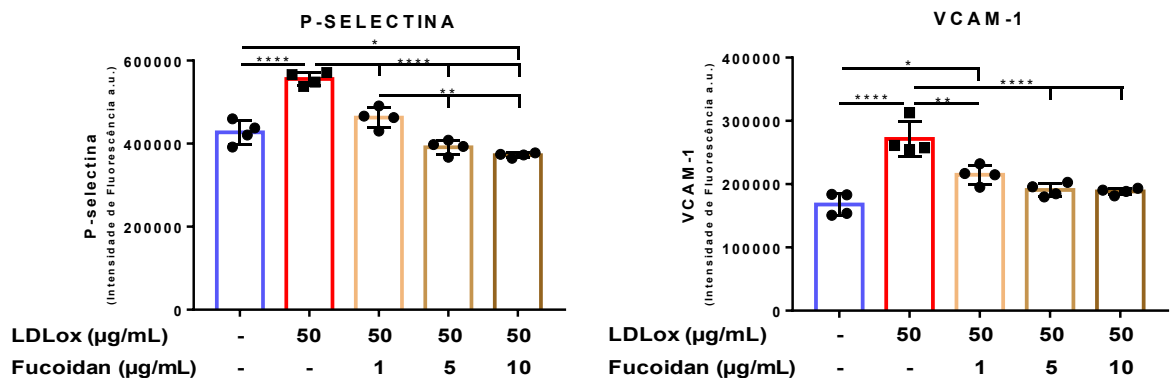
**Figura 15.** Efeito do fucoidan sobre a produção de MCP-1, IL-6 e TNF induzidos por LDLox em EA. hy926. As células foram incubadas com três concentrações de fucoidan (1; 5 e 10µg/mL) e após 30 min, co-incubadas com 50 µg/mL de LDLox por 4 horas. ELISA realizado em sobrenadante livre de célula para: **A:** MCP-1, **B:** IL-6 e **C:** TNF. As barras representam a média e as linhas verticais representam o desvio padrão. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; ANOVA seguido de teste de Tukey,  $n = 4$  poços por grupo de pelo menos 2 experimentos separados.

O fucoidan também foi capaz de atenuar a expressão de moléculas de adesão (Fig. 16A), P-selectina (Fig. 16B) e VCAM-1 (Fig. 16C), na superfície de EA. hy926 induzidas por LDLox.

A



B



**Figura 16.** Efeito do fucoidan na expressão de moléculas de adesão (P-selectina e VAM-1) em células EA. hy926 estimuladas com LDLox.

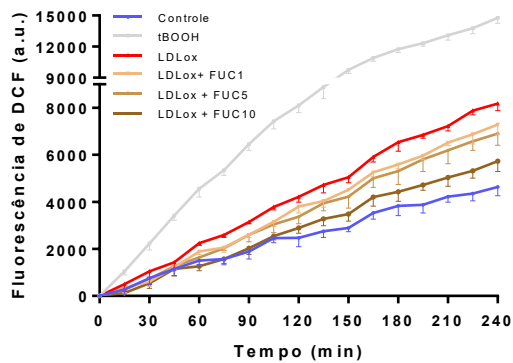
As células foram pré-incubadas com três concentrações de fucoidan (1; 5 e 10µg/mL) e após 30 min, co-incubadas com 50 µg/mL de LDLox por 4 horas (A) Microfotografias representativas dos diferentes tratamentos para marcação de p-selectina (vermelho) e VCAM-1 (verde) em células endoteliais. Quantificação da expressão de (B) p-selectina e (C) VCAM-1; Fluorescência corrigida pelo tamanho de cada célula e foi analisada de pelo menos 5 campos fotografados por poço. As barras representam a média e as linhas verticais representam o desvio padrão. ANOVA seguido de teste de Tukey, n= 4 poços por grupo de pelo menos 2 experimentos separados.

### **6.9 Fucoidan diminui o estresse oxidativo em EA. hy926 estimuladas com LDLox**

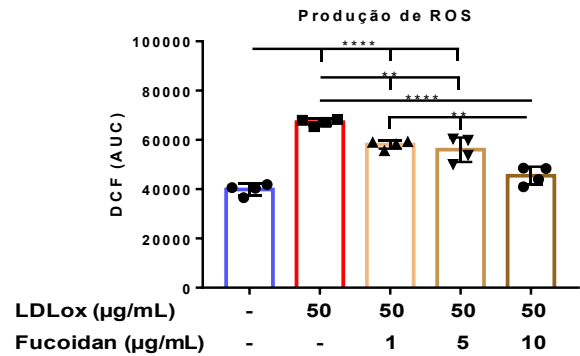
As espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs), induzidas pelo estímulo com LDLox, são responsáveis pelo aumento da resposta inflamatória na lesão aterosclerótica. Assim, através do uso de sondas específicas para a detecção intracelular de EROs, superóxido e óxido nítrico, nós investigamos o efeito do fucoidan na produção dessas espécies reativas em células endoteliais estimuladas com LDLox.

Os resultados de cinética, mostraram que a LDLox aumentou a produção intracelular de EROs, NO e superóxido mitocondrial, ao longo do período de 4 horas de incubação, quando comparados ao controle (Fig. 17 A, C e E). Entretanto, o fucoidan foi capaz de atenuar a produção intracelular dessas espécies ao longo do tempo, a valores próximo ao controle. Análise da área sob a curva (AUC) da cinética, revelou que a concentração de 10 $\mu$ g/mL de fucoidan, não diferiu do controle para EROs total e NO (Fig. 17 B e D).

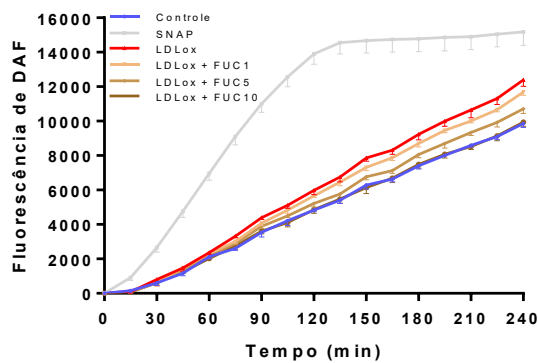
A



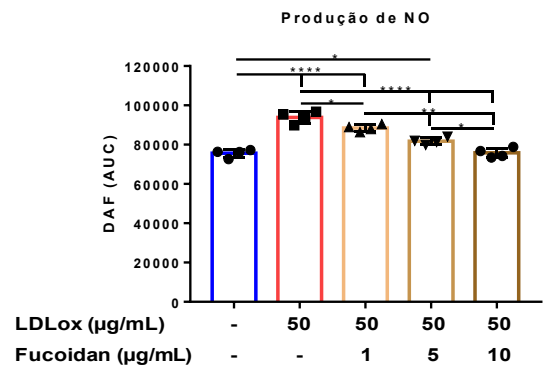
B



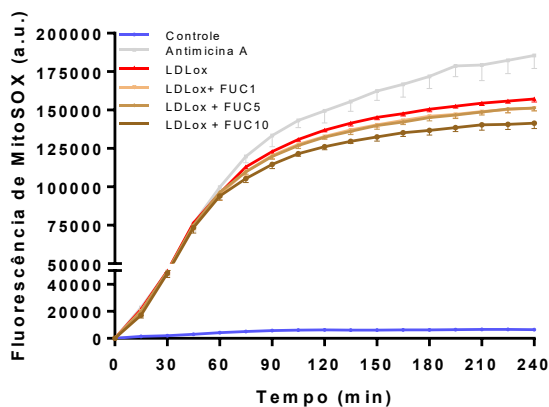
C



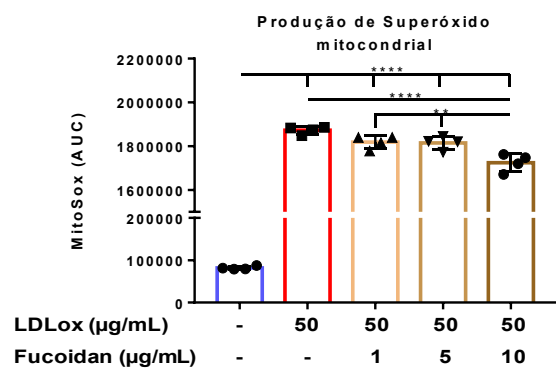
D



E



F



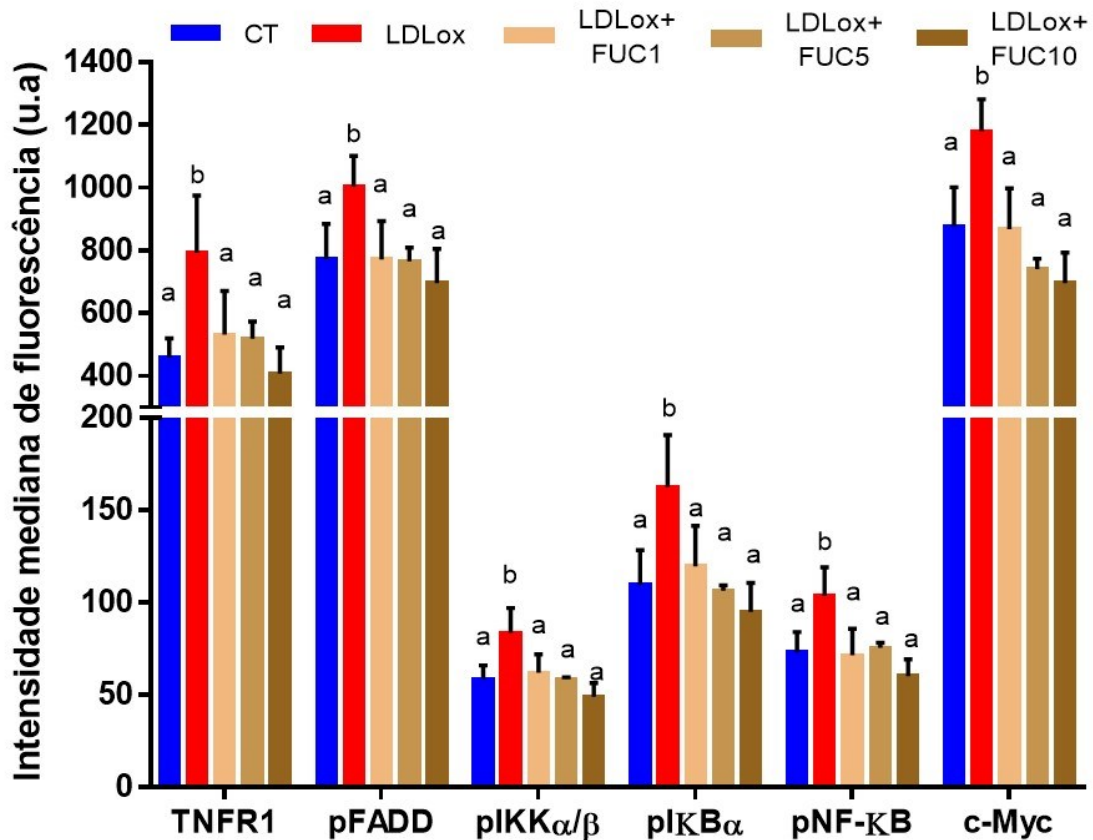
**Figura 17.** Efeito do fucoidan sobre o estresse oxidativo induzido por LDLox em EA. hy926.

As células foram pré-incubadas com três concentrações de fucoidan (1; 5 e 10 µg/mL) e após 30 min, co-incubadas com 50 µg/mL de LDLox por 4 horas. Durante o período de estímulo, foram realizadas medidas ao longo do tempo a cada 15 minutos da intensidade de fluorescência para DCF (A), DAF (C) e MitoSOX (E). Foi utilizado como controle positivo, para EROs (100 µM de tBOOH), NO (10 µM de SNAP) e para superóxido (10 µM de antimicina A). A área sob a curva foi calculada para cada grupo experimental de acordo com a sonda utilizada, para EROs (B), NO (D) e superóxido mitocondrial (E). Os valores são apresentados como média ± desvio padrão. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 e \*\*\*\*p<0,0001; ANOVA seguido de teste de Tukey, n= 4 poços por grupo.



### 6.10 Fucoidan diminui a ativação de NF- $\kappa$ B em EA. hy926 estimulada com LDLox

A geração de EROs e ERNs produzidas por LDLox em células endoteliais, pode levar a ativação de diversas vias, regulando a expressão de uma gama de genes pró-inflamatórios. Como a maioria desses genes tem sua transcrição ativada pelo fator de transcrição NF- $\kappa$ B, nós investigamos se a regulação de NF- $\kappa$ B está envolvida no efeito anti-inflamatório do fucoidan. Através da análise de multiplex foi possível observar, que a LDLox aumentou a quantidade de proteína total do receptor para TNF e cMyc, bem como ativação da via do NF- $\kappa$ B, conforme observado pelo o aumento da fosforilação de FADD, IKK $\alpha/\beta$ , I $\kappa$ B $\alpha$  e NF- $\kappa$ B (Fig. 18). Porém, o tratamento com fucoidan levou a uma diminuição da ativação dessa via, igualando ao controle.

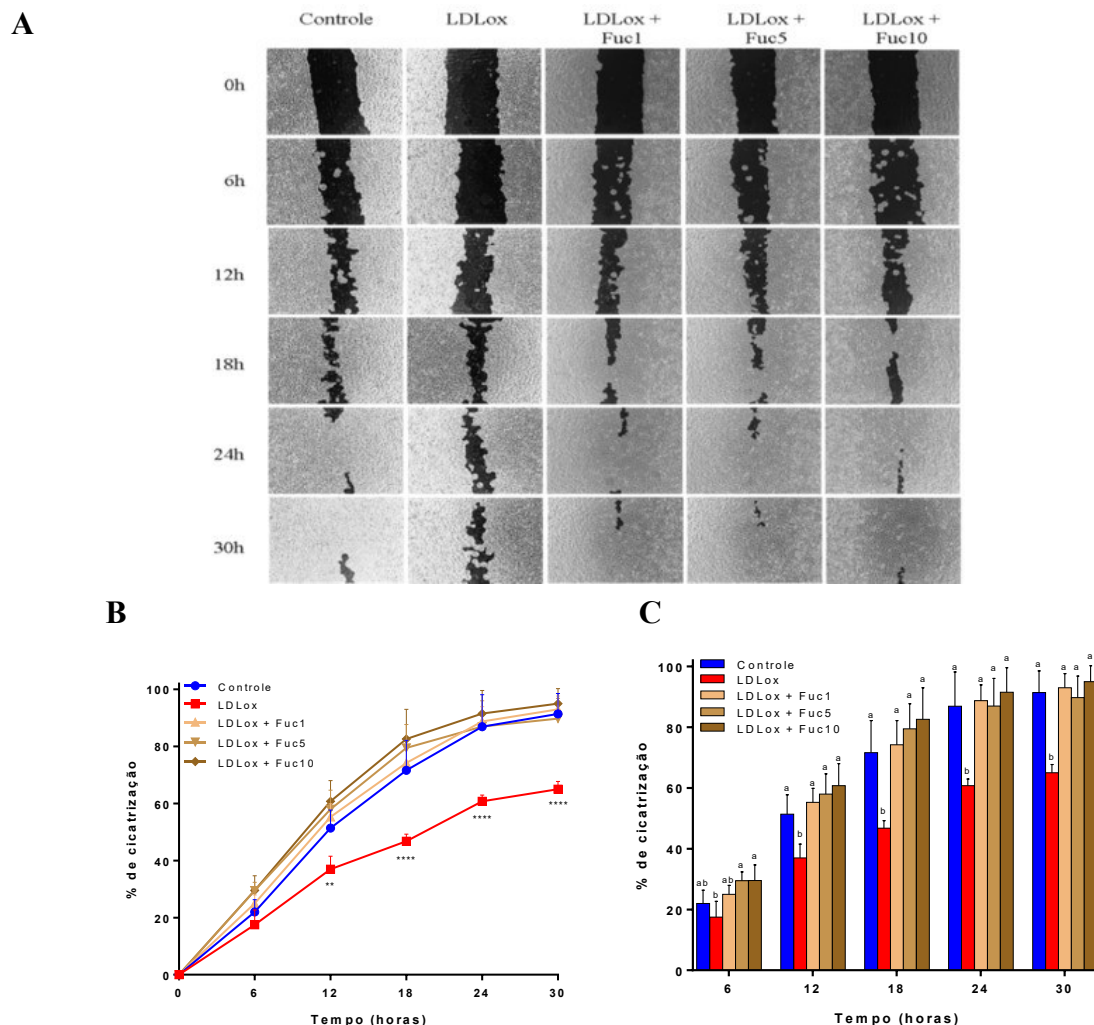


**Figura 18.** Efeito do fucoidan na via de NF- $\kappa$ B em células EA. hy926 estimuladas com LDLox.

As células foram pré-incubadas com três concentrações de fucoidan (1; 5 e 10 $\mu$ g/mL) e após 30 min, co-incubadas com 50  $\mu$ g/mL de LDLox por 4 horas. Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (n= 4). Médias com diferentes letras indicam diferença significativa no mesmo grupo de proteína analisada (p<0,05. One-way ANOVA + teste de Tukey).

### 6.11 Fucoidan inibe a ação anti-migratória da LDLox em células EA. hy926

A ativação de vias inflamatórias das células endoteliais pela LDLox, além de causar mudanças de seu fenótipo anti-inflamatório para um fenótipo pró-inflamatório, pode levar ao comprometimento das funções de barreira celular, induzindo distúrbios nas capacidades proliferativas e migratórias no endotélio vascular. Assim, exploramos o efeito do fucoidan sobre a migração de células endoteliais estimuladas com LDLox. As células que foram estimuladas com LDLox apresentaram uma redução na taxa de migração (Fig. 19 A), sendo observado uma taxa  $60,75\% \pm 2,21$ , enquanto o controle apresentou uma taxa de migração de  $95,5\% \pm 5,4$ , após 30 horas de ensaio (Fig. 19 B e C). Entretanto, as células que receberam o tratamento com fucoidan, foram capazes de reverter a redução da migração causada pela LDLox ( $98,5\% \pm 3,0$ ).

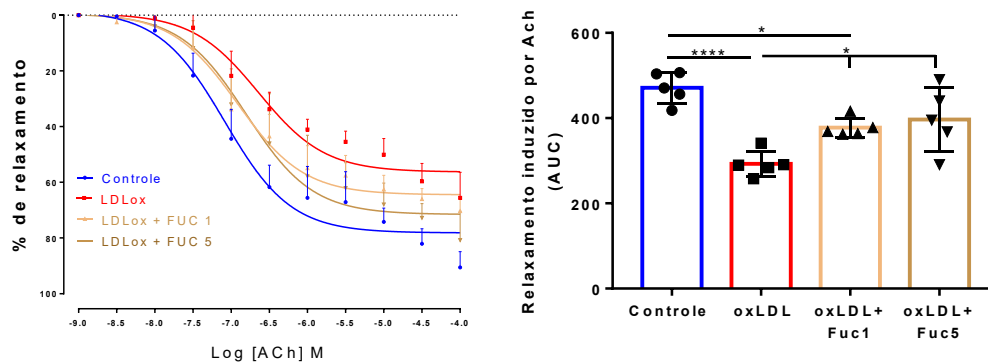


**Figura 19.** Efeito do fucoidan sobre a migração de células endoteliais EA. hy926, estimuladas com LDLox. **(A)** Imagens representativas do ensaio *in vitro* de formação de cicatriz demonstrando a migração celular para a região livre de células (em preto), nas condições de controle, LDLox e pré-incubação de 30 min com fucoidan (1; 5 e 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), seguido de co-incubação com 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de LDLox. **(B)** Gráfico de linha e de barras **(C)** mostrando o percentual de cicatrização em função do tempo. Os dados estão expressos como média  $\pm$  DP. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ , comparado ao controle; ANOVA seguido de teste de Tukey,  $n = 5$  poços por grupo.

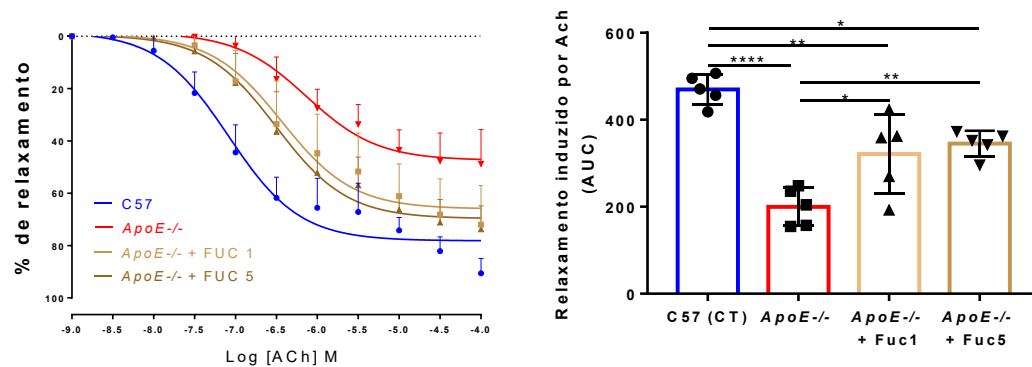
## 6.12 Fucoidan atenua a disfunção endotelial em aortas de C57BL/6 e *ApoE*<sup>-/-</sup>

A ativação/disfunção endotelial é um dos processos chave que leva ao recrutamento de monócito ao endotélio vascular. Nós avaliamos se o fucoidan poderia atuar no relaxamento dependente de endotélio em resposta à ACh. Para isso, como um modelo agudo de disfunção, anéis aórticos de camundongos C57BL/6 foram incubados com LDLox e fucoidan durante 4 horas. Além disso, anéis aórticos de camundongos *ApoE*<sup>-/-</sup>, foram utilizados como modelo crônico de disfunção, sendo incubados apenas com fucoidan durante 4 horas. Foi observado uma melhora no relaxamento nos anéis de aortas de camundongos C57BL/6 tratadas com fucoidan após a incubação com LDLox prejudicar o relaxamento vascular mediado pela acetilcolina (Fig. 20A). A vasodilatação induzida pela ACh nos anéis de aortas de camundongos *ApoE*<sup>-/-</sup> que foram incubados com fucoidan, também apresentaram uma melhora significativa no relaxamento quando comparado ao não tratado (Fig. 20B).

**A**



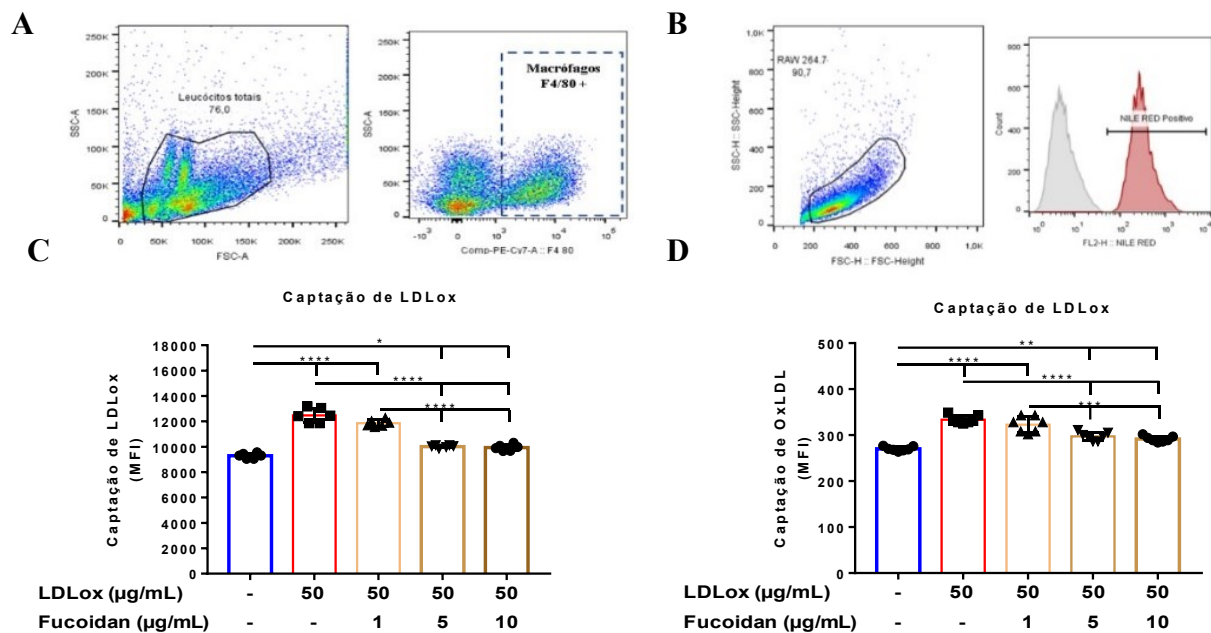
**B**



**Figura 20.** Efeito do fucoidan na vasodilatação induzida por ACh em aortas de camundongos *ApoE*<sup>-/-</sup> e C57BL/6. Curvas de resposta vasodilatadora à acetilcolina (ACh,  $10^{-9}$ - $10^{-4}$  mol/L) foram realizadas em anéis de aorta (A) de camundongos C57BL/6 após pré-incubação com fucoidan (1 e 5  $\mu$ g/mL) por 30min, seguido de co-incubação com 50  $\mu$ g/mL de LDLox por mais 4 horas e (B) de camundongos *ApoE*<sup>-/-</sup> após 4 horas de incubação com apenas fucoidan (1e 5  $\mu$ g/mL). A direita de cada gráfico está a área sob curva de (AUC) para as diferentes condições. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n = 5) da porcentagem de relaxamento. Os dados estão expressos como média  $\pm$  DP. \* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,01 e \*\*\*\* $p$ <0,0001, comparado ao controle; ANOVA seguido de teste de Tukey, n = 5 poços por grupo.

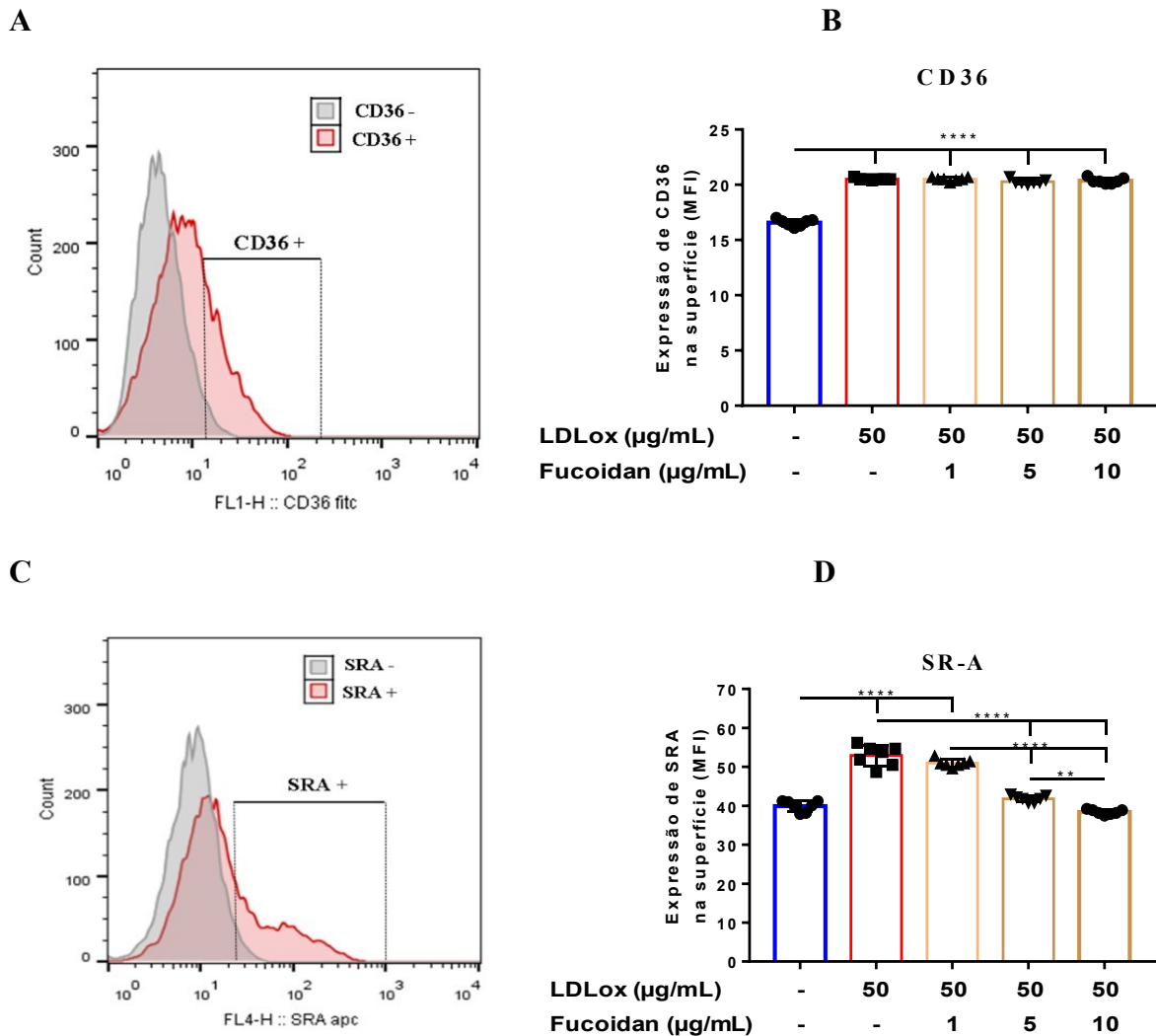
### 6.13 Fucoidan diminui a captação de LDLox, via SRA, por macrófagos

Até agora, demonstramos que o tratamento com fucoidan atenuou a inflamação nas células endoteliais induzida por LDLox através da diminuição da produção de EROs e da ativação da via do NF- $\kappa$ B, o que pode ter levado a redução na disfunção endotelial. Sabe-se que, a formação de células espumosas é um evento subsequente à disfunção endotelial. Assim, nosso próximo passo foi avaliar o efeito do fucoidan na captação de LDLox por macrófagos. Para isso, foi utilizado como marcador o vermelho de Nilo (*Nile Red*), o qual é bastante usado para localizar e quantificar lipídios. Primeiramente, nós avaliamos a captação de LDLox em macrófagos peritoneais de camundongos *ApoE*<sup>-/-</sup> (Fig. 21A). Posteriormente, avaliamos a captação de LDLox em uma linhagem de macrófagos murino RAW 264.7 (Fig. 21B). Os resultados de MFI gerados nas células positivas para *Nile Red*, mostraram que o fucoidan reduziu significativamente a captação de LDLox nos macrófagos peritoneais de camundongos *ApoE*<sup>-/-</sup> (Fig. 21C), bem como nos de linhagem RAW 264.7 (Fig. 21D).



**Figura 21.** Efeito do fucoidan sobre a captação de LDLox em macrófagos de *ApoE*<sup>-/-</sup> e RAW 264.7. Os Macrófagos foram incubadas com fucoidan (1, 5 e 10 µg/mL) e após 30 min, estimuladas com 50 µg/mL de LDLox por 4 horas. Posteriormente, as células foram marcadas, fixadas e analisadas por FACS. **(A)** Estratégia de *gating* utilizada para analisar a população de macrófagos peritoneais de camundongos *ApoE*<sup>-/-</sup>; inicialmente a população de macrófagos foram selecionados de acordo com tamanho e granulosidade (SSC-A vs. FSC-A), e então, separados através da marcação positiva para F4/F80. **(B)** *Gate* utilizado para analisar a população de macrófagos RAW 264.7; inicialmente foram selecionados de acordo com tamanho e granulosidade (SSC-A vs. FSC-A), e então, analisado o MFI da população positiva para *Nile Red*. **(C)** MFI de células F4/80+ coradas com *Nile Red* (0,1 µg/mL), mostrando efeito significativo do fucoidan sobre a captação de LDLox em macrófagos de *ApoE*<sup>-/-</sup>. **(D)** MFI de células coradas com *Nile Red* (0,1 µg/mL), mostrando efeito significativo do fucoidan sobre a captação de LDLox em macrófagos de RAW 264.7. As barras representam a média e as linhas verticais representam o desvio padrão. ANOVA seguido de teste de Tukey, n= 6/7 poços por grupo de pelo menos 2 experimentos separados.

Os receptores *scavengers* CD36 e SR-A têm função importante na captação da LDLox e formação das células espumosas. Assim, nós examinamos a expressão desses receptores na superfície dos macrófagos RAW 264.7 após o estímulo de 4 horas com LDLox e fucoidan. Foi observado que o fucoidan não alterou a expressão de CD36 na superfície das células RAW 264.7 (Fig. 22 B). Porém, reduziu de maneira concentração dependente a expressão de SR-A na superfície dos macrófagos RAW 264.7 (Fig. 22 D).



**Figura 22.** Efeito do fucoidan sobre a expressão SR-A e CD36 em RAW 264.7 incubados com LDLox. Os macrófagos RAW 264.7 foram pré-incubadas com fucoidan (1, 5 e 10 µg/mL) e após 30 min, estimuladas com 50 µg/mL de LDLox por 4 horas. Posteriormente, as células foram marcadas, fixadas e analisadas por FACS. **(A)** Histograma mostrando a marcação para CD36. **(B)** MFI de células marcadas com FITC para CD36. **(C)** Histograma mostrando marcação para SRA. **(D)** MFI de células marcadas com APC para SR-A. As barras representam a média e as linhas verticais representam o desvio padrão. ANOVA seguido de teste de Tukey, n=7 poços por grupo de pelo menos 2 experimentos separados.

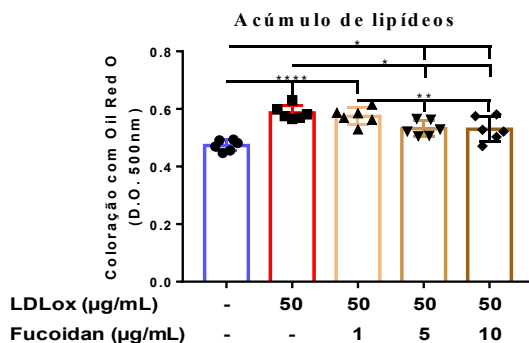
### 6.14 Fucoidan diminui a formação de células espumosas em RAW 264.7

A captação excessiva de LDLox na intima arterial através dos receptores *scavengers*, presente na superfície dos macrófagos, levam a formação de células espumosas, que possuem abundantes gotas lipídicas ligadas à membrana em seu citoplasma, e finalmente, as placas ateroscleróticas. Desta forma, nós avaliamos o efeito do fucoidan na formação dessas células espumosas em macrófagos RAW 264.7. Os resultados mostram que o tratamento com 50µg/mL de LDLox por 24 horas em células RAW 264.7 induziu a formação de gotículas lipídicas intracelulares e conteúdo lipídico total comparado ao grupo controle, como detectado e quantificado pela coloração com *Oil RED O* (Fig. 23A e B). Porém, o resultado da quantificação revelou que o co-tratamento com LDLox e fucoidan por 24 h diminuiu de maneira concentração dependente o conteúdo lipídico total em comparação com o tratamento apenas com LDLox (Fig. 23B). Além disso, o resultado do ensaio de viabilidade celular revelou que os tratamentos não afetaram a sobrevivência celular (Fig. 23C). Estes resultados confirmam que o fucoidan diminui a captação de LDLox, resultando em uma redução da formação de células espumosas induzidas por LDLox nos macrófagos.

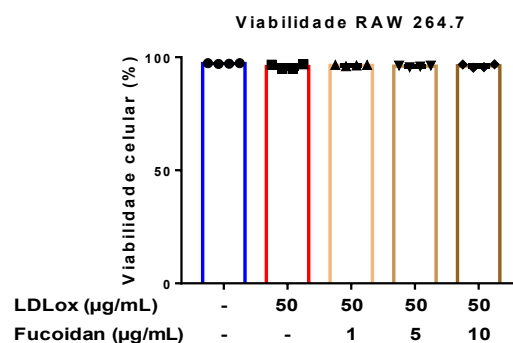
A



B



C



**Figura 23.** O tratamento com fucoidan diminui a formação de células espumosas mediadas por LDLox. Macrófagos RAW 264.7 foram pré-tratados com fucoidan (1, 5 e 10 µg/mL) e após 30 min, estimuladas com 50 µg/mL de LDLox por 24 horas. (A) Imagens representativas de células espumosas após fixação e coloração com *Oil red O*, as células foram observadas por microscopia de luz. (B) Quantificação do teor lipídico total dos macrófagos (n = 6) (C) viabilidade celular foi medida por citometria após marcação com iodeto de propídeo (n = 4). As barras representam a média e as linhas verticais representam o desvio padrão. ANOVA seguido de teste de Tukey, n= número de poços por grupo de pelo menos 2 experimentos separados.

## 7. DISCUSSÃO

Nos últimos anos, apesar do crescente número de drogas desenvolvidas para tentar evitar e tratar as DCV, ainda têm se observado a prevalência desse tipo de doença no mundo todo (WHO, 2015). Esse fato está associado com o aumento na incidência global de fatores de risco para aterosclerose, incluindo hiperlipidemia, obesidade e diabetes tipo II. Assim, a busca por novas terapias que possam reduzir o número de mortes e comorbidades devido a progressão da aterosclerose se faz necessário. Por suas características medicinais e farmacológicas, o fucoidan vem sendo muito discutido como um possível coadjuvante em muitos tratamentos medicamentosos. Esse tipo de polissacarídeo sulfatado extraído principalmente de algas marinhas marrons, têm mostrado ser um nutracêuticos promissor para a prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares ateroscleróticas (BRAGA; AGUILAR; ALVAREZ-LEITE, 2019; PATIL et al., 2018). Recentemente, foi constatado que a suplementação oral com fucoidan atenuou a aterosclerose induzida por hiperlipidemia em modelos animais de aterosclerose (WANG et al., 2016; YOKOTA et al., 2016). No entanto, o efeito do fucoidan na aterosclerose induzida pela hiperlipidemia e seus mecanismos subjacentes ainda são desconhecidos.

Portanto, o presente trabalho se propôs a avaliar os efeitos da suplementação oral de fucoidan em parâmetros bioquímicos e inflamatórios relacionados ao surgimento e evolução da aterosclerose em camundongos *ApoE*<sup>-/-</sup> alimentados com dieta normal e aterogênica. Também foi proposta desta pesquisa colaborar para o esclarecimento das vias de sinalização associadas a esses efeitos, a fim de se detectar potenciais alvos que possam contribuir para a prevenção dessa condição patológica.

Em nosso estudo, a suplementação oral de fucoidan atenuou significativamente o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas da aorta em camundongos *ApoE*<sup>-/-</sup> alimentados com dieta aterogênica. Também confirmamos que a suplementação dietética de fucoidan pôde contribuir para a redução da dislipidemia, sendo um importante fator contribuidor para a redução da placa. Além disso, nós observamos uma pequena melhora, porém não significativa, no peso relativo do fígado e baço dos animais alimentados com dieta aterogênica suplementada com fucoidan.

Em geral, nossos achados *in vivo* estão de acordo com a literatura. Yokota e colaboradores, mostraram que a suplementação com fucoidan possui um importante papel na regulação dos lipídeos séricos e no metabolismo de lipídeos no fígado, reduzindo a aterosclerose e a esteatose hepática (YOKOTA et al., 2016). Além disso, o aumento do baço em animais *ApoE*<sup>-/-</sup> alimentados com dieta hipercolesterolemiantes já era esperado, por induzir

uma atividade inflamatória neste órgão (ROBBINS et al., 2012). Porém, a tendência de redução com a suplementação do fucoidan pode ser um indício de que ele exerça um papel sobre mecanismos de ativação e proliferação de células imunes no tecido esplênico, conforme também já publicado (JANG; MOON; JOO, 2014). A presença do fucoidan na circulação, fígado e baço, após a administração oral, encontrada em nosso estudo reforça ainda mais a ideia de que o fucoidan possa exercer ação direta sobre esses locais.

Embora não possamos afirmar a concentração exata de fucoidan no plasma e nos tecidos em nosso experimento, um perfil semelhante de absorção e distribuição do fucoidan foi observado em um estudo de farmacocinética feito em ratos após a administração oral na dose única de 100 mg/kg de fucoidan de *Fucus vesiculosus* (POZHARITSKAYA et al., 2018). Os autores desse estudo, usando um ensaio de atividade anti-Xa para a detecção de fucoidan, encontraram uma concentração máxima na circulação de 0,125 µg/mL de fucoidan após 4 horas da gavagem, com um tempo médio de permanência de aproximadamente 6 horas (POZHARITSKAYA et al., 2018). Conjuntamente, os dados apontam que após a administração oral, é possível detectar o fucoidan no sangue, mesmo que em pequenas quantidades, tornando possível um efeito direto na vasculatura e em importantes órgãos metabólicos.

Deste modo, nosso próximo passo, foi avaliar se o fucoidan exerce efeito direto nos mecanismos moleculares que envolvem o processo de aterogênese na vasculatura, independentemente do seu efeito hipolipidêmico. Sabe-se, que um evento inicial crítico para o desenvolvimento da aterosclerose é a adesão dos leucócitos ao endotélio ativado e sua subsequente migração para a parede do vaso. Esses processos celulares são mediados pela regulação positiva de moléculas de adesão em células endoteliais e uma expressão aumentada de fatores quimiotáticos de leucócitos na parede vascular (HANSSON; LIBBY, 2006). Considerando que o recrutamento de monócitos circulantes para os locais de injúria endotelial é um evento crucial na aterosclerose, avaliamos se o fucoidan poderia interferir nesse processo. Observamos que após a administração oral de fucoidan nos camundongos *ApoE<sup>-/-</sup>*, houve redução tanto do rolamento como da adesão de leucócitos na veia mesentérica desses animais. Alguns estudos corroboram com os nossos achados e têm demonstrado que o fucoidan pode reduzir o recrutamento de leucócitos durante a inflamação. Um estudo *in vivo* em vênulas mesentéricas de ratos indicou que o tratamento com fucoidan reduziu o rolamento de leucócitos em 94% durante aplicações de microinfusão, sem afetar a concentração de leucócitos (LEY et al., 1993). Outro estudo examinando os microvasos pulmonares de coelhos mostrou que uma injeção intravenosa de fucoidan reduziu o rolamento de leucócitos em arteríolas e vênulas em



75 e 83%, respectivamente, e aumentou a velocidade de fluxo de leucócitos em 51% (KUEBLER et al., 1997).

Sabemos que a inflamação vascular pode ser desencadeada por muitos fatores, e a LDLox é um dos fatores de risco mais significativos no contexto da aterosclerose. O aumento dos níveis locais e sistêmicos de LDLox induz ativação, disfunção e apoptose das células endoteliais, contribuindo para o desenvolvimento e progressão da aterosclerose (PARTHASARATHY et al., 2010). Em camundongos *ApoE<sup>-/-</sup>*, por exemplo, o nível plasmático de LDLox é transitoriamente aumentado antes do desenvolvimento de lesões ateroscleróticas (KATO et al., 2009), indicando que a LDLox apresenta um papel crucial nos estágios iniciais da formação de lesões ateroscleróticas.

Desta forma, investigamos o efeito do fucoidan na adesão de monócitos (THP-1) sob uma monocamada de células endoteliais (EA. hy926) estimuladas pela LDLox. Demonstramos, então, que o tratamento com fucoidan diminuiu a adesão de THP-1 à monocamada de células endoteliais estimuladas com LDLox, sugerindo uma menor ativação endotelial por efeito do fucoidan. Sabemos que para ocorrer o rolamento e a adesão de monócito ao endotélio é necessária a participação de moléculas de adesão, dentre outros mediadores pró-inflamatórios, produzidos no endotélio ativado (LIBBY, 2002). Moléculas de adesão são aumentadas por citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$  e IL-6, que medeiam a localização e o recrutamento de monócitos para o espaço subendotelial (LIBBY, 2008). Além disso, a produção de MCP-1, um potente agente quimiotático para monócitos, é aumentada por IL-6 e TNF (HASHIZUME; MIHARA, 2012). Assim, ao investigarmos alguns desses marcadores inflamatórios cruciais para a resposta inflamatória observamos que o fucoidan foi capaz de reduzir a expressão de moléculas de adesão, tais como P-selectina e VCAM-1, bem como a produção de mediadores inflamatórios, MCP-1, IL-6 e TNF. Estes resultados corroboram a menor adesão de THP-1 à monocamada de células endoteliais e confirmam que o efeito protetor do fucoidan na aterosclerose envolve sua capacidade de atuar nos eventos inflamatórios associados ao recrutamento de leucócitos.

Nas células endoteliais, a LDLox sinaliza principalmente através do seu receptor LOX-1, ativando diversos segundos mensageiros celulares, incluindo o fator de transcrição NF- $\kappa$ B (responsivo ao estresse oxidativo), importante na regulação de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão (LI; VERMA, 2002). Algumas das citocinas induzidas também ativam o NF- $\kappa$ B, e podem reforçar a cascata de sinalização inflamatória (LI; VERMA, 2002). Além disso, enquanto a LDLox é um produto do estresse oxidativo crônico, ela também pode exercer

efeitos pró-oxidantes induzindo a geração de EROs por diversas vias e que conduzem então à ativação de NF- $\kappa$ B (HEINLOTH et al., 2000). No presente estudo, observamos que o fucoidan pôde atenuar significativamente na ativação da via do NF- $\kappa$ B induzida por LDLox em EA.hy926. Os resultados mostraram que o fucoidan diminuiu a fosforilação do NF- $\kappa$ B p65, IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ , FADD, bem como das proteínas TNFR e cMyc. Este resultado indica um dos mecanismos de ação do fucoidan para a regulação da ativação inflamatória das células endoteliais estimuladas com LDLox. Além disso, confirmamos que a geração de EROs, superóxido e óxido nítrico (NO) intracelular induzida por LDLox foi significativamente reduzida após o tratamento das EA. hy926 com fucoidan. Assim, podemos concluir, pelo menos em parte, que o fucoidan reduz a inflamação endotelial induzida por LDLox através da via de sinalização EROs/NF- $\kappa$ B.

Sabemos que o desequilíbrio redox desencadeado pela LDLox nas células endoteliais além de influenciar a ativação, pode levar a injúria endotelial levando ao comprometimento das funções de barreira celular, induzindo distúrbios na capacidade proliferativa e migratória das células endoteliais (VAN AALST et al., 2004). Desta forma, nós avaliamos a capacidade migratória das células endoteliais na presença de LDLox e fucoidan. Observamos que o fucoidan restaurou a capacidade de migração das células contribuindo para o fechamento da injúria.

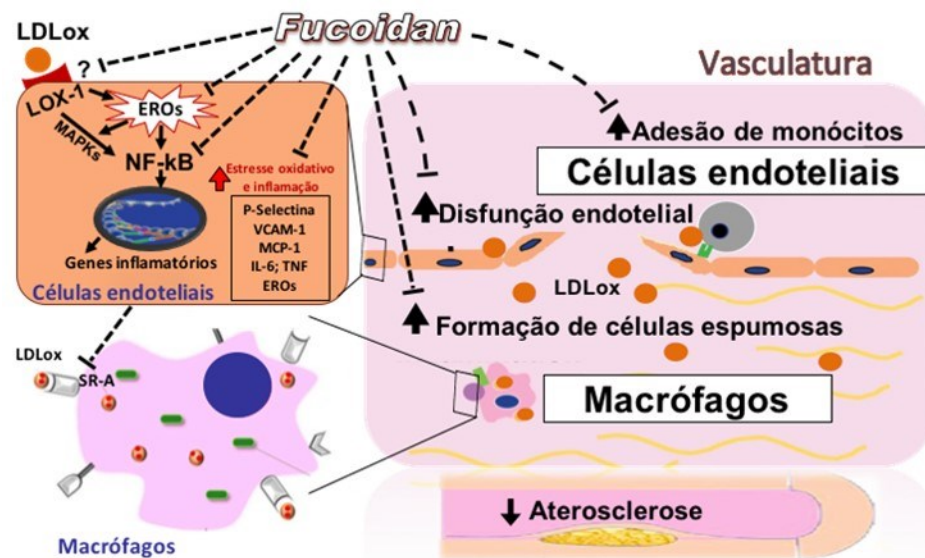
Além dos distúrbios na migração/proliferação celular e capacidade de restauração de injúria endotelial, a ativação das células endoteliais leva a um aumento intracelular de superóxido que induz a formação de peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), reduzindo a biodisponibilidade de NO (fundamental na manutenção do tônus vascular) (VAN DER LOO et al., 2000). Além disso, ocorre o comprometimento da atividade da eNOS somando-se fatores chave para a ocorrência da disfunção endotelial (GIELIS et al., 2011). Aqui nós confirmamos a indução da disfunção endotelial pela LDLox e mostramos que o fucoidan reduziu essa disfunção vascular em aortas de animais C57BL/6. Esse efeito protetor do fucoidan também foi observado em aortas de camundongos *ApoE*<sup>-/-</sup>, que estão cronicamente expostas a lipoproteínas oxidadas. Esse resultado, aliado ao efeito na migração celular, fortificam os efeitos protetores do fucoidan na saúde do endotélio e função vascular e, portanto, os efeitos ateroprotetores uma vez que a disfunção endotelial precede a aterosclerose.

Por fim, um dos eventos iniciais na gênese da aterosclerose é o acúmulo na intima de macrófagos contendo excesso de lipídios oxidados (MILLER et al., 2010). Com isso, também avaliamos os efeitos do fucoidan na captação de LDLox e formação de células espumosas, bem

como a expressão na superfície dos macrófagos dos principais *scavengers* responsáveis pela captação de lipoproteínas oxidadas, CD36 e SR-A (KZHYSHKOWSKA; NEYEN; GORDON, 2012). Observamos que o fucoidan interferiu na captação de LDLox via redução do receptor SR-A. Além disso, a incubação de células RAW 264.7 com LDLox em presença de fucoidan resultou em uma menor formação de células espumosas. Fucoidan é um ligante natural já bem definido para receptores *scavengers* SR-A (HSU et al., 1998). A sua ligação a esse receptor pode ter levado a menor captação de LDLox nos macrófagos e consequentemente afetou a formação de células espumosas. Estudos realizados em camundongos *ApoE<sup>-/-</sup>* com a deleção de SR-A mostrou a uma redução de mais de 30% na área de lesão aórtica (KUCHIBHOTLA et al., 2008). Assim, o fucoidan demonstrou exercer um papel importante contra a formação de células espumosas e mais estudos são necessários para esclarecer se esse composto também pode interferir no acúmulo de lipídeos por outras vias de captação e efluxo de colesterol em macrófagos.

## 8. HIPÓTESE FINAL

Diante dos resultados encontrados em cada etapa do trabalho e conforme discutido, a hipótese sobre os possíveis mecanismos antiaterogênico do fucoidan foram levantadas e estão sumarizadas na Figura 24.



**Figura 24.** Hipótese sobre os mecanismos antiaterogênico do fucoidan.

Após ingestão, uma pequena parcela do fucoidan é absorvido e atinge a circulação sistêmica podendo exercer ação direta na vasculatura e em componentes celulares importantes que estão envolvidos na aterogênese. Em células endoteliais, o fucoidan pode atenuar a inflamação e o estresse oxidativo através da redução da via EROs/NF-κB induzida pela ligação da LDLox em receptores *scavengers*, tais como LOX-1. Em macrófagos, o fucoidan pode reduzir a captação de LDLox pela ligação ao receptor *scavenger* SR-A, e consequentemente a formação de células espumosas. A ação do fucoidan sobre esses componentes celulares pode contribuir para a redução da ativação/disfunção endotelial na vasculatura, culminando com uma menor formação de placas ateroscleróticas.

## 9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Há crescentes evidências de que os componentes dos alimentos podem desempenhar um papel integral na ligação entre alimentação e saúde, particularmente pelo efeito imunomodulatório. Assim, uma dieta, contendo nutracêuticos, pode contribuir para reduzir os custos nos cuidados com saúde. Neste trabalho nós demonstramos que o fucoidan exerce um importante papel como nutracêutico apresentando propriedades antidislipidêmica, antioxidante e anti-inflamatória promissoras para a prevenção/tratamento de doenças cardiovasculares. Porém, para aplicação no contexto clínico, ainda há muito a ser compreendido sobre a estabilidade destes compostos *in vivo*, a melhor via e dose de administração, as diferenças na resposta relacionadas ao gênero e à idade, dentre outros. Além disso, mais investigações são necessárias para entender completamente como o efeito desse nutracêutico varia na presença dos medicamentos comumente usados pelos pacientes com aterosclerose.

## 10. CONCLUSÃO

Nosso estudo demonstrou que o fucoidan atenuou a disfunção endotelial e a aterosclerose em camundongos deficientes em apolipoproteína E, por reduzir a dislipidemia, bem como a inflamação e o estresse oxidativo em componentes celulares envolvidos na aterogênese. Ademais, fornece evidências sugerindo que os seus efeitos anti-inflamatório e antioxidante ocorrem por meio da redução da ativação da via de NF- $\kappa$ B, demonstrada em células endoteliais estimuladas com LDLox. Além disso, o fucoidan reduz a formação de células espumosas via inibição de receptores *scavengers* SR-A em macrófagos. Dessa forma, nosso estudo contribui com uma parcela de conhecimento para a compreensão dos efeitos antiaterogênico do fucoidan, demonstrando que seu uso como um nutracêutico é promissor na prevenção/tratamento da aterosclerose, bem como em outras doenças inflamatórias crônicas.

## 11. REFERÊNCIAS

- ADAMSON, S.; LEITINGER, N. Phenotypic modulation of macrophages in response to plaque lipids. **Current Opinion in Lipidology**, v. 22, n. 5, p. 335–342, 2011.
- ALBERTINI, R.; MORATTI, R.; LUCA, G. Oxidation of Low-Density Lipoprotein in Atherosclerosis from Basic Biochemistry to Clinical Studies. **Current Molecular Medicine**, v. 2, n. 6, p. 579–592, 1 set. 2002.
- ALE, M. T.; MEYER, A. S. Fucoidans from brown seaweeds: an update on structures, extraction techniques and use of enzymes as tools for structural elucidation. **RSC Adv.**, v. 3, n. 22, p. 8131–8141, 2013.
- ALE, M. T.; MIKKELSEN, J. D.; MEYER, A. S. Important determinants for fucoidan bioactivity: A critical review of structure-function relations and extraction methods for fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds. **Marine Drugs**, v. 9, n. 10, p. 2106–2130, 2011.
- AMMANN, K. R. et al. Collective cell migration of smooth muscle and endothelial cells: Impact of injury versus non-injury stimuli. **Journal of Biological Engineering**, v. 9, n. 1, p. 1–15, 2015.
- ATHUKORALA, Y. et al. An anticoagulative polysaccharide from an enzymatic hydrolysate of *Ecklonia cava*. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, n. 2, p. 184–191, 27 out. 2006.
- AZUMA, K. et al. Effects of oral administration of fucoidan extracted from *Cladosiphon okamuranus* on tumor growth and survival time in a tumor-bearing mouse model. **Marine Drugs**, v. 10, n. 10, p. 2337–2348, 2012.
- BAYNES, J. W.; DOMICZAK, M. H. Bioquímica Médica. In: ELSEVIER (Ed.). **Bioquímica Médica**. 4th. ed. Rio de Janeiro: 2015, 2015. p. 636.
- BENJAMIN, E. J. et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2018 Update: A Report From the American Heart Association. **Circulation**, v. 137, n. 12, 20 mar. 2018.
- BENTZON, J. F. et al. Mechanisms of Plaque Formation and Rupture. **Circulation Research**, v. 114, n. 12, p. 1852–1866, 6 jun. 2014.

BERTEAU, O.; MULLOY, B. **Sulfated fucans, fresh perspectives: Structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide** *Glycobiology*, 2003.

BLACK, W. A. P.; DEWAR, E. T.; WOODWARD, F. N. Manufacture of algal chemicals. IV Laboratory-scale isolation of fucoidin from brown marine algae. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 3, n. 3, p. 122–129, 1952.

BLOOMER, R. J. Decreased blood antioxidant capacity and increased lipid peroxidation in young cigarette smokers compared to nonsmokers: Impact of dietary intake. **Nutrition Journal**, v. 6, n. 1, p. 39, 8 dez. 2007.

BORÉN, J.; WILLIAMS, K. J. The central role of arterial retention of cholesterol-rich apolipoprotein-B-containing lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis. **Current Opinion in Lipidology**, v. 27, n. 5, p. 473–483, out. 2016.

BRAGA, W. F.; AGUILAR, E. C.; ALVAREZ-LEITE, J. I. Fucoidans as a Potential Nutraceutical in Combating Atherosclerotic Cardiovascular Diseases. 2019.

BUCKLEY, M. L.; RAMJI, D. P. The influence of dysfunctional signaling and lipid homeostasis in mediating the inflammatory responses during atherosclerosis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1852, n. 7, p. 1498–1510, 1 jul. 2015.

CAMARA, R. B. G. et al. Heterofucans from the brown seaweed *Canistrocarpus cervicornis* with anticoagulant and antioxidant activities. **Mar Drugs**, v. 9, n. 1, p. 124–138, 2011.

CAPETTINI, L. S. A.; CORTES, S. F.; LEMOS, V. S. Relative contribution of eNOS and nNOS to endothelium-dependent vasodilation in the mouse aorta. **European Journal of Pharmacology**, 2010.

CHUNG, B. H. et al. [8] Single Vertical Spin Density Gradient Ultracentrifugation. **Methods in Enzymology**, v. 128, n. C, p. 181–209, 1986.

CIRCU, M. L.; AW, T. Y. **Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis** *Free Radical Biology and Medicine*, 2010.

COLIN, S.; CHINETTI-GBAGUIDI, G.; STAELS, B. Macrophage phenotypes in atherosclerosis. **Immunological Reviews**, v. 262, n. 1, p. 153–166, 2014.

COMINACINI, L. et al. Oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) binding to ox-LDL receptor-1 in endothelial cells induces the activation of NF-kappaB through an increased production of intracellular reactive oxygen species. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 17, p. 12633–8, 2000.

COMINACINI, L. et al. The Binding of Oxidized Low Density Lipoprotein (ox-LDL) to ox-LDL Receptor-1 Reduces the Intracellular Concentration of Nitric Oxide in Endothelial Cells through an Increased Production of Superoxide. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 17, p. 13750–13755, 27 abr. 2001.

CUMASHI, A. et al. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. **Glycobiology**, v. 17, n. 5, p. 541–552, 2007.

CYBULSKY, M. I.; GIMBRONE, M. A. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. **Science (New York, N.Y.)**, v. 251, n. 4995, p. 788–91, 15 fev. 1991.

DO, H. et al. Differential regulation by fucoidan of IFN- $\gamma$ -induced NO production in glial cells and macrophages. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 111, n. 5, p. 1337–1345, 2010.

DO, H.; PYO, S.; SOHN, E.-H. Suppression of iNOS expression by fucoidan is mediated by regulation of p38 MAPK, JAK/STAT, AP-1 and IRF-1, and depends on up-regulation of scavenger receptor B1 expression in TNF- $\alpha$ - and IFN- $\gamma$ -stimulated C6 glioma cells☆. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 21, n. 8, p. 671–679, ago. 2010.

DOUGLAS, G.; CHANNON, K. M. The pathogenesis of atherosclerosis. **Medicine**, v. 38, n. 8, p. 397–402, 2010.

DROZD, N. N. et al. Antithrombotic and hemorrhagic activities of fucoidan isolated from *Fucus evanescens* brown algae. **Eksperimental'naya i Klinicheskaya Farmakologiya**, v. 74, n. 5, p. 26–30, 2011.

DU, X. et al. MS80, a novel sulfated polysaccharide, inhibits CD40-NF- $\kappa$ B pathway via targeting RIP2. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 337, n. 1–2, p. 277–285, 2010.

ESTERBAUER, H. et al. Autoxidation of human low density lipoprotein: loss of

polyunsaturated fatty acids and vitamin E and generation of aldehydes. **Journal of lipid research**, v. 28, n. 5, p. 495–509, 1987.

ESTERBAUER, H. et al. **The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL** *Free Radical Biology and Medicine*, 1992.

FALK, E. Pathogenesis of Atherosclerosis. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 47, n. 8 SUPPL., p. 0–5, 2006.

FAZIO, S.; LINTON, M. F. Mouse models of hyperlipidemia and atherosclerosis. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 6, p. D515-25, 1 mar. 2001.

FERNANDES, R. S. et al. Technetium-99m-labeled doxorubicin as an imaging probe for murine breast tumor (4T1 cell line) identification. **Nuclear Medicine Communications**, 2016.

FITTON, J. H. Therapies from fucoidan; multifunctional marine polymers. **Marine Drugs**, v. 9, n. 10, p. 1731–1760, 2011.

FOGELSTRAND, P.; BORÉN, J. **Retention of atherogenic lipoproteins in the artery wall and its role in atherogenesis** *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 2012.

FÖRSTERMANN, U. **Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease** *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 2010.

FRANCONE, O. L. et al. The hydrophobic tunnel present in LOX-1 is essential for oxidized LDL recognition and binding. **Journal of lipid research**, v. 50, n. 3, p. 546–555, 2009.

FRIEDMAN, P. et al. Correlation of antiphospholipid antibody recognition with the structure of synthetic oxidized phospholipids. Importance of Schiff base formation and aldol condensation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 9, p. 7010–7020, 2002.

FROSTEGARD, J. et al. Biologically modified LDL increases the adhesive properties of endothelial cells. **Atherosclerosis**, v. 90, n. 2–3, p. 119–126, 1991.

FROSTEGÅRD, J. et al. Circulating oxidized low-density lipoprotein is increased in hypertension. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 105, n. 5, p. 615–20, 1 nov. 2003.

GEBUHRER, V. et al. Oxidized low-density lipoprotein induces the expression of P-selectin



(GMP140/PADGEM/CD62) on human endothelial cells. **The Biochemical journal**, v. 306 (Pt 1, p. 293–298, 1995.

GIELIS, J. F. et al. Pathogenetic role of eNOS uncoupling in cardiopulmonary disorders. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 50, n. 7, p. 765–776, 1 abr. 2011.

GIMBRONE, M. A.; GARCÍA-CARDEÑA, G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. **Circulation Research**, v. 118, n. 4, p. 620–636, 2016.

GREENOW, K.; PEARCE, N. J.; RAMJI, D. P. The key role of apolipoprotein E in atherosclerosis. **Journal of Molecular Medicine**, v. 83, n. 5, p. 329–342, 13 maio 2005.

GRIENGLING, K. K.; SORESCU, D.; USHIO-FUKAI, M. NAD(P)H Oxidase: Role in Cardiovascular Biology and Disease. **Circulation Research**, v. 86, n. 5, p. 494–501, 2000.

HANSSON, G. K. Inflammation, atherosclerosis and coronary artery disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 16, p. 1685–1695, 2005.

HANSSON, G. K. Inflammatory mechanisms in atherosclerosis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 7, p. 328–331, jul. 2009.

HANSSON, G. K.; LIBBY, P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 7, p. 508–519, 16 jul. 2006.

HASHIZUME, M.; MIHARA, M. Blockade of IL-6 and TNF- $\alpha$  inhibited oxLDL-induced production of MCP-1 via scavenger receptor induction. **European Journal of Pharmacology**, v. 689, n. 1–3, p. 249–254, 2012.

HAYASHI, K. et al. Anti-influenza A virus characteristics of a fucoidan from sporophyll of *Undaria pinnatifida* in mice with normal and compromised immunity. **Microbes and Infection**, v. 15, n. 4, p. 302–309, 2013.

HEEREN, J.; BEISIEGEL, U.; GREWAL, T. Apolipoprotein E Recycling. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 26, n. 3, p. 442–448, 1 mar. 2006.

HEINLOTH, A. et al. Stimulation of NADPH Oxidase by Oxidized Low-Density Lipoprotein Induces Proliferation of Human Vascular Endothelial Cells. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 11, n. 10, 2000.

HERR, N. et al. Intravital Microscopy of Leukocyte-endothelial and Platelet-leukocyte Interactions in Mesenteric Veins in Mice. **Journal of Visualized Experiments**, n. 102, p. 1–6, 2015.

HLAWATY, H. et al. Low molecular weight fucoidan prevents intimal hyperplasia in rat injured thoracic aorta through the modulation of matrix metalloproteinase-2 expression. **Biochemical Pharmacology**, v. 81, n. 2, p. 233–243, 2011.

HOFKER, M. H.; VAN VLIJMEN, B. J.; HAVEKES, L. M. Transgenic mouse models to study the role of APOE in hyperlipidemia and atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 137, n. 1, p. 1–11, mar. 1998.

HSU, H.-Y.; HWANG, P.-A. Clinical applications of fucoidan in translational medicine for adjuvant cancer therapy. **Clinical and translational medicine**, v. 8, n. 1, p. 15, 1 maio 2019.

HSU, H. Y. et al. Ligand binding to macrophage scavenger receptor-A induces urokinase-type plasminogen activator expression by a protein kinase-dependent signaling pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 2, p. 1240–1246, 1998.

HUANG, L. et al. Hypolipidemic effect of fucoidan from *Laminaria japonica* in hyperlipidemic rats. **Pharmaceutical Biology (London, United Kingdom)**, v. 48, n. 4, p. 422–426, 2010.

IRHIMEH, M. R. et al. A quantitative method to detect fucoidan in human plasma using a novel antibody. **Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology**, v. 27, n. 10, p. 705, dez. 2005.

ISHIBASHI, S. et al. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. **The Journal of clinical investigation**, v. 92, n. 2, p. 883–93, 1 ago. 1993.

ITABE, H. et al. Minimally Modified LDL Is an Oxidized LDL Enriched with Oxidized Phosphatidylcholines. **Journal of Biochemistry**, v. 134, n. 3, p. 459–465, 2003.

JANG, J.-Y.; MOON, S.-Y.; JOO, H.-G. Differential effects of fucoidans with low and high molecular weight on the viability and function of spleen cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 68, p. 234–238, 1 jun. 2014.

JARASCH, E. D. et al. Localization of xanthine oxidase in mammary-gland epithelium and

capillary endothelium. **Cell**, v. 25, n. 1, p. 67–82, 1981.

JOHNSON, J. L. Metalloproteinases in atherosclerosis. **European Journal of Pharmacology**, v. 816, p. 93–106, 5 dez. 2017.

KANDASAMY, S. et al. The fucose containing polymer (FCP) rich fraction of *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. protects *Caenorhabditis elegans* against *Pseudomonas aeruginosa* by triggering innate immune signaling pathways and suppression of pathogen virulence factors. **ALGAE**, v. 30, n. 2, p. 147–161, 15 jun. 2015.

KANNAN, R. R. R.; ARUMUGAM, R.; ANANTHARAMAN, P. Pharmaceutical potential of a fucoidan-like sulphated polysaccharide isolated from *Halodule pinifolia*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 62, p. 30–34, 2013.

KARIMI, S. et al. Kinetic modeling of low density lipoprotein oxidation in arterial wall and its application in atherosclerotic lesions prediction. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 175–176, p. 1–8, 2013.

KATO, R. et al. Transient Increase in Plasma Oxidized LDL During the Progression of Atherosclerosis in Apolipoprotein E Knockout Mice. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 29, n. 1, p. 33–39, jan. 2009.

KHALIL, M. F.; WAGNER, W. D.; GOLDBERG, I. J. Molecular Interactions Leading to Lipoprotein Retention and the Initiation of Atherosclerosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 24, n. 12, p. 2211–2218, 1 dez. 2004.

KHAN, B. V et al. Modified low density lipoprotein and its constituents augment cytokine-activated vascular cell adhesion molecule-1 gene expression in human vascular endothelial cells. **The Journal of clinical investigation**, v. 95, p. 1262–1270, 1995.

KIM, K. J.; LEE, O. H.; LEE, B. Y. Fucoidan, a sulfated polysaccharide, inhibits adipogenesis through the mitogen-activated protein kinase pathway in 3T3-L1 preadipocytes. **Life Sciences**, v. 86, n. 21–22, p. 791–797, 2010.

KIM, K. J.; YOON, K. Y.; LEE, B. Y. Low molecular weight fucoidan from the sporophyll of *Undaria pinnatifida* suppresses inflammation by promoting the inhibition of mitogen-activated protein kinases and oxidative stress in RAW264.7 cells. **Fitoterapia**, v. 83, n. 8, p. 1628–1635,

1 dez. 2012.

KIM, M. J.; CHANG, U. J.; LEE, J. S. Inhibitory effects of fucoidan in 3T3-L1 adipocyte differentiation. **Marine Biotechnology**, v. 11, n. 5, p. 557–562, 2009.

KIM, M. J.; JEON, J.; LEE, J. S. Fucoidan prevents high-fat diet-induced obesity in animals by suppression of fat accumulation. **Phytotherapy Research**, v. 28, n. 1, p. 137–143, 2014.

KITA, T. et al. Oxidized LDL and expression of monocyte adhesion molecules. **Diabetes research and clinical practice**, v. 45, n. 2–3, p. 123–6, 1999.

KRYLOV, V. B.; USTYUZHANINA, N. E.; NIFANTIEV, N. E. Synthesis of low-molecular-weight carbohydrate mimetics of heparin. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 37, n. 6, p. 672–706, 19 nov. 2011.

KUCHIBHOTLA, S. et al. Absence of CD36 protects against atherosclerosis in ApoE knock-out mice with no additional protection provided by absence of scavenger receptor A I/II. **Cardiovascular Research**, v. 78, n. 1, p. 185–196, 2008.

KUEBLER, W. M. et al. Contribution of Selectins to Leucocyte Sequestration in Pulmonary Microvessels by Intravital Microscopy in Rabbits. **The Journal of Physiology**, v. 501, n. 2, p. 375–386, jun. 1997.

KUNJATHOOR, V. V. et al. Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 51, p. 49982–49988, 2002.

KWAK, K.-W. et al. **Biological effects of fucoidan isolated from Fucus vesiculosus on thrombosis and vascular cells.** *The Korean journal of hematology*, 2010.

KYLIN, H. Zur Biochemie der Meeresalgen. **Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie**, v. 83, n. 3, p. 171–197, jan. 1913.

KZHYSHKOWSKA, J.; NEYEN, C.; GORDON, S. Role of macrophage scavenger receptors in atherosclerosis. **Immunobiology**, v. 217, n. 5, p. 492–502, 2012.

LEE, N. Y. et al. Inhibitory effects of fucoidan on activation of epidermal growth factor receptor and cell transformation in JB6 Cl41 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 5, p. 1793–

1800, 2008.

LEE, S. H. et al. Anti-inflammatory effect of fucoidan extracted from *Ecklonia cava* in zebrafish model. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 1, p. 84–89, 2013.

LEIVA, E. et al. Role of Oxidized LDL in Atherosclerosis. In: **Hypercholesterolemia**. [s.l.] InTech, 2015.

LEOPOLD, J. A.; LOSCALZO, J. Oxidative mechanisms and atherothrombotic cardiovascular disease. **Drug discovery today. Therapeutic strategies**, v. 5, n. 1, p. 5–13, mar. 2008.

LEVITAN, I.; VOLKOV, S.; SUBBIAIAH, P. V. Oxidized LDL : v. 13, n. 1, 2010.

LEY, K. et al. Fucoidin, but not yeast polyphosphomannan PPME, inhibits leukocyte rolling in venules of the rat mesentery. **Blood**, v. 81, n. 1, p. 177–85, 1 jan. 1993.

LI, B. et al. Fucoidan: Structure and bioactivity. **Molecules**, v. 13, n. 8, p. 1671–1695, 2008.

LI, C. et al. Fucoidan, a sulfated polysaccharide from brown algae, against myocardial ischemia-reperfusion injury in rats via regulating the inflammation response. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 9, p. 2090–2095, 2011.

LI, Q.; VERMA, I. M. NF- $\kappa$ B regulation in the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 10, p. 725–734, out. 2002.

LIANG, Z. et al. Low molecular weight fucoidan ameliorates streptozotocin-induced hyper-responsiveness of aortic smooth muscles in type 1 diabetes rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 191, p. 341–349, 15 set. 2016.

LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 868–874, dez. 2002.

LIBBY, P. Role of Inflammation in Atherosclerosis Associated with Rheumatoid Arthritis. **The American Journal of Medicine**, v. 121, n. 10, p. S21–S31, out. 2008.

LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 32, n. 9, p. 2045–2051, set. 2012.

LIBBY, P. Mechanisms of acute coronary syndromes and their implications for therapy. **The New England journal of medicine**, v. 368, n. 21, p. 2004–13, 2013.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

MACH, F. et al. Adverse effects of statin therapy: perception vs. the evidence - focus on glucose homeostasis, cognitive, renal and hepatic function, haemorrhagic stroke and cataract. **European heart journal**, v. 39, n. 27, p. 2526–2539, 14 jul. 2018.

MADAMANCHI, N. R.; VENDROV, A.; RUNGE, M. S. **Oxidative stress and vascular disease** *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2005.

MARINVAL, N. et al. Angiogenesis potentialized by highly sulfated fucoidan: Role of the chemokines and the proteoglycans. **Atherosclerosis**, v. 241, n. 1, p. e87, 2015.

MAXFIELD, F. R.; TABAS, I. Role of cholesterol and lipid organization in disease. **Nature**, v. 438, n. 7068, p. 612–621, 2005.

MCLAREN, J. E. et al. Cytokines, macrophage lipid metabolism and foam cells: Implications for cardiovascular disease therapy. **Progress in Lipid Research**, v. 50, n. 4, p. 331–347, 1 out. 2011.

MEIR, K. S.; LEITERSDORF, E. Atherosclerosis in the Apolipoprotein E–Deficient Mouse. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 24, n. 6, p. 1006–1014, 1 jun. 2004.

MILLER, Y. I. et al. **Lipoprotein modification and macrophage uptake: role of pathologic cholesterol transport in atherogenesis**. *Sub-cellular biochemistry*, 2010.

MIN, S. K. et al. An antithrombotic fucoidan, unlike heparin, does not prolong bleeding time in a murine arterial thrombosis model: A comparative study of undaria pinnatifida sporophylls and fucus vesiculosus. **Phytother. Res.**, v. 26, p. 752–757, 2011.

MOGHADASIAN, M. H. et al. Pathophysiology of apolipoprotein E deficiency in mice: relevance to apo E-related disorders in humans. **The FASEB Journal**, v. 15, n. 14, p. 2623–2630, dez. 2001.

MOORE, K. J.; FREEMAN, M. W. Scavenger receptors in atherosclerosis: Beyond lipid uptake. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 26, n. 8, p. 1702–1711, 2006.

MOORE, K. J.; SHEEDY, F. J.; FISHER, E. A. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic

balance. **Nature reviews. Immunology**, v. 13, n. 10, p. 709–21, 2013.

MORYA, V. K.; KIM, J.; KIM, E.-K. Algal fucoidan: structural and size-dependent bioactivities and their perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 1, p. 71–82, 17 jan. 2012.

MOSS, J. W. E.; RAMJI, D. P. Nutraceutical therapies for atherosclerosis. **Nature Reviews Cardiology**, v. 13, n. 9, p. 513–532, 7 set. 2016.

MOSS, J. W. E.; WILLIAMS, J. O.; RAMJI, D. P. Nutraceuticals as therapeutic agents for atherosclerosis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1864, n. 5, p. 1562–1572, 1 maio 2018.

NAKASHIMA, Y. et al. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. **Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology**, v. 14, n. 1, p. 133–40, jan. 1994.

NGUYEN, P. et al. Liver lipid metabolism. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 92, n. 3, p. 272–283, 1 jun. 2008.

NISHINO, T. et al. Structural characterization of a new anticoagulant fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia kurome*. **Carbohydrate Research**, v. 211, n. 1, p. 77–90, 2 abr. 1991.

OMAR, H. E.-D. M. et al. The immunomodulating and antioxidant activity of fucoidan on the splenic tissue of rats treated with cyclosporine A. **The Journal of Basic & Applied Zoology**, v. 66, n. 5, p. 243–254, 2013.

OOMIZU, S. et al. Fucoidan prevents C[epsilon] germline transcription and NF[kappa]B p52 translocation for IgE production in B cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 350, n. 3, p. 501–507, 2006.

OREKHOV, A. N. et al. Development of Antiatherosclerotic Drugs on the basis of Natural Products Using Cell Model Approach. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2015, p. 463797, 2015.

PALINSKI, W. et al. ApoE-deficient mice are a model of lipoprotein oxidation in atherogenesis. Demonstration of oxidation-specific epitopes in lesions and high titers of autoantibodies to malondialdehyde-lysine in serum. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and**

**Vascular Biology**, 1994.

PARK, H. S. et al. Induction of apoptosis by fucoidan in human leukemia U937 cells through activation of p38 MAPK and modulation of Bcl-2 family. **Marine drugs**, v. 11, n. 7, p. 2347–64, 2013.

PARK, H. Y. et al. Anti-inflammatory effects of fucoidan through inhibition of NF- $\kappa$ B, MAPK and Akt activation in lipopolysaccharide-induced BV2 microglia cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 8, p. 1745–1752, 2011.

PARK, J.; YEOM, M.; HAHM, D. H. Fucoidan improves serum lipid levels and atherosclerosis through hepatic SREBP-2-mediated regulation. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 131, n. 2, p. 84–92, 2016.

PARK, M. K.; JUNG, U.; ROH, C. Fucoidan from marine brown algae inhibits lipid accumulation. **Marine Drugs**, v. 9, n. 8, p. 1359–1367, 2011.

PARK, Y. M. CD36, a scavenger receptor implicated in atherosclerosis. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 46, n. 6, p. e99, 2014.

PARTHASARATHY, S. et al. Oxidized Low-Density Lipoprotein. In: [s.l.] Humana Press, 2010. p. 403–417.

PATEL, M. K. et al. The antimitogenic action of the sulphated polysaccharide fucoidan differs from heparin in human vascular smooth muscle cells. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 87, n. 1, p. 149–154, 2002.

PATIL, N. P. et al. Algal Polysaccharides as Therapeutic Agents for Atherosclerosis. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 5, n. October, p. 1–18, 2018.

PELED, M.; FISHER, E. A. **Dynamic aspects of macrophage polarization during atherosclerosis progression and regression** *Frontiers in Immunology*, 2014.

PEREIRA, S. S. et al. Differences in adipose tissue inflammation and oxidative status in C57BL/6 and ApoE<sup>-/-</sup> mice fed high fat diet. **Animal Science Journal**, v. 83, n. 7, p. 549–555, jul. 2012.

PFRIEGER, F. W. **Role of cholesterol in synapse formation and function** *Biochimica et*



**Biophysica Acta - Biomembranes**, 2003.

PHULL, A. R. et al. In vitro and in vivo evaluation of anti-arthritic, antioxidant efficacy of fucoidan from *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 97, p. 468–480, 2017.

PHULL, A. R.; KIM, S. J. Fucoidan as bio-functional molecule: Insights into the anti-inflammatory potential and associated molecular mechanisms. **Journal of Functional Foods**, v. 38, p. 415–426, 2017.

PODREZ, E. A.; ABU-SOUD, H. M.; HAZEN, S. L. **Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis** **Free Radical Biology and Medicine**, 2000.

POZHARITSKAYA, O. N. et al. Pharmacokinetic and tissue distribution of fucoidan from *Fucus vesiculosus* after oral administration to rats. **Marine Drugs**, v. 16, n. 4, p. 1–10, 2018.

RAFIEIAN-KOPAEI, M. et al. Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes. **International journal of preventive medicine**, v. 5, n. 8, p. 927–46, ago. 2014.

RAJAVASHISTH, T. B. et al. Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. **Nature**, v. 344, n. 6263, p. 254–257, 15 mar. 1990.

ROBBINS, C. S. et al. Extramedullary hematopoiesis generates Ly-6C(high) monocytes that infiltrate atherosclerotic lesions. **Circulation**, v. 125, n. 2, p. 364–74, 17 jan. 2012.

ROCHA DE SOUZA, M. C. et al. **Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds**. *Journal of Applied Phycology*. **Anais...**2007

RODRIGUEZ-JASSO, R. et al. Chemical composition and antioxidant activity of sulphated polysaccharides extracted from *Fucus vesiculosus* using different hydrothermal processes. **Chemical Papers**, v. 68, n. 2, p. 203–209, 2014.

ROMANO, M.; CLARIA, J. Cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase converging functions on cell proliferation and tumor angiogenesis: implications for cancer therapy. **The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 17, n. 14, p. 1986–1995, 2003.

ROUZET, F. et al. Radiolabeled fucoidan as a p-selectin targeting agent for in vivo imaging of platelet-rich thrombus and endothelial activation. **Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine**, v. 52, n. 200218, p. 1433–1440, 2011.

RYU, M. J.; CHUNG, H. S. Fucoidan reduces oxidative stress by regulating the gene expression of HO-1 and SOD-1 through the Nrf2/ERK signaling pathway in HaCaT cells. **Molecular Medicine Reports**, v. 14, n. 4, p. 3255–3260, 1 out. 2016.

SANJEEWA, K. K. A. et al. In vitro and in vivo anti-inflammatory activities of high molecular weight sulfated polysaccharide; containing fucose separated from *Sargassum horneri*: Short communication. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2017.

SHANMUGAM, M.; MODY, K. H. **Heparinoid-active sulphated polysaccharides from marine algae as potential blood anticoagulant agents** *Current Science*, 2000.

SHARMA, G. et al. The curative effect of fucoidan on visceral leishmaniasis is mediated by activation of MAP kinases through specific protein kinase C isoforms. **Cellular & molecular immunology**, v. 11, n. 3, p. 263–74, 2014.

SIMONIS, D. et al. Kinetic analysis of heparin and glucan sulfates binding to P-selectin and its impact on the general understanding of selectin inhibition. **Biochemistry**, v. 46, n. 20, p. 6156–6164, 2007.

SOEDA S, SAKAGUCHI S, SHIMENO H, N. A. Fibrinolytic and anticoagulant activities of highly sulfated fucoidan. **Biochemical Pharmacology**, v. 43, n. 8, p. 1853–1858, 1992.

STEINBRECHER, U. P. et al. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 12, p. 3883–7, 1984.

STEYERS, C. et al. Endothelial Dysfunction in Chronic Inflammatory Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 7, p. 11324–11349, 25 jun. 2014.

STOCKER, R.; KEANEY JR., J. F. New insights on oxidative stress in the artery wall. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 3, p. 1825- 1834., 2005.

SULERIA, H. A. R. et al. Anti-coagulant & anti-thrombotic properties of blacklip abalone

(*Haliotis rubra*): In vitro & animal studies. **Marine Drugs**, v. 15, n. 8, 1 ago. 2017.

THOMAS, N. V.; KIM, S. K. Fucoidans from marine algae as potential matrix metalloproteinase inhibitors. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 72, p. 177–193, 2014.

THOMES, P. et al. Cardioprotective activity of *Cladosiphon okamuranus* fucoidan against isoproterenol induced myocardial infarction in rats. **Phytomedicine**, v. 18, n. 1, p. 52–57, 2010.

TIMENETSKY, J. et al. Detection of multiple mycoplasma infection in cell cultures by PCR. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, n. 7, p. 907–914, 2006.

TREJO-AVILA, L. M. et al. In vitro anti-canine distemper virus activity of fucoidan extracted from the brown alga *Cladosiphon okamuranus*. **VirusDisease**, v. 25, n. 4, p. 474–480, 2014.

TSIMIKAS, S. Oxidative Biomarkers in the Diagnosis and Prognosis of Cardiovascular Disease. **The American Journal of Cardiology**, v. 98, n. 11, p. S9–S17, 2006.

TURNBULL, J.; POWELL, A.; GUIMOND, S. **Heparan sulfate: Decoding a dynamic multifunctional cell regulator** *Trends in Cell Biology* Elsevier Current Trends, , 1 fev. 2001. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0962892400018973>>. Acesso em: 10 set. 2019

TURRENS, J. F.; BOVERIS, A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. **Biochemical Journal**, v. 191, n. 2, p. 421–427, 1980.

UPPAL, N.; UPPAL, V.; UPPAL, P. Progression of Coronary Artery Disease (CAD) from Stable Angina (SA) Towards Myocardial Infarction (MI): Role of Oxidative Stress. **Journal of clinical and diagnostic research**, v. 8, n. 2, p. 40–3, 2014.

USTYUZHANINA, N. E. et al. Fucoidans: Pro- or antiangiogenic agents? **Glycobiology**, v. 24, n. 12, p. 1265–1274, 2014.

VACEK, T. P. et al. Vascular Health and Risk Management Dovepress Matrix metalloproteinases in atherosclerosis: role of nitric oxide, hydrogen sulfide, homocysteine, and polymorphisms. **Vascular Health and Risk Management**, p. 11–173, 2015.

VAN AALST, J. A. et al. Role of reactive oxygen species in inhibition of endothelial cell migration by oxidized low-density lipoprotein. **Journal of Vascular Surgery**, v. 40, n. 6, p. 1208–1215, 2004.

VAN DER LOO, B. et al. Enhanced Peroxynitrite Formation Is Associated with Vascular Aging. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 192, n. 12, p. 1731–1744, 18 dez. 2000.

VÁSQUEZ-VIVAR, J. et al. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 16, p. 9220–5, 1998.

VASQUEZ, E. C. et al. Cardiac and vascular phenotypes in the apolipoprotein E-deficient mouse. **Journal of Biomedical Science**, v. 19, n. 1, p. 22, 13 fev. 2012.

VO, T.-S.; NGO, D.-H.; KIM, S.-K. Potential targets for anti-inflammatory and anti-allergic activities of marine algae: an overview. **Inflammation & allergy drug targets**, v. 11, n. 2, p. 90–101, abr. 2012.

VO, T. S.; KIM, S. K. Fucoidans as a natural bioactive ingredient for functional foods. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 1, p. 16–27, 2013.

VOLPI, N. Therapeutic applications of glycosaminoglycans. **Current medicinal chemistry**, v. 13, n. 15, p. 1799–810, 2006.

WANG, D. et al. Roles of Cells from the Arterial Vessel Wall in Atherosclerosis. **Mediators of Inflammation**, v. 2017, p. 1–9, 7 jun. 2017.

WANG, J. et al. Synthesized different derivatives of low molecular fucoidan extracted from *Laminaria japonica* and their potential antioxidant activity in vitro. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 44, n. 5, p. 379–384, 1 jun. 2009.

WANG, X. et al. Fucoidan attenuates atherosclerosis in LDLR<sup>-/-</sup> mice through inhibition of inflammation and oxidative stress. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 9, n. 7, p. 6896–6904, 2016.

WANG, Y. et al. Biological activities of fucoidan and the factors mediating its therapeutic effects: A review of recent studies. **Marine Drugs**, v. 17, n. 3, 20 mar. 2019.

WHO. WHO \_ Cardiovascular diseases (CVDs) Cardiovascular diseases (CVDs), 2015.

Disponível em: <[www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/)>

WIJESINGHE, W. A. J. P.; JEON, Y. J. Biological activities and potential industrial applications of fucose rich sulfated polysaccharides and fucoidans isolated from brown seaweeds: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 1, p. 13–20, 2012.

WOOLLARD, K. J.; CHIN-DUSTING, J. Therapeutic targeting of p-selectin in atherosclerosis. **Inflammation & allergy drug targets**, v. 6, n. 1, p. 69–74, 2007.

XU, S. et al. Evaluation of foam cell formation in cultured macrophages: An improved method with Oil Red O staining and DiI-oxLDL uptake. **Cytotechnology**, v. 62, n. 5, p. 473–481, 2010.

XUE, M. et al. Anticancer properties and mechanisms of fucoidan on mouse breast cancer in vitro and in Vivo. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, 2012.

XUE, M. et al. Caspase-dependent and caspase-independent induction of apoptosis in breast cancer by fucoidan via the PI3K/AKT/GSK3 $\beta$  pathway in vivo and in vitro. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 94, p. 898–908, 2017.

XUE, Z. et al. Study of antioxidant activities of fucoidan from *Laminaria japonica*. **High Technology Letters**, v. 11, n. 1, p. 91–94, 2005.

YANG, L. et al. Fucoidan derived from *Undaria pinnatifida* induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells via the ROS-mediated mitochondrial pathway. **Marine Drugs**, v. 11, n. 6, p. 1961–1976, 2013.

YE, C. et al. Construction of a fucoidan/laminin functional multilayer to direction vascular cell fate and promotion hemocompatibility. **Materials Science and Engineering C**, v. 64, p. 236–242, 2016.

YLA-HERTTUALA, S. et al. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. 12, p. 5252–5256, 15 jun. 1991.

YOKOTA, T. et al. Increased effect of fucoidan on lipoprotein lipase secretion in adipocytes. **Life Sciences**, v. 84, n. 15–16, p. 523–529, 2009.

YOKOTA, T. et al. Fucoidan alleviates high-fat diet-induced dyslipidemia and atherosclerosis

in ApoEshl mice deficient in apolipoprotein E expression. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 32, p. 46–54, 2016.

YUAN, Y.; MACQUARRIE, D. J. Microwave assisted extraction of sulfated polysaccharides (fucoidan) from *Ascophyllum nodosum* and its antioxidant activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 129, p. 101–107, 2015.

ZAPOROZHETS, T.; BESEDNOVA, N. Prospects for the therapeutic application of sulfated polysaccharides of brown algae in diseases of the cardiovascular system: review. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 12, p. 3126–3135, 2016.

ZARAGOZA, C. et al. Animal models of cardiovascular diseases. **Journal of biomedicine & biotechnology**, v. 2011, p. 497841, 16 fev. 2011.

ZHANG, S. H. et al. Diet-induced atherosclerosis in mice heterozygous and homozygous for apolipoprotein E gene disruption. **The Journal of clinical investigation**, v. 94, n. 3, p. 937–45, 1 set. 1994.

ZHANG, Z. et al. Structure-activity relationship of the pro- and anticoagulant effects of fucus vesiculosus fucoidan. **Thromb. Haemost.**, v. 111, p. 429–437, 2014.

ZHAO, X. et al. A comparative study of antithrombotic and antiplatelet activities of different fucoidans from *Laminaria japonica*. **Thrombosis Research**, v. 129, n. 6, p. 771–778, jun. 2012.

ZHOU, M.-S. et al. Nicotine potentiates proatherogenic effects of oxLDL by stimulating and upregulating macrophage CD36 signaling. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 305, n. 4, p. H563–H574, 15 ago. 2013.

**ANEXOS****Anexo I- Protocolo de aprovação do CEUA**

<p style="text-align: center;"><b>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS</b></p> <p style="text-align: center;"><b>CEUA</b> COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</p> <p>Prezado(a):</p> <p>Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.</p> <p><b>Protocolo CEUA:</b> 284/2016 <b>Título do projeto:</b> Efeitos da suplementação oral de fucoidan no desenvolvimento da aterosclerose em camundongos ApoE-/- <b>Finalidade:</b> Pesquisa <b>Pesquisador responsável:</b> Jacqueline Isaura Alvarez Leite <b>Unidade:</b> Instituto de Ciências Biológicas <b>Departamento:</b> Departamento de Bioquímica e Imunologia</p> <p><b>Situação atual:</b> <a href="#">Decisão Final</a></p> <p>Aprovado na reunião do dia 28/11/2016. Belo Horizonte, 06/12/2016.</p> <p>Atenciosamente,</p> <p>Sistema Solicite CEUA UFMG <a href="https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/">https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/</a></p> <p style="text-align: center;">Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3409-4516 <a href="http://www.ufmg.br/bioetica/ceua">www.ufmg.br/bioetica/ceua</a> - <a href="mailto:cetea@prpq.ufmg.br">cetea@prpq.ufmg.br</a></p>
---

## Anexo II- Certificado de análise do extrato de fucoidan comercial utilizada nas dietas.

Date : 4 January 2017

## CERTIFICATE OF ANALYSIS

KANEHIDE BIO CO., LTD.

5-2-2 Nishizaki, Itoman, Okinawa, Japan

TEL : +81-98-994-1001 FAX : +81-98-994-0636

Commodity description	Lot.No.	Manufacturing date	Expired date	Receipt number
Okinawa Mozuku Extract Powder (Fucoidan powder / <i>Cladosiphon okamuranus</i> )	2160620	20 June 2016	19 June 2018	16062161002

Inspection items	standard	Results	Inspection methods
Appearance and aspect	Powder is color peculiar to MOZUKU extract (• without unusual taste, smell • no foreign substance detected)	Powder is color peculiar to MOZUKU extract (without unusual taste, smell and foreign materials)	Sensory test
Aerobic colony count	$\leq 3.0 \times 10^3$ cfu/g	$\leq 1.0 \times 10^2$ cfu/g	Plate count agar test
Coliforms	Negative	Negative	BGLB method
Water activity	$\leq A_w 0.5$	$A_w 0.09$	Water activity measuring instrument
Molecular weight	30,000~150,000	47,990	HPLC
Fucoidan	$\geq 85\%$	89.77%	HPLC
Sulfate group content	$\geq 13\%$	14.07%	Ion chromatographic method
Remarks column :			
Total judge	Judgement day		Approved
Within standard	7 July 2016		Prepared



### **Anexo III- Análises Bioquímicas**

#### **Colesterol Total (CT)**

O CT foi obtido por método enzimático, por meio da colesterol oxidase (ALLAIN et. al.,1974), utilizando-se kit comercial (Colesterol Liquiform -Labtest, Brasil). O método consiste na hidrólise de ésteres de colesterol pela colesterol esterase, produzindo colesterol livre e ácidos graxos. O colesterol livre, em presença da colesterol oxidase e de oxigênio, é oxidado a colest-4-en-ona e peróxido de hidrogênio. Esse último, em presença de fenol e 4-aminoantipirina, e pela ação da peroxidase, produz um composto róseo-avermelhado, a Antopirilquinonimina, que possui absorção máxima no comprimento de onda de 500nm. A intensidade da cor formada é diretamente proporcional à concentração de colesterol na amostra. As concentrações de colesterol no soro dos animais foram determinadas por um ensaio em microplaca de 96 poços. Resumidamente, 5 µL das amostras de soro foram diluídas em água deionizada na proporção 1:100, para adequar as leituras de absorbância à variação linear do teste. Em seguida, 100 µL de reagente de colesterol total foram adicionados aos 100 µL de soro diluído. Após um período de incubação de 15 minutos a 37°C, a absorbância foi lida a 492nm em um leitor de microplaca. As dosagens foram realizadas em duplicata.

#### **HDL Colesterol**

As concentrações de HDL-c no soro foram obtidas por meio do kit enzimático Labtest (Brasil). O princípio desse método se baseia na precipitação seletiva e quantitativa das lipoproteínas LDL e VLDL pelo ácido fosfotúngstico e por cloreto de magnésio. Após centrifugação (6.000rpm/5 minutos), o colesterol ligado às lipoproteínas de alta densidade (HDL) é determinado no sobrenadante. O sobrenadante foi plaqueado (20µL) em uma microplaca de 96 poços, em duplicata. Em seguida, foram adicionados aos poços 200 µL do reagente de cor de Colesterol Liquiform - Labtest (Brasil). Após incubação de 15 minutos a 37° C, a absorbância foi lida a 492nm. A fim de se determinar o padrão, plaquearam-se 10 µ L do reagente padrão. Para o cálculo das concentrações do HDL-c, inicialmente determinou-se o Fator de Calibração, através da seguinte equação: Fator de calibração = 40/média da Absorbância do Padrão. Feito isso, seguiu-se o cálculo abaixo, para determinação da concentração de HDL-c, em mg/dL: Absorbância da amostra X Fator de calibração

### **Triglicerídeos**

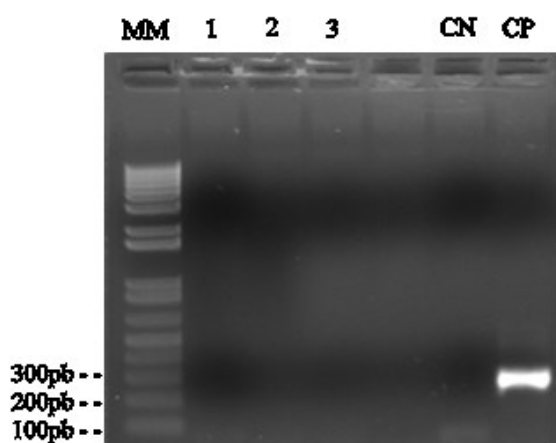
Triglicerídeos foram quantificados a partir da utilização de método colorimétrico, mediante kit enzimático comercial Labtest (Brasil). A lipoproteína lipase promove a hidrólise dos triglicerídeos, gerando glicerol que, pela ação da glicerol quinase, é convertido em glicerol-3-fosfato. Esse produto é oxidado em diidroxiacetona fosfato e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), numa reação catalisada pela glicerol-3-fosfato oxidase. A reação seguinte ocorre entre peróxido de hidrogênio, 4-aminoantipirina e 4-clorofenol, via peroxidase, produzindo uma substância de cor avermelhada, chamada quinoneimina, a qual possui absorvância máxima em 505 nm. A intensidade da cor observada é diretamente proporcional à concentração de TG na amostra. Para a quantificação de TG, primeiramente diluíram-se 5 µL de soro em água deionizada, na proporção de 1:25, a fim de se ajustarem as leituras de absorvância à variação linear do teste. Em seguida, foram adicionados 100 µL da amostra diluída em placa de 96 poços, em duplicata. Então, acrescentaram-se 100 µL de reagente de cor e, após incubação por 15 minutos a 37°C, efetuou-se a leitura a 492nm em leitor de microplaca.

### **Glicose**

A mensuração de glicose sérica foi realizada utilizando-se kit enzimático comercial (Glicose Pap Liquiform, Labstest). Primeiramente, a reação catalisada pela glicose oxidase leva à formação de peróxido de hidrogênio, que reage com 4-aminoantipirina e fenol, na presença da peroxidase, produzindo a antipirilquinonimina, um composto de cor avermelhada, com absorvância entre 490 e 520nm. A intensidade da cor é diretamente proporcional à concentração de glicose na amostra. Todo o procedimento foi realizado diretamente numa placa de 96 poços, pipetando-se 2 µL dos padrões e amostras, em triplicata. Em seguida, foram adicionados 200 µL do reagente de glicose em todos os poços e, após incubar por 15 minutos a 37°C e certificar-se de que não houve formação de bolhas, fez-se a leitura no leitor de microplaca, a 492nm. Para calcular a concentração de glicose em mg/dL, aplicou-se a fórmula:  $\text{Glicose (mg/dL)} = (\text{Abs Amostra}/\text{Abs Padrão}) \times 100$

#### Anexo IV- Controle de micoplasma nas linhagens celulares utilizadas

A contaminação de *Mycoplasma sp.* em linhagens celulares é um evento comum, podendo trazer grandes prejuízos para as culturas de células, interferindo nos resultados dos experimentos. Assim, foi realizada a técnica de reação da cadeia da polimerase (PCR), utilizando iniciadores para amplificar parte do gene da unidade 16s do rRNA de qualquer espécie do gênero *Mycoplasma sp.* (TIMENETSKY et al., 2006). Para a extração do DNA das culturas, uma amostra contendo aproximadamente 500µL da suspensão de células foram coletadas e fervidas a 90°C por 10 min. Para a reação de PCR as amostras foram centrifugadas (spin) e 2µL de sobrenadante contendo DNA das amostras extraídas foram adicionados ao mix de PCR contendo 200 µM de cada desoxinucleotídeo trifosfatado (dTTP, dATP, dCTP, dGTP), 10 pmol dos iniciadores MGSO [TGC ACC ATC TGT CAC TCT GTT AAC CTC] e GPO3 [GGG AGC AAA CAG GAT AGA TAC CCT], 2 U de Taq DNA polimerase em solução com Tris-HCL 10 mM, KCl 50 mM e MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM para um volume final de 20 µL. A amplificação foi obtida em termociclador programado para desnaturação inicial a 94°C por 5 min, 35 ciclos a 94°C por 30 seg, anelamento dos iniciadores a 55°C por 30 seg e extensão a 72°C por 30 seg, e o último passo a 72°C por 5 min para extensão final. Os produtos obtidos nas amplificações das PCRs foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, contendo 10µg/ml de brometo de etídeo em tampão TAE (40mM Tris-acetato; 2mM EDTA; pH 8,0), detectados sob luz ultravioleta em fotodocumentador. Foi utilizado marcador de peso molecular de 100pb DNA Ladder, sendo o produto de PCR esperado com 270 pb. Além disso, para monitoramento de contaminação da PCR foi utilizado controles positivos e negativos da reação. A análise da PCR genérica realizada com DNA extraído de amostras de culturas de células EA. hy926, THP-1 e RAW 264.7 mostrou-se negativas para *Mycoplasma sp.* A presença de um fragmento de 270pb corresponde ao tamanho da banda esperada utilizando-se o par de iniciadores MGSO/GPO3.



Eletroforese em gel de agarose de produtos obtidos pela PCR com os primers MGSO/GPO3 para micoplasma. MM: marcador de tamanho molecular 100pb; 1: EA.hy926, 2:THP-1e 3: RAW 264.7; CN: controle negativo da reação; CP: produto da PCR de cultura de células infectadas com *Mycoplasma sp.*, controle positivo da reação.

## Anexo IV- Artigo aceito

## Primeira página do manuscrito aceito para publicação (Resultados parciais)

Biochemical and Biophysical Research Communications xxx (xxxx) 1–9



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ybbrc](http://www.elsevier.com/locate/ybbrc)

## The atheroprotective role of fucoidan involves the reduction of foam cell formation by altering cholesterol flux-associated factors in macrophages

Wesley Fernandes-Braga<sup>a,\*</sup>, Edenil Costa Aguilar<sup>a</sup>, Juliana Maria Navia-Pelaez<sup>b</sup>,  
 Danielle Lima Ávila<sup>a</sup>, Luisa Rezende<sup>c</sup>, Luciana de Oliveira Andrade<sup>c</sup>,  
 Sued Eustáquio Mendes Miranda<sup>d</sup>, Andre Luis Branco de Barros<sup>d</sup>,  
 Luciano dos Santos Aggum Capettini<sup>e</sup>, Jacqueline Isaura Alvarez-Leite<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Biochemistry and Immunology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

<sup>b</sup> Department of Medicine, University of California San Diego, San Diego, United States

<sup>c</sup> Department of Morphology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

<sup>d</sup> Department of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

<sup>e</sup> Department of Pharmacology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

## ARTICLE INFO

Article history:  
 Received 15 January 2023  
 Accepted 28 January 2023

Keywords:  
 Fucoidan absorption  
 Atherosclerosis  
 brown algae  
 Dyslipidemia  
 oxLDL

## ABSTRACT

Atherosclerosis is characterized by the accumulation of lipid-laden cells in the arterial walls, resulting from dysregulation of cholesterol homeostasis in the macrophage, triggered by oxidized low-density lipoprotein (oxLDL). Previous studies have shown that fucoidan, a sulfated polysaccharide from brown seaweeds, has several atheroprotective activities, however, the mechanism of fucoidan protection is not fully understood. Thus, we investigated the effect of fucoidan on atherogenesis in apolipoprotein E-deficient (ApoE<sup>-/-</sup>) mice, on oxLDL uptake by macrophages, and on the expression of the flux-associated scavenger receptors by macrophages. Also, we examined the absorption and biodistribution of orally administered fucoidan. ApoE<sup>-/-</sup> mice fed on a cholesterol-rich diet supplemented with 1% fucoidan showed reduced dyslipidemia and atherosclerosis. Fucoidan was detected in blood and peripheral tissue after gavage, suggesting that it can exert direct systemic effects. *In vitro*, fucoidan reduced macrophage oxLDL uptake, which resulted in lower foam cell formation. This effect was associated with downregulation of the cholesterol influx-associated scavenger receptor (SR)-A expression, and upregulation of the cholesterol efflux-associated SR-B1 expression. In conclusion, fucoidan prevented oxLDL-mediated foam cell formation in macrophages by downregulating SR-A1/2 and by up-regulating SR-B1.

© 20XX

## Abbreviations

ACVD	Atherosclerotic cardiovascular diseases
ABC	ATP-binding cassette transporter
ALT	Alanine aminotransferase
ANOVA	One-way analysis of variance
ApoE <sup>-/-</sup>	Apolipoprotein E-deficient
AST	Aspartate aminotransferase
CD36	Cluster of differentiation 36
DAB	3,3-diaminobenzidine
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HDL-C	High-density lipoprotein cholesterol
HE	Hematoxylin-eosin
HRP	Horseradish peroxidase

LDL	Low-density lipoprotein
MFI	Mean fluorescence intensity
non-HDL-C	Non-high-density lipoprotein cholesterol
oxLDL	Oxidized LDL
RCT	Reverse cholesterol transport
SRs	Scavenger receptors
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances
TG	Triglycerides
TC	Total cholesterol
<sup>99m</sup> Tc	Technetium-99 m
<sup>99m</sup> Tc-Fuc	<sup>99m</sup> Tc-fucoidan

\* Corresponding author. Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences, ICB-04-110, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Av. Antônio Carlos 6627, CEP:31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

E-mail addresses: [wesley.fernandes.braga@gmail.com](mailto:wesley.fernandes.braga@gmail.com) (W. Fernandes-Braga), [edenilaguilar@gmail.com](mailto:edenilaguilar@gmail.com) (E.C. Aguilar), [jnaviapelaez@health.ucsd.edu](mailto:jnaviapelaez@health.ucsd.edu) (J.M. Navia-Pelaez), [danielimavila@gmail.com](mailto:danielimavila@gmail.com) (D.L. Ávila), [lu.reze12b@gmail.com](mailto:lu.reze12b@gmail.com) (L. Rezende), [luoandrade@gmail.com](mailto:luoandrade@gmail.com) (L.d.O. Andrade), [sued1989@gmail.com](mailto:sued1989@gmail.com) (S.E.M. Miranda), [brancodebarros@yahoo.com.br](mailto:brancodebarros@yahoo.com.br) (A.L.B.d. Barros), [capettini@icb.ufmg.br](mailto:capettini@icb.ufmg.br) (L.d.S.A. Capettini), [jalvarezleite@gmail.com](mailto:jalvarezleite@gmail.com) (J.I. Alvarez-Leite).

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2023.01.091>

0006-291/© 20XX