



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Bianca Costa

**Fucana e Fucana radiomarcada (^{99m}Tc -Fucana) como um novo agente
teranóstico de processos inflamatórios**

Rio de Janeiro

2022

Bianca Costa

Fucana e Fucana radiomarcada (^{99m}Tc -Fucana) como um novo agente teranóstico de processos inflamatórios

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Ralph Santos-Oliveira

Rio de Janeiro

2022

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

C837 Costa, Bianca.
Fucana e Fucana radiomarcada (^{99m}Tc -Fucana) como um novo agente teranóstico de processos inflamatórios / Bianca Costa. - 2022.
82 f.

Orientador: Prof. Dr. Ralph Santos Oliveira

Mestrado (Dissertação) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Radiofármacos – Teses. 2. Inflamação - Diagnóstico – Teses. 3. Tecnécio - Teses. 4. Compostos Radiofarmacêuticos – Uso terapêutico. I. Oliveira, Ralph Santos. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616-006

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Bianca Costa

Fucana e Fucana radiomarcada (^{99m}Tc -Fucana) como um novo agente teranóstico de processos inflamatórios

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 03 de fevereiro de 2022.

Orientador: Prof. Dr. Ralph Santos-Oliveira
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Banca Examinadora: _____
Prof.^a Dra. Maria das Graças Muller de Oliveira Henriques
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Elaine Cruz Rosas
Fundação Oswaldo Cruz

Prof. Dr. Eduardo Ricci Júnior
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2022

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho, primeiramente, à Deus, por me ajudar em todos os momentos da minha vida e por me permitir chegar até aqui em sua presença. Aos meus pais, Neide, Francisco e Sérgio, por acreditarem em mim, me dando ensinamento, apoio e incentivo nessa caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a toda minha família pelo incentivo e por acreditarem sempre em mim.

Agradeço a todos os meus amigos que fizeram parte da minha formação e estiveram sempre ao meu lado me motivando.

Agradeço ao meu orientador Ralph Santos-Oliveira por ter me auxiliado nesse passo importante da minha vida, por toda paciência e por me proporcionar todo esse conhecimento.

Agradeço aos amigos do Laboratório de Nanorradiofármacos e Novos Radiofármacos, pela ajuda e apoio durante o caminho.

Às fontes financiadoras pela verba para a compra de equipamentos e insumos para a realização do projeto de pesquisa.

E, por fim, agradeço imensamente a todos que me apoiaram neste trabalho, acreditaram na minha capacidade e me incentivaram a seguir em frente.

O homem, como um ser histórico, inserido num permanente movimento de procura, faz e refaz o seu saber.

Paulo Freire

RESUMO

COSTA, Bianca. *Fucana e Fucana radiomarcada (^{99m}Tc -Fucana) como um novo agente teranóstico de processos inflamatórios*. 2022. 82 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

A inflamação é um mecanismo de defesa vital, no entanto a falha na sua fase resolutive ou a sua ativação contínua promove a perturbação da homeostase em vários níveis, contribuindo para o desenvolvimento e agravamento de muitas doenças. A criação de novos produtos eficazes no tratamento e diagnóstico de processos inflamatórios irá contribuir de maneira significativa no manejo de várias patologias de cunho inflamatório. Neste estudo, a aplicabilidade da Fucana como agente terapêutico e de imagem foi avaliada. Para fins terapêuticos, este polissacarídeo sulfatado foi testado em dois modelos de inflamação: artrite (zimosan) e inflamação pulmonar (LPS). Para seu uso como agente de imagem, a Fucana foi marcada com ^{99m}Tc e sua captação em pulmões inflamados (LPS) foi mensurada e comparada com a captação em pulmões não inflamados. Os resultados demonstraram que a Fucana tem efeito anti-inflamatório terapêutico, efeito este que ficou evidente no modelo pulmonar (LPS). O ensaio de biodistribuição demonstrou que a Fucana radiomarcada (^{99m}Tc -Fucana) tem um importante tropismo por sítios de inflamação com bioacumulação bastante relevante, o que permite pensar em seu emprego como agente de imagem nuclear.

Palavras-chave: Fucana. Inflamação. Diagnóstico. Terapia. Tecnécio-99m. Radiofármaco.

ABSTRACT

COSTA, Bianca. *Fucoidan and radiolabeled Fucoïdan (^{99m}Tc-Fucoïdan) as a new theranostic agent of inflammatory processes*. 2022. 82 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022

Inflammation is a vital defense mechanism, but failure in the resolution phase or its constant activation promotes disruption of homeostasis at multiple levels and contributes to the development and exacerbation of many diseases. The development of new products effective in the treatment and diagnosis of inflammatory processes will make an important contribution to the treatment of various pathologies with an inflammatory character. In this study, the applicability of Fucoïdan as a therapeutic and imaging agent was investigated. For therapeutic purposes, this sulfated polysaccharide was tested in two inflammatory models: Arthritis (Zymosan) and Pneumonia (LPS). For use as an imaging agent, Fucoïdan was labeled with ^{99m}Tc and its uptake in inflamed lungs (LPS) was measured and compared to uptake in non-inflamed lungs. The results showed that Fucoïdan has a therapeutic anti-inflammatory effect, an effect that was evident in the lung model (LPS). The biodistribution assay showed that radiolabeled Fucoïdan (^{99m}Tc-Fucoïdan) has an important tropism for inflammatory foci with very relevant bioaccumulation, allowing us to consider its use as a nuclear imaging agent.

Keywords: Fucoïdan. Inflammation. Diagnosis. Therapy. Technetium-99m. Radiopharmaceutical.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Fases da inflamação	17
Figura 2 –	Cascata inflamatória mediada pela COX	20
Figura 3 –	Via de sinalização NF- κ B	21
Figura 4 –	Via de sinalização MAPK	22
Figura 5 –	Via de sinalização JAK-STAT	23
Figura 6 –	Comparação de diferentes tecnologias de imagem utilizadas na prática da clínica médica	39
Figura 7 –	Estruturas da Fucana	40
Figura 8 –	Distribuição geográfica de <i>Fucus</i> spp.	41
Figura 9 –	Estrutura da Fucana proveniente de <i>Fucus vesiculosus</i>	42

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Biodistribuição de ^{99m}Tc -Fucana em animais saudáveis	54
Gráfico 2 – Captação de ^{99m}Tc -Fucana em pulmões inflamados e saudáveis	55
Gráfico 3 – Efeito de Fucana no edema e na migração de leucócitos na inflamação articular induzida por zimosan	56
Gráfico 4 – Efeito da Fucana na migração de leucócitos na inflamação pulmonar induzida por LPS	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
BALF	Lavagem broncoalveolar
CLRs	Receptores de lectina do tipo C
COX	Ciclooxigenase
CPM	Contagem por minuto
CR	Receptor de complemento
CT	Tomografia computadorizada
DAMPs	Padrões moleculares associados ao dano celular
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetraacético
EMA	Agência Europeia de Medicamentos
ERKs	Sinal extracelular
FBS	Soro Fetal Bovino
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FDG	Fluorodesoxiglicose
i.p.	Via intraperitoneal
Ig	Imunoglobulinas
IL	Interleucina
INF	Interferon
I κ B	Proteína inibitória kappa B
JAK	Janus quinase
JNK	Quinases c-Jun N-terminal
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPKs	Proteínas quinase ativadas por mitogênio
MMCDs	Medicamentos modificadores do curso da doença
MR	Resonância Magnética
MRI	Imagem de Resonância Magnética
NF- κ B	Fator nuclear kappa-B
NK	<i>Natural killer</i>
NLRs	Receptores NOD

PAMPs	Padrões moleculares associadas a patógenos
PET	Tomografia por Emissão de Póstron
CT	Tomografia Computadorizada
PG	Prostaglandinas
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
Rpm	Rotação por minuto
SPECT	Tomografia por emissão de fóton único
spp	Espécies
SR	Receptor <i>scavenger</i>
STAT	Transdutor de sinal e ativador de transcrição
TLRs	Receptores Toll-like
T _{max}	Tempo máximo
TNF	Fator de necrose tumoral
US	Ultrassonografia
v.o.	Via oral
VEGF	Fator de crescimento de endotelial vascular
VHS	Velocidade de hemossedimentação

LISTA DE SÍMBOLOS

A	Alfa
^{99m}Tc	Tecnécio-99 metaestável
κ	Kappa
β	Beta
g	Grama
mg	Miligrama
γ	Gama
^{18}F	Flúor-18
^{111}In	Índio-111
%	Porcentagem
keV	Quiloelétron-volt
kDa	Kilodalton
°C	Grau celsius
SnCl	Cloreto estanoso
$\text{NaTc}^{99m}\text{O}_4$	Pertecnetato de tecnécio
μL	Microlitro
μg	Micrograma
mL	Mililitro
kg	Quilograma
μCi	Microcurie
MBq	Megabecquerel
mL	Mililitro
CO_2	Gás carbônico
%ID/órgão	Porcentagem da dose injetada por grama de tecido
Mm	Milímetros
Δ	Diferença
\leq	Menor ou igual
h	Horas
Σ	Somatório
^{68}Ga	Gálio-68

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
1.1	Inflamação	17
1.1.1	<u>Fase aguda da inflamação</u>	18
1.1.2	<u>Fase resolutive da inflamação</u>	23
1.1.3	<u>Fase pós-resolutiva da inflamação</u>	25
1.2	Terapia medicamentosa da inflamação	25
1.2.1	<u>Anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs)</u>	26
1.2.2	<u>Anti-inflamatórios esteroidais (corticosteroides)</u>	27
1.2.3	<u>Medicamentos modificadores do curso da doença</u>	28
1.3	Métodos de diagnóstico da inflamação	33
1.3.1	<u>Exames laboratoriais</u>	33
1.3.2	<u>Exames de imagem</u>	35
1.4	Radiofármaco	37
1.5	Fucana	39
1.5.1	<u>Fucana de <i>Fucus vesiculosus</i></u>	40
1.5.2	<u>Atividade anti-inflamatória</u>	42
1.5.3	<u>Atividade antiviral</u>	43
1.5.4	<u>Atividade antitumoral</u>	44
1.5.5	<u>Farmacocinética da Fucana</u>	45
2	OBJETIVOS	47
2.1	Objetivo geral	47
2.2	Objetivos específicos	47
3	MATERIAIS E MÉTODOS	48
3.1	Modelo experimental	48
3.1.1	<u>Animais e reagentes</u>	48
3.1.2	<u>Modelo de artrite induzido por zimosan</u>	48
3.1.3	<u>Modelo de inflamação pulmonar induzido por LPS</u>	49
3.2	Marcação da Fucana com Tecnécio-99m	49
3.3	Estudo de biodistribuição de ^{99m}Tc- Fucana	50

3.4	Captação de ^{99m}Tc- Fucana no sítio inflamado	50
3.5	Recrutamento de leucócitos	51
3.5.1	<u>Contagem total de leucócitos</u>	51
3.5.2	<u>Contagem diferencial de leucócitos</u>	51
3.6	Avaliação do edema	52
3.7	Análises estatísticas	52
4	RESULTADOS	53
4.1	Marcação de Fucana com Tecnécio-99m	53
4.2	Estudo de biodistribuição de ^{99m}Tc- Fucana	53
4.3	Captação de ^{99m}Tc- Fucana no sítio inflamado	54
4.4	Efeito da Fucana na resposta inflamatória induzida por zimosan	55
4.5	Efeito da Fucana na resposta inflamatória induzida por LPS	56
5	DISCUSSÃO	58
5.1	Radiomarcção da Fucana com Tecnécio-99m	58
5.2	Biodistribuição de ^{99m}Tc-Fucana	58
5.3	Captação de ^{99m}Tc-Fucana no sítio inflamado	59
5.4	Efeito da Fucana nos tecidos inflamados	60
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
	REFERÊNCIAS	63
	ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética	72
	ANEXO B - Comprovação de submissão do artigo científico	74
	ANEXO C - Formato final do artigo científico submetido	75
	ANEXO D - Comprovação de aceite do artigo científico	82

INTRODUÇÃO

A inflamação é um mecanismo de defesa vital para a saúde, e é desencadeada por estímulos nocivos, como danos físicos, químicos ou agentes patogênicos e atua removendo estes estímulos para promover a reparação e restaurar a homeostase do tecido afetado (ABDULKHALEQ *et al.*, 2018). No entanto, a falha em resolver a resposta inflamatória ou a sua ativação contínua podem levar ao desenvolvimento da permanência da inflamação que passa a adquirir novas características (ABDULKHALEQ *et al.*, 2018; MEDZHITOV, 2008).

A resposta inflamatória pode levar a alterações do tecido, provocando mudanças no fenótipo e na função celular dos mesmos, levando a um estado de homeostase adaptado, no qual o tecido após a resposta inflamatória é diferente do tecido anterior a este evento, o que contribui para o desenvolvimento e agravamento de muitas doenças (FEEHAN; GILROY, 2019).

A detecção precoce da inflamação requer métodos diagnósticos sensíveis e não invasivos. Nesse sentido, as modalidades de imagem molecular são ferramentas fundamentais, pois permitem avaliar a morfologia do tecido e as alterações bioquímicas e moleculares decorrentes do processo inflamatório. Dentre as possibilidades de imagem molecular disponível, a cintilografia por emissão de fóton único representa uma das mais sensíveis e com ampla utilização global (DUAN; IAGARU; APARICI, 2021; REMPEL; PRICE; PHENIX, 2017; STACY; MAXFIELD; SINUSAS, 2012).

Fucana é um termo geral usado para uma classe de polissacarídeos sulfatados ricos em α -L-fucose, encontrados em pepinos do mar, ouriços do mar e algas marrons que tem sido investigada como agente anti-inflamatório (FLETCHER *et al.*, 2017; LUTHULI *et al.*, 2019). Os diversos efeitos farmacológicos da Fucana, incluem as atividades anti-inflamatória, antiviral e antitumoral, que são atribuídas à sua capacidade de modular algumas ações da resposta imune-inata por meio da interação com diferentes receptores, como os receptores Toll-like (TLRs); receptor 3 do complemento (CR-3); e receptores *scavenger* presentes em células dendríticas, macrófagos e outros leucócitos, bem como receptores de selectina presentes em plaquetas, leucócitos e endotélio ativado (ALE; MIKKELSEN; MEYER, 2011; ASANKA SANJEEWA *et al.*, 2019; CARVALHO *et al.*, 2014; LIN *et al.*, 2020b; WANG *et al.*, 2019). Sabe-se também que a Fucana atua em diferentes fases do processo inflamatório, tais como: bloqueio da adesão e migração celular, inibição de múltiplas enzimas e na indução de apoptose (APOSTOLOVA *et al.*, 2020).

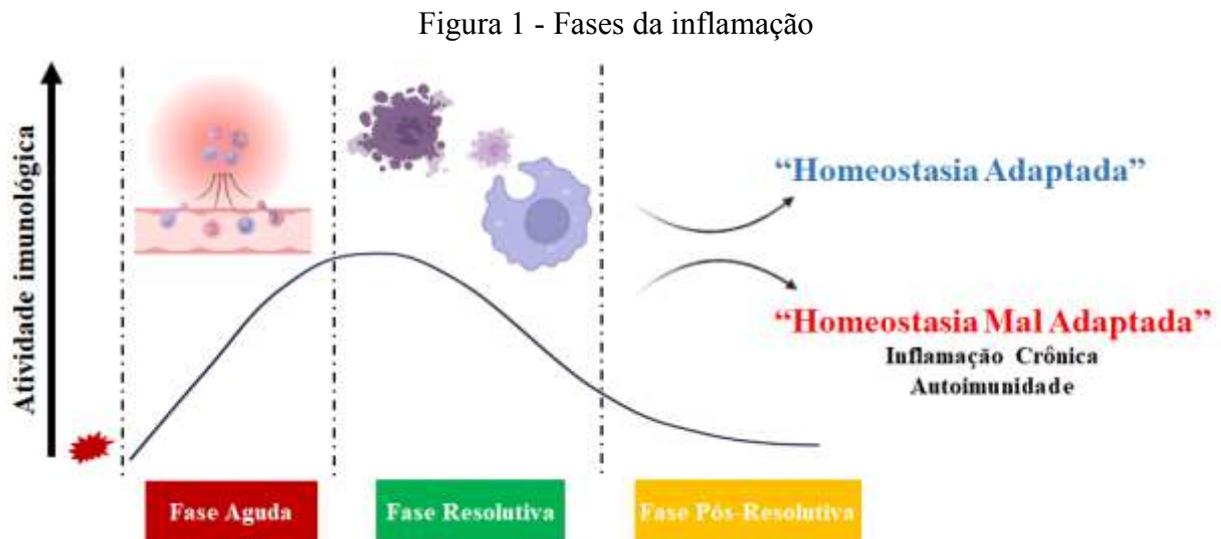
Neste trabalho, foram analisadas as possibilidades de usar-se a Fucana, proveniente da alga *Fucus vesiculosus*, como agente anti-inflamatório assim como seu análogo radiomarcado (^{99m}Tc -Fucana) como agente de imagem para avaliação de processos inflamatórios.

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Inflamação

A inflamação é a resposta do organismo a estímulos nocivos, como danos físicos, químicos ou agentes patogênicos e atua na tentativa de remover estes estímulos prejudiciais e promovendo, na sequência, o processo de resolução com a finalidade de restaurar a homeostase do tecido atingido. Portanto, é um mecanismo de defesa vital para a saúde e para a sobrevivência (PERKINS; ANDERSON; NOVELLI, 2019; TVAROŠKA; SELVARAJ, 2020).

A resposta inflamatória pode ser dividida em três fases (Figura 1): a) a fase aguda, na qual ocorre o gatilho que a desencadeia, caracterizada pela infiltração de leucócitos e dano tecidual; b) fase resolutive, na qual se tem a polarização das células para um perfil mais anti-inflamatório e resolutive, que as permite promover o reparo do tecido e restaurar a homeostase; c) fase pós-resolutive.



Fonte: Adaptado de Feehan e Gilroy (2019).

1.1.1 Fase aguda da inflamação

Embora a resposta inflamatória dependa da natureza do estímulo inicial e do tecido afetado, uma série de mecanismos ocorrem de maneira semelhante, tais como: a) reconhecimento de patógenos (PAMP'S) ou de dano celular (DAMP'S) por meio de receptores de padrão presentes na superfície celular e ativação de fatores plasmáticos (sistema complemento; sistema caliceína-cininas); b) alterações vasculares como vasodilatação e aumento de permeabilidade; c) recrutamento de células inflamatórias ao sítio da inflamação; d) ativação das vias inflamatórias (CHEN *et al.*, 2018; MEDZHITOV, 2008).

Um conjunto limitado e definido de padrões moleculares conservados que são transportados por microrganismos sejam patogênicos ou comensais são chamados de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Esses PAMPs podem desencadear o processo inflamatório através da ativação de um conjunto correspondente de receptores, denominados de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) expressos na superfície das células residentes do tecido afetado (ZINDEL; KUBES, 2020).

Alguns PRRs também reconhecem biomoléculas endógenas liberadas durante o dano celular, estresse ou mau funcionamento, conhecidos como padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) que podem iniciar e perpetuar uma resposta inflamatória não infecciosa. As principais famílias de PRR incluem os receptores Toll-like (TLRs), receptores de lectina do tipo C (CLRs) e receptores NOD (NLRs) (ZINDEL; KUBES, 2020).

A ativação dos sistemas plasmáticos e a liberação de aminas vaso-ativas, citocinas e outros mediadores químicos por células residentes, induz a vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e da expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular local resultando no recrutamento de leucócitos para o sítio (ABDULKHALEQ *et al.*, 2018; MEDZHITOV, 2008).

O processo de infiltração de leucócitos é resultado de três etapas fundamentais, o rolamento, a adesão e a diapedese. Estas etapas são dependentes da presença de moléculas de adesão expressas nos leucócitos circulantes e no endotélio vascular, além da produção de fatores quimiotáticos que vão direcionar o processo de recrutamento (GERMOLEC *et al.*, 2018).

A primeira etapa, que corresponde ao rolamento de leucócitos sobre o endotélio vascular ativado, é dependente da expressão de E e P selectinas nas células endoteliais que reconhecem os receptores L-selectina presentes nos leucócitos circulantes. Este reconhecimento promove

interações de baixa afinidade que resultam no rolamento da célula sobre o endotélio, reduzindo a sua velocidade e facilitando o processo de adesão (HARJUNPÄÄ *et al.*, 2019).

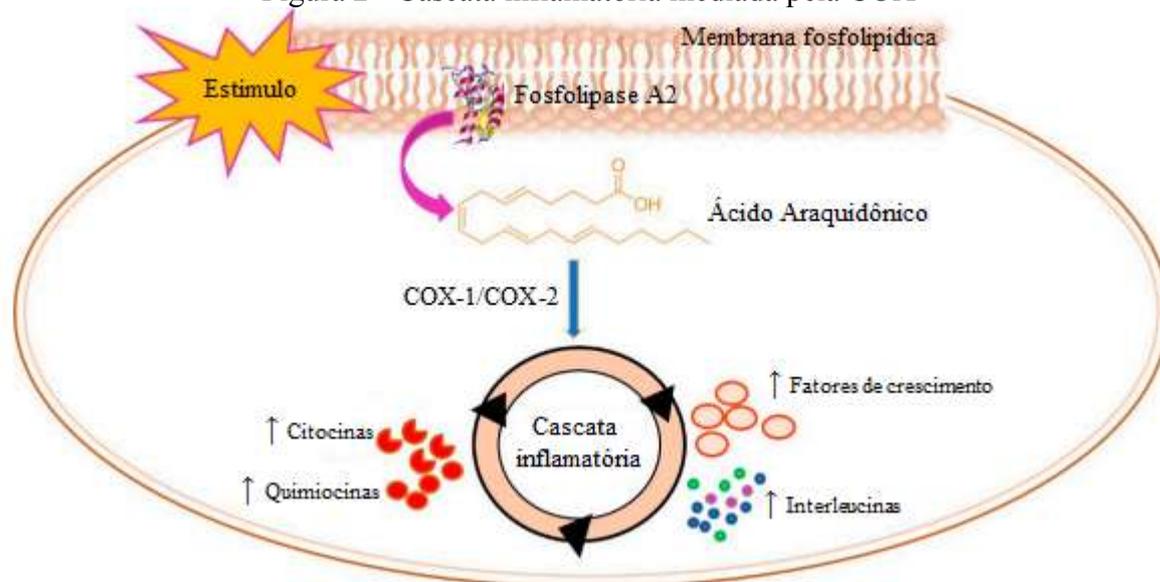
Na etapa seguinte, a adesão, que corresponde a interações de alta afinidade entre o endotélio e o leucócito, é mediada por interação entre integrinas e seus ligantes. As integrinas não estão constitutivamente ativas e, portanto, não são capazes de se ligar a seus ligantes. Sua atividade depende de uma mudança conformacional de sua estrutura desencadeada por um processo de sinalização celular iniciada por outros receptores de superfície, como receptores de quimiocinas, receptores Toll-like (TLRs) e selectinas (HARJUNPÄÄ *et al.*, 2019).

Após essa adesão estacionária, as células podem deixar o vaso sanguíneo para alcançar o espaço subendotelial, processo conhecido como diapedese, no qual o leucócito se comprime através das células endoteliais (MULLER, 2013).

Os estímulos inflamatórios ativam a via do ácido araquidônico, proveniente dos fosfolípidios de membrana e ativam, entre outras, a via da ciclooxigenase (COX). São conhecidas duas isoformas da enzima ciclooxigenase (COX), COX-1 e COX-2, ambas são responsáveis por catalizar a produção de eicosanoides a partir do ácido araquidônico presentes na membrana celular. A COX-1 é a isoforma expressa constitutivamente na maioria dos tecidos e é responsável por manter as funções fisiológicas normais, como proteção gástrica, modulação da função plaquetária e homeostase renal. Já a COX-2 é a isoforma induzível por estímulos pró-inflamatórios. Sua expressão pode ser rapidamente induzida por citocinas, promotores de tumor, fatores de crescimento, substâncias bacterianas e trombina. Verificou-se que ambas as isoformas são expressas constitutivamente em diferentes tecidos (PERRONE *et al.*, 2020).

As enzimas COX convertem o ácido araquidônico na prostaglandina H₂ (PGH₂), que é então convertida em prostaglandinas (PG), como PGE₂, PGF₂ α , PGD₂ e PGI₂, e tromboxano A₂ por meio de enzimas específicas (Figura 2). PGs estão envolvidas na regulação das respostas inflamatórias, ativando e regulando outras vias de sinalização (PICADO; ROCA-FERRER, 2020).

Figura 2 - Cascata inflamatória mediada pela COX



Fonte: Adaptado de Perrone *et al.* (2020).

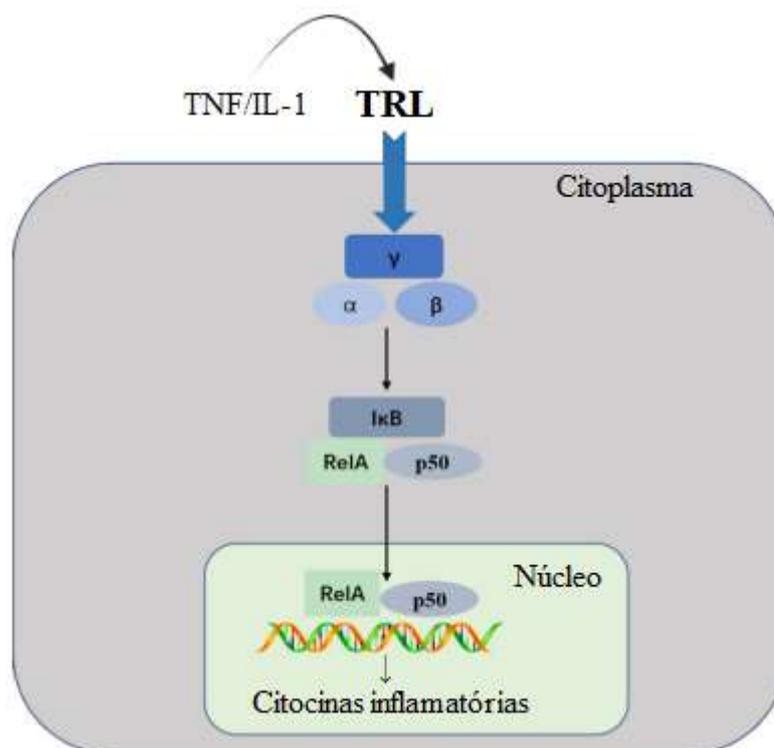
Os estímulos inflamatórios ativam ainda importantes vias de sinalização intracelular como a proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK); o fator nuclear kappa-B (NF- κ B); a Janus quinase (JAK) e transdutor de sinal e ativador de transcrição (STAT) que direta ou indiretamente levam à produção de um grande número de citocinas pró-inflamatórias e proteínas reguladoras, que por sua vez, que podem exercer grande impacto na patogênese de uma série de doenças crônicas (CHEN *et al.*, 2018; IVANENKOV; BALAKIN; LAVROVSKY, 2011).

O fator de transcrição nuclear-kappaB (NF-kappaB) é conhecido por seu papel crucial durante respostas imunes e inflamatórias, crescimento celular, sobrevivência e desenvolvimento. Uma aberrante ativação do NF- κ B está associada ao desenvolvimento do câncer e contribui para a patogênese de doenças inflamatórias crônicas como artrite reumatoide e esclerose múltipla. A expressão dependente de NF- κ B de citocinas pró-inflamatórias, moléculas de adesão, metaloproteinases e outros mediadores desempenham papéis críticos na iniciação e perpetuação da inflamação (HAYDEN; GHOSH, 2008). A família NF- κ B inclui cinco fatores de transcrição: P50, P52, RelA (p65), RelB e c-Rel (SUGHRA *et al.*, 2010).

A atividade de NF- κ B é induzida por um gama de estímulos, incluindo substâncias derivadas de patógenos, citocinas inflamatórias intercelulares e enzimas. Em condições fisiológicas a proteína inibitória kappa B (I κ B) presente no citoplasma inibe o NF- κ B. PRRs ativam uma proteína quinase que promove a fosforilação de I κ B, resultando em sua degradação

e a consequente liberação de NF- κ B, o que possibilita sua translocação para o núcleo, onde irá promover a transcrição de genes (Figura 3) (LIU *et al.*, 2017).

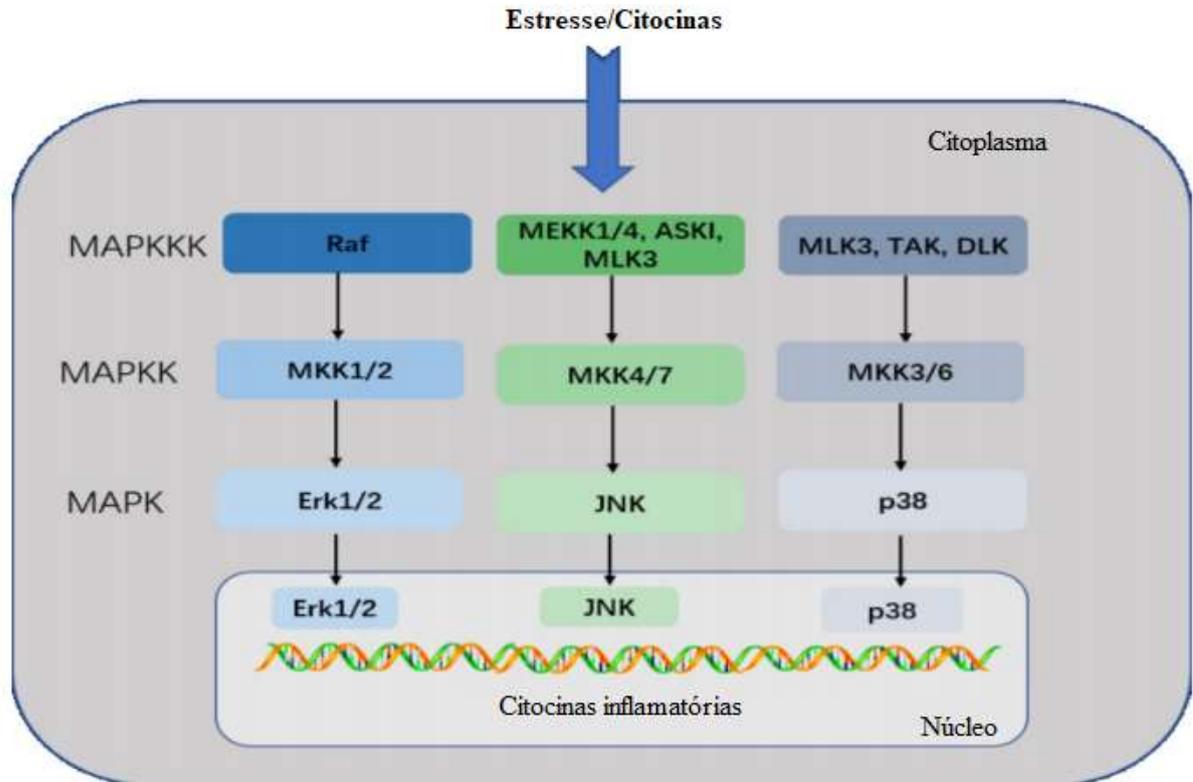
Figura 3 - Via de sinalização NF- κ B



Fonte: Adaptado de Chen *et al.* (2018).

Proteínas quinase ativadas por mitogênio (MAPKs) são uma família de proteínas quinases que direcionam as respostas celulares a partir de uma variedade de estímulos, incluindo estresse osmótico, mitógenos, choque térmico, e citocinas inflamatórias (como IL-1, TNF- α e IL-6), que regulam a proliferação, diferenciação, sobrevivência celular e apoptose (MAI *et al.*, 2020). Cada via de sinalização de MAPK compreende pelo menos três componentes: uma MAPK, uma MAPK quinase (MAPKK), e uma quinase quinase MAPK (MAPKKK). MAPKKKs fosforilam e ativam MAPKKs, que por sua vez fosforilam e ativam MAPKs. Quinases reguladas por sinal extracelular (ERKs) são geralmente ativadas por mitógenos e sinais de diferenciação, enquanto estímulos inflamatórios e estresse ativam quinases c-Jun N-terminal (JNK) e p38 (TERAMOTO; GUTKIND, 2004). A ativação de MAPKs, Erk1 / 2, JNK e p38 leva a fosforilação e ativação de fatores de transcrição resultando na regulação da resposta inflamatória (Figura 4).

Figura 4 - Via de sinalização MAPK



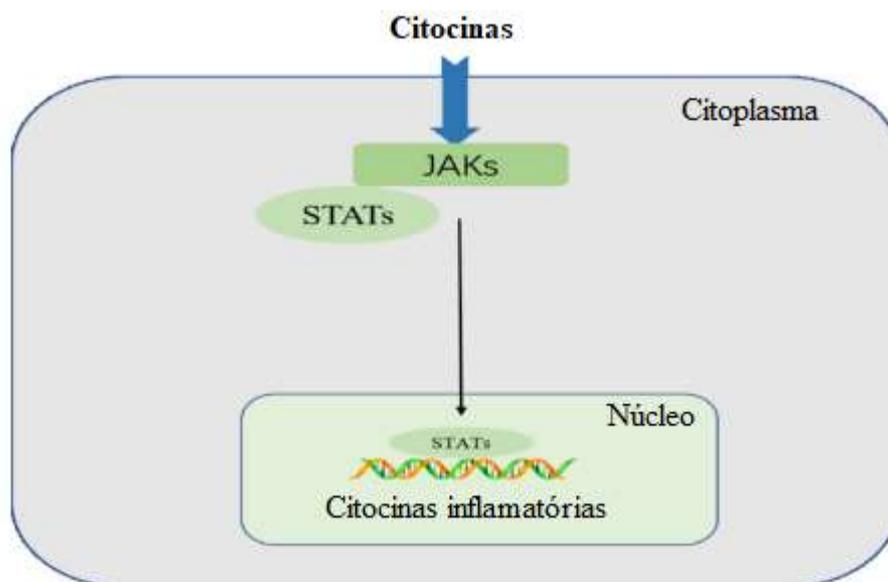
Fonte: Adaptado de Chen *et al.* (2018).

A via JAK-STAT envolve diversas citocinas, fatores de crescimento, interferons e moléculas afins, sendo um mecanismo de sinalização através do qual fatores extracelulares podem controlar a expressão gênica (WITTE; MULJO, 2014).

A cascata de sinalização é iniciada quando as citocinas se ligam aos seus receptores, cujas cadeias se oligomerizam. Este processo causa a separação das subunidades intracelulares do receptor de citocina que dissocia os JAKs, revertendo a inibição constitutiva o que resulta em sua ativação. Os JAKs fosforilam a si próprios, servindo de locais de ancoragem para STATs que, por sua vez, também são fosforilados. Quando fosforilado por JAKs, os monômeros de STAT citosólicos inativos sofrem uma alteração conformacional que permite sua translocação para o núcleo, onde atuam como fatores de transcrição capazes de regular a expressão gênica (Figura 5). Portanto, a sinalização JAK-STAT permite a tradução direta de um sinal extracelular em uma resposta transcricional (WITTE; MULJO, 2014).

Existem quatro JAK conhecidas, são elas JAK1, JAK2, JAK3 e TYK2 e existem sete membros conhecidos de STAT em mamíferos, são eles STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B e STAT6 (BANERJEE *et al.*, 2017).

Figura 5 - Via de sinalização JAK-STAT



Fonte: Adaptado de Chen *et al.* (2018).

1.1.2 Fase resolutiva da inflamação

A resolução é o processo responsável por desligar a inflamação e era tradicionalmente caracterizado como um processo passivo. No entanto, atualmente há a ideia de que a resolução é um processo ativo caracterizado por uma sequência de eventos, tais quais: a) interrupção do influxo de leucócitos; b) morte e remoção de neutrófilos; c) polarização de macrófagos (FEEHAN; GILROY, 2019). Esses eventos são coordenados por um conjunto de mediadores, como IL-10 e TGF- β 1, e numerosos fatores de crescimento, incluindo PDGF, IGF-1 e VEGF- α (MARUYAMA *et al.*, 2020; SUGIMOTO *et al.*, 2019).

A fim de prevenir a progressão da inflamação aguda para inflamação crônica persistente e de restaurar a homeostase, a reação inflamatória deve ser resolvida e, assim, evitar mais danos ao tecido afetado (ZHAO *et al.*, 2021). A resolução da inflamação depende da interrupção do recrutamento de neutrófilos, que é a população de leucócitos mais abundante em locais inflamatórios. Este processo é controlado por mediadores lipídicos pró-resolutivos (resolvinas) que são capazes de inibir o recrutamento de neutrófilos regulando negativamente a expressão de receptores de quimiocinas, tornando-os não responsivos. Além disso, esses mediadores pró-resolutivos promovem oxidação e modificação de fosfolipídios de membrana de macrófagos e eosinófilos, alterando as propriedades biofísicas da membrana celular, o que contribui para a

depuração não imunogênica de células apoptóticas, mantendo a tolerância imunológica durante o processo de resolução (SCHETT; NEURATH, 2018).

Para a resolução efetiva da inflamação, além da interrupção do recrutamento de neutrófilos, a remoção destas células ainda presentes no local da inflamação é fundamental para limitar suas ações potencialmente prejudiciais (GREENLEE-WACKER, 2016; SCHETT; NEURATH, 2018).

Por fim, a apoptose de neutrófilos deve ocorrer mediante duas cascatas de sinalização: a via intrínseca, na qual ocorre a perda da integridade da mitocôndria, havendo a liberação de citocromo C; e a via extrínseca, que responde à sinalização extracelular (GREENLEE-WACKER, 2016).

Após a apoptose, os neutrófilos são rapidamente eliminados por macrófagos por meio de fagocitose, processo denominado de eferocitose. A captação de neutrófilos apoptóticos desencadeia a conversão de macrófagos pró-inflamatória em macrófagos com fenótipos anti-inflamatório, imunorregulador e pró-resolutivo. Essa polarização é importante para manter a tolerância do tecido local e nos órgãos linfoides de drenagem e, assim, limitar o dano ao tecido. Este fenótipo pró-resolutivo é caracterizado pela regulação positiva de moléculas co-inibidoras bem como a regulação positiva de genes anti-inflamatórios, resultando na liberação de citocinas anti-inflamatórias e mediadores lipídicos pró-resolução especializados (GREENLEE-WACKER, 2016).

Essa mudança de fenótipo parece ser baseada tanto em fatores intrínsecos, relacionados com o controle metabólico da célula, uma vez que diferentes padrões de produção de energia orientam o estado funcional destas células e mecanismos extrínsecos, no qual moléculas liberadas por eosinófilos e por células residentes no tecido induzem esse fenótipo (SCHETT; NEURATH, 2018).

Assim, a eferocitose é necessária para a eliminação de neutrófilos apoptóticos e para gerar um fenótipo de macrófago anti-inflamatório propício à resolução. Acredita-se que problemas relacionados a depuração de células apoptóticas pode levar ao acúmulo de corpos apoptóticos que abrigam elementos imunogênicos responsáveis pela formação de autoanticorpos (FEEHAN; GILROY, 2019).

1.1.3 Fase pós-resolutiva da inflamação

Em alguns casos a resolução não é o fim da resposta inflamatória, havendo ainda atividade celular após a conclusão da cascata de resolução, o que leva à alterações bioquímicas, fenotípicas e funcionais nas células do tecido envolvido (BAGATINI *et al.*, 2017; FEEHAN; GILROY, 2019). O resultado é um microambiente imunossupressor com um grande número de citocinas e células imunossupressoras (macrófagos M2 e linfócitos T reguladores). Essas mudanças são capazes de promover a ativação de oncogenes, danos ao DNA e proteínas, liberação de espécies reativas de oxigênio e afetam múltiplas vias de sinalização, incluindo NF- κ B, MAPK, e P53, levando a doenças crônicas (ZHAO *et al.*, 2021).

Embora novas terapias estejam sendo desenvolvidas, a incidência de complicações permanece alta. Isso ocorre em parte porque as terapias convencionais não são específicas para o tecido afetado. Não obstante, as abordagens diagnósticas atuais não permitem a identificação específica do processo inflamatório, incapacitando uma atuação eficaz (STRONG *et al.*, 2005; TABAS; GLASS, 2013).

1.2 **Terapia medicamentosa da inflamação**

Na busca por descobrir tratamentos para doenças imunomediadas, os principais alvos são as etapas iniciais do processo inflamatório e os sintomas associados a ela (FEEHAN; GILROY, 2019). A maioria das terapias atuais não aborda a origem do problema o que configura a urgente necessidade do desenvolvimento de terapias melhores. Várias vias de sinalização e citocinas associadas ao processo inflamatório já foram identificadas e já são usadas como alvo para tratamento de diversas doenças de componente inflamatório, como artrite reumatoide, psoríase, gota, doenças inflamatórias intestinais e alguns tipos de câncer.

Neste trabalho, serão abordadas três classes medicamentos utilizados no tratamento de processo inflamatório, são elas: a) anti-inflamatórios não-esteroidais; b) anti-inflamatórios esteroidais; c) medicamentos modificadores do curso da doença (MMCDs).

1.2.1 Anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs)

Os medicamentos anti-inflamatórios não esteroidais, AINEs, tem como mecanismo de ação a inibição da ciclooxigenase (COX), responsável pela produção de mediadores inflamatórios. São amplamente usadas no tratamento de sintomas agudos, como febre e dor, condições inflamatórias crônicas e para prevenção e tratamento de cânceres (BINDU; MAZUMDER; BANDYOPADHYAY, 2020). Essa classe de fármacos é dividida entre dois grupos, os inibidores de COX seletivos e os inibidores de COX não seletivos. Os seletivos são aqueles que visam principalmente a COX-2, cuja expressão é induzida e está mais ativa frente a processos inflamatórios. Os não seletivos atuam tanto na COX-1, que é a isoforma constitutivamente expressa, como na COX-2. Vale ressaltar que a COX-2 é constitutiva em alguns tecidos, como o sistema nervoso central, o tecido renal e em células endoteliais (GKRETSI; ZACHARIA; STYLIANOPOULOS, 2017).

A seletividade destes AINEs para COX-1 / COX-2 é variável. Alguns deles inibem COX-1 e COX-2 com potência comparável, como ibuprofeno, cetoprofeno, piroxicam e indometacina; outros têm maior seletividade para COX-2, como meloxicam, nimesulida e diclofenaco e outros são altamente seletivos para COX-2, como a classe dos coxibes, eterocoxibe e celecoxibe. O ácido acetilsalicílico tem ação anti-inflamatória em doses mais elevadas, de 500 mg a 1g e ação antiagregante plaquetário em doses menores, de 150 – 325 mg, via inibição de COX-1 presente em plaquetas, promovendo a redução na síntese de tromboxano A₂, o que permite seu uso na prevenção de infarto do miocárdio e de acidente vascular encefálico (ROBB *et al.*, 2020).

Apesar do claro benefício de seu uso no tratamento de processo inflamatórios, muitos efeitos adversos estão relacionados a estes medicamentos. No tratamento de doenças inflamatórias crônicas com AINEs, o desenvolvimento de lesão da mucosa gástrica consiste na principal limitação. Os AINEs inibem a produção de PGE₂ e PGI₂ que são prostaglandinas gastroprotetora, infligindo assim lesão na mucosa gástrica. Além de complicações cardiovasculares e gastrointestinais, os AINEs também apresentam alto grau de nefrotoxicidade, pois altas doses de AINEs estão relacionadas com o desenvolvimento de insuficiência renal aguda e o uso contínuo, a insuficiência renal crônica (BINDU; MAZUMDER; BANDYOPADHYAY, 2020).

1.2.2 Anti-inflamatórios estereoidais (corticosteroides)

Os corticosteroides (glicocorticoides e mineralocorticoides) são um grupo de fármacos, estruturalmente relacionados com o hormônio cortisol, e apresentam uma ampla variedade de aplicações terapêuticas, principalmente em relação às suas propriedades anti-inflamatórias e imunossupressoras (PRESHAW, 2018).

Os efeitos promovidos pelos corticosteroides ocorrem através de dois mecanismos principais, o mecanismo genômico e ações não genômicas. Durante o mecanismo genômico, o agente se difunde através da membrana lipídica e se liga ao seu receptor localizado no citoplasma. O complexo formado entre o receptor e o corticosteroide se transloca para o núcleo, onde interage com as moléculas de DNA e promove a modulação da transcrição de genes (ABBASI *et al.*, 2019). Como resultado se tem a redução da ativação, proliferação, diferenciação e sobrevivência de várias células envolvidas na produção de mediadores inflamatórios, como IL- 1, IL- 2, IL- 3, IL- 6, TNF- α , INF- γ e IL- 17. Os corticosteroides ainda podem suprimir a função e a proliferação de células T e a expansão clonal de linfócitos B bem como a síntese de anticorpos (ALANI; SEYMOUR, 2014).

Os principais efeitos adversos atrelados ao uso contínuo de corticosteroides são a diminuição da captação de glicose e aumento da gliconeogênese, levando a um aumento do risco de diabetes; diminuição da síntese de proteínas e aumento da degradação de proteínas, especialmente no tecido muscular esquelético, causando perda muscular; osteoporose; supressão do córtex adrenal, levando a um risco aumentado de crise adrenocortical; redistribuição de gordura corporal; cicatrização de feridas prejudicada; imunossupressão, risco aumentado de infecções oportunistas; hipertensão; alterações neurológicas dentre outras (ALANI; SEYMOUR, 2014).

Quase todos os ramos da medicina usam corticosteroides para tratar uma variedade de doenças. Eles podem ser usados em doses fisiológicas para distúrbios endócrinos, como a doença Addison. São comumente usados para osteoartrite e doenças reumáticas como artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico, e a artrite psoriática que envolvem processos inflamatórios e autoimunes descontrolados. Os corticosteroides são usados em transplante de órgãos sólidos como imunossupressores em combinação com outros medicamentos para evitar rejeição do órgão transplantado. Ainda podem ser aplicados pela via inalatória para tratamento da doença pulmonar obstrutiva crônica e da asma e pela via tópica para tratamento de reações de hipersensibilidade dermatológicas ou oftalmológicas (KAPUGI; CUNNINGHAM, 2019).

1.2.3 Medicamentos modificadores do curso da doença

Os medicamentos modificadores do curso da doença (MMCDs), em inglês disease-modifying antirheumatic drugs (DMARD), agem alterando a evolução da doença e impedem novos focos de inflamação, tentando manter a remissão da mesma. Apresentam indicação para o tratamento de doenças reumáticas, incluindo artrite reumatoide, artrite psoriática e espondilite anquilosante. Eles também podem ser usados no tratamento de outras doenças, incluindo doenças do tecido conjuntivo, como esclerose sistêmica, lúpus eritematoso sistêmico e síndrome de Sjogren, bem como no tratamento de miosite inflamatória, vasculite, uveíte, doença inflamatória intestinal e alguns tipos de câncer. Cada MMCDs tem um mecanismo de ação único, interferindo em última análise nas vias críticas da cascata inflamatória.

Os MMCDs disponíveis podem ser subdivididos em: a) MMCDs sintéticos convencionais, que são metotrexato, hidrocloroquina; sulfadiazina; e leflunomida; b) MMCDs sintéticos direcionados, inibidores JAK; c) MMCDs biológicos, que se diferenciam dos sintéticos, por serem produzidos em células vivas (LIN; ANZAGHE; SCHÜLKE, 2020).

MMCDs sintéticos convencionais mais utilizados são o metotrexato; hidroxicloroquina; sulfassalazina; e leflunomida.

O metotrexato, que é a escolha mais comum de MMCD como agente de primeira linha, uma vez que seu perfil de segurança e toxicidade já está estabelecido além de ter baixo custo relativo. Seu mecanismo de ação não é totalmente compreendido, mas sabe-se que é um análogo estrutural do ácido fólico que prejudica a síntese de DNA e aumenta a liberação de adenosina por meio de efeitos sobre muitas enzimas diferentes, resultando na diminuição da resposta inflamatória e da proliferação de linfócitos (ABBASI *et al.*, 2019).

A hidroxicloroquina, um agente antimalárico, que se acumula em lisossomas onde inibe algumas funções importantes pelo aumento do pH. Este medicamento provou ser eficaz em várias doenças autoimunes devido a suas propriedades anti-inflamatória e imunomoduladora. A cardiotoxicidade e retinopatia são as principais complicações que ocorrem com o uso frequente e em altas doses desse medicamento (PONTICELLI; MORONI, 2017).

Já a sulfassalazina, que apresenta um componente salicilato e de sulfa, é indicada para o tratamento e gerenciamento de doenças autoimunes e inflamatórias crônicas, como artrite reumatóide e colite ulcerosa. Também tem uso off-label no tratamento de pacientes com espondilite anquilosante, doença de Crohn leve a moderadamente ativa, psoríase e artrite psoriática (LITTLEJOHN; MONRAD, 2018). A descrição detalhada do mecanismo de ação da

sulfassalazina ainda não é completamente elucidado, mas seus efeitos imunomoduladores são descritos, incluindo a inibição do fator de transcrição nuclear kappa-B (NF-kB), suprimindo assim a transcrição de genes pró-inflamatórios; inibição da expressão do TNF- α induzindo a apoptose pela caspase 8 em macrófagos; inibição do recrutamento de leucócitos; inibição da função dos linfócitos B, suprimindo a produção de IgM e IgG (ABBASI *et al.*, 2019; RODENBURG *et al.*, 2000).

E, por último, a leflunomida que é um medicamento imunomodulador, aprovado para o tratamento da artrite reumatoide e tem mostrado ter ações terapêuticas promissoras no tratamento de tumores. Este fármaco atua inibindo a enzima mitocondrial diidroorotato desidrogenase, impedindo a síntese de ribonucleotídeo uridina monofosfato pirimidina (rUMP) o que leva a ativação de P53, que restringe a progressão da fase G1 para a fase S no ciclo celular. Essa restrição interrompe a proliferação de linfócitos ativados e autoimunes, promovendo efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores (FOX *et al.*, 1999; ZHANG; CHU, 2018).

Em contraste com os MMCDs sintéticos convencionais mencionados acima, MMCDs sintéticos direcionados foram desenvolvidos especificamente para atingir uma etapa chave na indução de doenças inflamatórias mediada por citocinas, a via JAK-STAT e, assim, evitam ativação de células imunes e respostas inflamatórias subsequentes (LIN; ANZAGHE; SCHÜLKE, 2020).

A grande importância da via de sinalização JAK-STAT na homeostase do sistema imunológico justifica o direcionamento dessa via para tratar doenças autoimunes e inflamatórias. O potencial de inibição de JAK como estratégia terapêutica foi reconhecido na década de 1990, com o desenvolvimento de tofacitinibe, o primeiro inibidor de JAK aprovado em muitos países, é um inibidor de pan-JAK que impede o recrutamento e ativação de JAK1, JAK2 e JAK3, embora com maior atividade inibitória para JAK1 / 2 do que JAK3. Em menos de 20 anos depois dois inibidores de JAK foram aprovados pela FDA: ruxolitinibe para o tratamento de neoplasia mieloproliferativa e tofacitinibe para o tratamento da artrite reumatoide (CLARK; FLANAGAN; TELLIEZ, 2014). O baricitinibe é um inibidor JAK1 / 2 específico com aprovação da EMA para tratamento de pacientes com artrite reumatoide moderada ou grave (LIN; ANZAGHE; SCHÜLKE, 2020).

Os inibidores de JAK agem bloqueando competitivamente o local de ligação de trifosfato de adenosina da JAK por meio de interações não covalentes. Semelhanças estruturais deste sítio de ligação aos domínios ativos de várias outras tirosina quinases representam um desafio para o desenvolvimento de um composto que bloqueia especificamente JAKs (BANERJEE *et al.*, 2017).

Os MMCDs biológicos atualmente aprovados têm quatro mecanismos de ação: a) neutralizar ou inibir receptores de citocinas inflamatórias; b) inibir a coestimulação de células T; c) depletar células B (PRESHAW, 2018). Os principais MMCDs biológicos utilizados serão relatados aqui e estão resumidos abaixo na Tabela 1.

Tabela 1 - Principais MMCDs biológicos

MMCDs biológicos		
Medicamento	Alvo terapêutico	Referência
Etanercept	Receptor circulante de TNF α	(ZHANG <i>et al.</i> , 2021)
Infliximabe	Inibidor de TNF α	
Adalimumabe	Inibidor de TNF α	
Certolizumabe	Inibidor de TNF α	
Golimumabe	Inibidor de TNF α	(MCELVANEY <i>et al.</i> , 2021)
Tocilizumabe	Antagonista do receptor de IL-6	
Sarilumabe	Antagonista do receptor de IL-6	
Siltuximabe	Inibidor de IL-6	(DINARELLO, 2011)
Anakinra	Antagonista do receptor de IL-1	
Riloncept	Inibidor de IL-1 β , IL-1 α e do antagonista endógeno	
Canacinumabe	Inibidor de IL-1 β	(DUBOIS; RISSMANN; COHEN, 2011)
Abatacept	Inibição de ativação e proliferação de linfócitos T	(HOSSEINI <i>et al.</i> , 2020)
Rituximabe	Inibição de ativação e proliferação de linfócitos B	(BERGANTINI <i>et al.</i> , 2020)

Fonte: A autora, 2022.

O conhecimento do papel das citocinas e de outros mediadores da inflamação crônica oferece uma nova abordagem imunofarmacológica para o tratamento do quadro inflamatório de várias doenças, usando anticorpos monoclonais que funcionam como anticitocinas, capazes interferir ou neutralizar o complexo citocina-receptor, podendo ter como efeito final a inibição da transdução de sinal; alteração da transcrição ou de processos de tradução (DAMSKY *et al.*, 2021).

Essa abordagem, embora eficaz, assume o risco de respostas imunes fisiológicas contundentes que levam, em último caso, ao aumento do risco de infecção. Além disso, tais tratamentos geralmente são realizados por toda a vida (FEEHAN; GILROY, 2019).

O primeiro produto biológico aprovado para o tratamento de doenças autoimunes foi infliximab, um anticorpo monoclonal quimérico contra TNF- α . Foi aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) para o tratamento da doença de Crohn em 1998 e depois para o tratamento de artrite reumatoide em 1999. Atualmente, existem 5 produtos biológicos anti-TNF aprovados e disponíveis para os pacientes, sendo que quatro desses fármacos são anticorpos

anti-TNF α , Infliximabe, Adalimumabe, Certolizumabe e Golimumabe, que visam sequestrar TNF α impedindo sua ligação aos seus receptores. A única exceção é, etanercept, que é um receptor circulante TNF α que inibe competitivamente a ligação do TNF α ao seu receptor presente na superfície celular, prevenindo respostas celulares (ZHANG *et al.*, 2021). Estes produtos biológicos abriram caminho para o desenvolvimento de outros anticorpos terapêuticos, incluindo inibidores de IL-6,IL-1.

A IL-6 é uma citocina secretada por células T importante para a produção de anticorpos pelas células B, sendo, por tanto, uma via importante na regulação imunológica e que está envolvida com muitas doenças. O direcionamento da via da IL-6 tem levado a abordagens terapêuticas para tratamentos de várias doenças reumáticas, como artrite reumatoide, artrite idiopática juvenil, doença de Still, arterite de células gigantes e arterite de Takayasu, bem como outras condições como a doença de Castleman e a síndrome de liberação de citocinas, uveíte, neuromielite óptica e, mais recentemente, pneumonia por COVID-19 (CHOY *et al.*, 2020).

A IL-6 se liga ao receptor IL-6 (IL-6R) e glicoproteína 130 (gp130) para formar um complexo hexamérico. Tanto o receptor IL-6 ligado à membrana quanto o receptor IL-6 solúvel podem fazer parte do complexo hexamérico e estão associados às vias clássicas de sinalização e trans-sinalização, respectivamente. Ambas as rotas de sinalização envolvem a JAK / STAT que também pode ser alvo de direcionamento terapêutico, como exposto anteriormente. Tocilizumabe, Siltuximabe e Sarilumabe são os inibidores farmacológicos da sinalização de IL-6, previnem sua ligação ao IL-6R, tendo como alvo a própria citocina ou o seu receptor (MCELVANEY *et al.*, 2021).

O tratamento com inibidores da via de IL-6 está associado a elevação da concentração sérica de transaminases, que não parecem ser resultado de uma lesão hepática permanente ou clinicamente evidente; pancreatite; perfurações gastrointestinais, cujos eventos ocorreram em pacientes com fatores de risco pré-existentes (como diverticulite ou uso de anti-inflamatórios); aumento da concentração sérica de lipídios; e também foi observado incidência aumentada de infecção bacteriana (MCELVANEY *et al.*, 2021).

Mais do que qualquer outra família de citocinas, a família da IL-1 é, principalmente, associada a inflamação aguda e crônica. A produção de IL-1 é induzida em resposta a estímulos inflamatórios e medeia vários mecanismos fisiológicos, e tem sido associado a muitas condições patológicas como sepse, artrite, disfunção autoimune e isquemia cerebral. Os principais ligantes do receptor de IL-1 são IL-1 α ; IL-1 β ; e IL-1RA, sendo este último um antagonista endógeno (DINARELLO, 2011; MURRAY; PARRY-JONES; ALLAN, 2015). A fim de exercer suas ações pró-inflamatórias, IL-1 deve se ligar dois receptores, um é o receptor

de IL-1 propriamente dito (IL-1-R1) e o outro é uma proteína acessória (IL-1-RAcP). Esses receptores formam um complexo na membrana que irá desencadear a transdução do sinal (DUBOIS; RISSMANN; COHEN, 2011).

IL-1 emergiu como um alvo terapêutico para um número crescente de condições inflamatórias sistêmicas e locais, chamadas doenças autoinflamatórias. Para estes, a neutralização de IL-1 resulta em uma redução rápida e sustentada da gravidade da doença (DINARELLO, 2011). A exploração dos receptores de IL-1 começou em 1993 com a introdução de anakinra. Depois, nos anos 2000, outras duas opções farmacológicas foram inseridas com o objetivo de inibir essa via de sinalização pró-inflamatória riloncept, e canacinumabe (BUCKLEY *et al.*, 2020).

Anakinra é um antagonista do receptor de IL-1, ou seja, este fármaco é capaz de bloquear a atividade biológica do receptor de IL-1 inibindo competitivamente a ligação de IL-1 α e IL-1 β ao receptor. O riloncept, também conhecido como IL-1 TRAP, é uma proteína dimérica de fusão constituída por dois domínios de ligação, um que corresponde a porção extracelular do receptor de IL-1 e o outro que corresponde a proteína acessória do receptor da IL-1, que estão fundidos à porção Fc da IgG humana. Riloncept liga-se e bloqueia a atividade da citocina IL-1 e se liga à IL-1 β e à IL-1 α , além de se ligar ao antagonista endógeno do receptor de IL-1, porém com uma afinidade mais fraca do que a afinidade pelas citocinas propriamente ditas. Este fármaco é uma construção a partir de duas cadeias extracelulares do receptor de IL-1 e de sua proteína acessória fundidas ao segmento Fc de IgG. Já o canacinumabe é um anticorpo monoclonal humanizado direcionado contra IL-1 β , e não apresenta reatividade cruzada com IL-1 α e com o receptor de IL-1. O riloncepte e o canacinumabe atuam, cada um, prendendo o IL-1 β antes de se ligar ao seu complexo receptor, evitando os efeitos pró-inflamatórios (DINARELLO, 2011; DOHERTY; BRYDGES; HOFFMAN, 2011; DUBOIS; RISSMANN; COHEN, 2011).

Os principais efeitos colaterais relatados foram reações locais no local da injeção, incluindo vermelhidão, erupção na pele, coceira ou dor; hematomas ou sangramento podem ocorrer, mas são muito raros; aumento do risco de infecção; dores de cabeça; vômitos; artralgias; pirexia e nasofaringite; diarreia; e náusea (BACHOVE; CHANG, 2014).

Abatacept também é um anticorpo monoclonal usado para bloquear seletivamente a co-estimulação de CD28 que interfere na ativação proliferação e sobrevivência de células T. Ele é capaz de inibir a ativação de células T naive, portanto, inibe seletivamente a resposta de células T a antígenos específicos em vez de promover ampla imunossupressão. Foi aprovado pelo FDA em 2005 para o tratamento da artrite reumatoide e em 2009 para o tratamento da artrite

idiopática juvenil (OSSEINI *et al.*, 2020; RACHID *et al.*, 2020). Vem sendo investigado para uso em diversas doenças autoimunes, como a doença inflamatória intestinal; esclerose múltipla; diabetes tipo 1; miastenia gravis; doença de Sjogrens; e lúpus eritematoso sistêmico (HOSSEINI *et al.*, 2020).

O rituximabe é um anticorpo monoclonal com afinidade específica para CD20, uma proteína transmembranar expresso em linfócitos B periféricos. Após esta interação, CD20 é “reorganizado” em balsas lipídicas que vão desencadear a cascata do complemento e promover a fagocitose. A citotoxicidade mediada por células ocorre após a interação da porção Fc do rituximabe com receptores Fc γ expressos na superfície das células efectoras (macrófagos, granulócitos e células NK), causando a liberação de mediadores que vão promover a morte das células-alvo. Apresenta indicação para o tratamento de linfomas não Hodgkin de células B, leucemia linfóide crônica, granulomatose com poliangiite e artrite reumatoide (BERGANTINI *et al.*, 2020).

1.3 Métodos de diagnóstico da inflamação

Como apresentado anteriormente, tem ficado cada vez mais evidente que muitas doenças se originam a partir de processos inflamatórios. Uma vez que as doenças inflamatórias são progressivas e destrutiva, ferramentas para localizar e monitorar a inflamação são essenciais para prevenir complicações e melhorar o prognóstico dos pacientes. Para isso, duas modalidades de diagnóstico podem ser empregadas: a) Exames laboratoriais, que consistem na quantificação de componentes plasmáticos relacionados a inflamação; b) exames de imagem convencionais (tomografia computadorizada, ressonância magnética e ultrassom) e de imagem nuclear/molecular (Tomografia por Emissão de Pósitron (PET) / Tomografia por emissão de Fóton Único (SPECT)).

1.3.1 Exames laboratoriais

Algumas substâncias séricas podem sofrer alterações em seus níveis ante a diversos estímulos, principalmente pelos que causam dano tecidual, como processos inflamatórios

agudos ou crônicos como infecções, neoplasias, trauma, infartos teciduais ou artrites inflamatórias (GRUYS *et al.*, 2005). As principais substâncias que sofrem elevação são a albumina e as 4 frações de globulinas, referidas como α 1-globulinas (antitripsina e glicoproteína ácida), α 2-globulinas, (macroglobulina e haptoglobina); β -globulinas (incluem transferrina, fibrinogênio, amiloide A sérica e proteína C reativa) e γ -globulinas (IgG) (BEERS *et al.*, 2020).

As alterações séricas dessas substâncias são acompanhadas de outros fenômenos gerados por citocinas (IL-1 β , o fator de necrose tumoral-alfa (TNF α), o interferon- γ (INF- γ), e IL-6) como febre, anorexia, sonolência, letargia, perda muscular e aumento da produção de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (GRUYS *et al.*, 2005).

A quantificação de proteínas séricas de fase aguda, tais quais albumina, α 1-globulina, α 2-globulina, β -globulina e γ -globulina (imunoglobulinas) corresponde a uma prática simples e amplamente empregada na investigação e diagnóstico de doenças inflamatórias (BEERS *et al.*, 2020).

A albumina é a proteína mais abundante no plasma, sendo sintetizada exclusivamente no fígado e possui funções importantes no organismo, como transporte de diversas substâncias e manutenção da pressão oncótica. A hipoalbuminemia é uma condição altamente inespecífica e acompanha inúmeras doenças, podendo estar relacionada com redução de sua síntese, no caso de cirrose hepática e hepatite viral; com o aumento do catabolismo, no caso de infecção bacteriana grave, neoplasias malignas; insuficiência cardíaca congestiva, doenças inflamatórias e infecciosas crônicas; ingestão proteica inadequada; e com perdas por meio dos glomérulos renais e intestinos (O'CONNELL; HORITA; KASRAVI, 2005).

As globulinas séricas, são sintetizadas no fígado ou pelas células do sistema imune. Compreendem uma fração bem menor do conteúdo total de proteínas plasmáticas. Os grupos de α 1-globulinas e α 2-globulinas são constituído por um conjunto de várias proteínas, que em geral, estão com níveis elevados em processos inflamatórios, infecciosos e imunes, de forma inespecífica. A diminuição da fração β -globulina é rara e, em geral, é utilizada como elemento de valor prognóstico, principalmente, nos processos de evolução crônica. A fração γ -globulina é constituída por imunoglobulinas (Igs) que são os anticorpos produzidos pelos plasmócitos quando estimulados por antígenos ou devido à desordem clonal maligna dessas células. Há diferentes classes de Igs, as principais e mais relevantes clinicamente até o momento são IgG, IgA, IgM, IgD e IgE (O'CONNELL; HORITA; KASRAVI, 2005).

A importância diagnóstica da dosagem de proteínas séricas é limitada, pois elas podem estar relacionadas também a situações não inflamatórias, prestando-se mais para monitorização da atividade de doenças ou do seu tratamento (CRAY; ZAIAS; ALTMAN, 2009).

Além deste exame, outro parâmetro analisado é a velocidade de hemossedimentação (VHS), que é uma medida indireta de proteínas de fase aguda e reflete o aumento da concentração plasmática das mesmas, principalmente a de fibrinogênio. Nas doenças inflamatórias subagudas e crônicas, a VHS tem sido amplamente utilizada para a avaliação da atividade da doença no decorrer do tempo, em enfermidades como febre reumática, artrite reumatoide. No acompanhamento de doenças infecciosas crônicas ou subagudas, como na osteomielite e na tuberculose, é o marcador preferido para avaliação da resposta terapêutica e como critério de cura (ATAS *et al.*, 2008).

Há diversos fatores que podem interferir na interpretação do valor da VHS. Dentre os interferentes analíticos, há o erro de diluição, a inclinação do tubo, a demora em realizar o exame após a coleta e a temperatura ambiente. Pode haver influência do uso de medicamentos como anticoncepcionais orais e anticoagulantes. Há também diferenças fisiológicas, como menor VHS no sexo feminino e maior em idosos e gestantes. No entanto, apesar disto, a simplicidade e o baixo custo garantem uma posição de destaque do método, que é atualmente o exame mais utilizado como indicador de doenças orgânicas e na monitorização de processos inflamatórios (ALENDE-CASTRO *et al.*, 2019).

1.3.2 Exames de imagem

Com o avanço em técnicas de imagem é possível analisar o estado do tecido *in vivo*. Muitas dessas abordagens podem ser adaptadas para se tornarem ferramentas clínicas para avaliar o estado inflamatório de um indivíduo. Os recursos de imagem na avaliação do processo inflamatório permitem estabelecer a relação causal entre a inflamação e a progressão da doença e para estratificação e intervenção no paciente com base no estado inflamatório a partir da detecção uma variedade de assinaturas que variam de moléculas, tráfico celular, alterações metabólicas, danos estruturais às alterações funcionais, que estão associadas à inflamação e sua resolução nos órgãos doentes (LIU *et al.*, 2019).

Técnicas de imagem convencionais (tomografia computadorizada, ressonância magnética e ultrassom) podem detectar processo inflamatório, mas depende principalmente de mudanças anatômicas e não são totalmente capazes de discriminar a patologia inflamatória ativa das alterações anatômicas resultante de terapia ou cirurgia anterior. Além disso, os focos inflamatórios podem não ser detectados na fase inicial devido à falta de alterações anatômicas.

A imagem nuclear, que faz uso de radiofármacos que se acumulam no local da inflamação, tem se tornado uma ferramenta importante na avaliação de várias condições inflamatórias e infecciosas. Essa modalidade de imagem pode revelar alterações moleculares e celulares e fornece detecção sensível de até mesmo pequenos focos inflamatórios e/ou infecciosos em um estágio inicial (ROIVAINEN *et al.*, 2020).

Modalidades não invasivas de imagem molecular, incluindo SPECT e PET têm sido usados como ferramentas de suporte para diagnóstico e avaliação da inflamação. Em especial as imagens de SPECT e PET baseadas em radionuclídeos são capazes de medir a inflamação a nível funcional e molecular com alta sensibilidade além de fornecer informações anatômicas quando combinadas com outras modalidades de imagem, como ressonância magnética e tomografia computadorizada (PERKINS, 2019).

A obtenção de imagens por tomografia por emissão de pósitrons acoplada a tomografia computadorizada (PET-CT) com o uso de Fluorodesoxiglicose, [¹⁸F]FDG, uma radiofármaco análogo da glicose, cuja captação depende do metabolismo glicolítico nos diversos órgãos e tecidos, é uma ferramenta bem estabelecida na oncologia, mas tem tido um crescente foco de atenção no campo de imagem de infecção e de inflamação na última década. Este radiofármaco se acumula em leucócitos ativados, que usam glicose como fonte de energia durante sua explosão metabólica. No entanto, como apenas detecta o metabolismo da glicose intensificado é incapaz de discriminar de forma confiável entre infecção ou inflamação e qualquer outro tipo estado hipermetabólico, além de também não distinguir entre as diferentes vias inflamatórias, que podem ser relevantes em algumas situações clínicas (PALESTRO; GLAUDEMANS; DIERCKX, 2013; SIGNORE; GLAUDEMANS, 2011).

Cintilografia com leucócitos marcados é método de imagem disponível para investigação de processo inflamatório/infeccioso. A marcação de leucócitos é realizada *in vitro* e com o uso de ¹¹¹In-oxiquinolona ou ^{99m}Tc-exametazime e não interfere nas funções das células. A imagem do corpo inteiro é obtida por uma gama câmara e permite localizar áreas de acúmulo anormal de leucócitos, identificando o sitio de infecção. Por ser um método onde a marcação de leucócitos é *in vitro*, o manuseio do sangue traz riscos tanto de contaminação para o paciente como para o operador (BLANC *et al.*, 2019; PALESTRO; GLAUDEMANS; DIERCKX, 2013).

Imagens provenientes de SPECT e PET podem ser usados em doenças inflamatórias crônicas não apenas para diagnóstico da doença, mas também para monitorar respostas terapêuticas e ajudar a compreender as vias bioquímicas presentes no estabelecimentos do estado patológico (MACRITCHIE, 2020).

Várias moléculas radiomarcadas podem ser desenvolvidas para direcionar o radionuclídeo para o sítio de inflamação, afim de fornecer informações sobre o estado do tecido. Os principais alvos podem ser classificados em três categorias diferentes: a) moléculas de adesão, que apresentam expressão significativamente aumentada durante o processo inflamatório e regulam e medeiam a migração de células imunes ao sítio de inflamação; b) marcadores de superfície em células imunes, cuja atividade de macrófagos e monócitos está intimamente associada ao grau de inflamação e gravidade dos sintomas de doenças autoimunes e inflamatórias; c) citocinas pró-inflamatórias, envolvidas na patogênese das doenças inflamatórias e autoimune ou enzimas envolvidas na progressão de várias doenças inflamatórias e câncer por participar na degradação da matriz extracelular, na ativação de moléculas e regulando o comportamento de vários tipos de células (LEE, 2019).

1.4 Radiofármaco

A ANVISA definiu em 2008 Radiofármaco como “medicamento com finalidade diagnóstica ou terapêutica que, quando pronto para o uso, contém um ou mais radionuclídeos” (ANVISA, RDC Nº 38/2008).

Dos radiofármacos utilizados em Medicina Nuclear, 80% consistem de radiofármacos de Tecnécio-99m (^{99m}Tc) cuja aplicação está voltada para cintilografia e imagem por tomografia (SPECT). Sua aplicação consolidada na clínica deve-se às propriedades nucleares quase ideais como sua disponibilidade conveniente com uso de gerador de coluna de Molibidênio-99/Tecnécio-99 estável, emissão de gama puro com energia de 140 keV, meia-vida física de apenas 6 horas, tempo suficiente para realizar a preparação do radiofármaco, as medidas cintilográficas, sem haver perdas significativas da atividade, e baixa exposição à radiação do paciente (MIKOŁAJCZAK; MAECKE, 2016; PAUWELS *et al.*, 2018; SAGER *et al.*, 2013; SAHA, 2018).

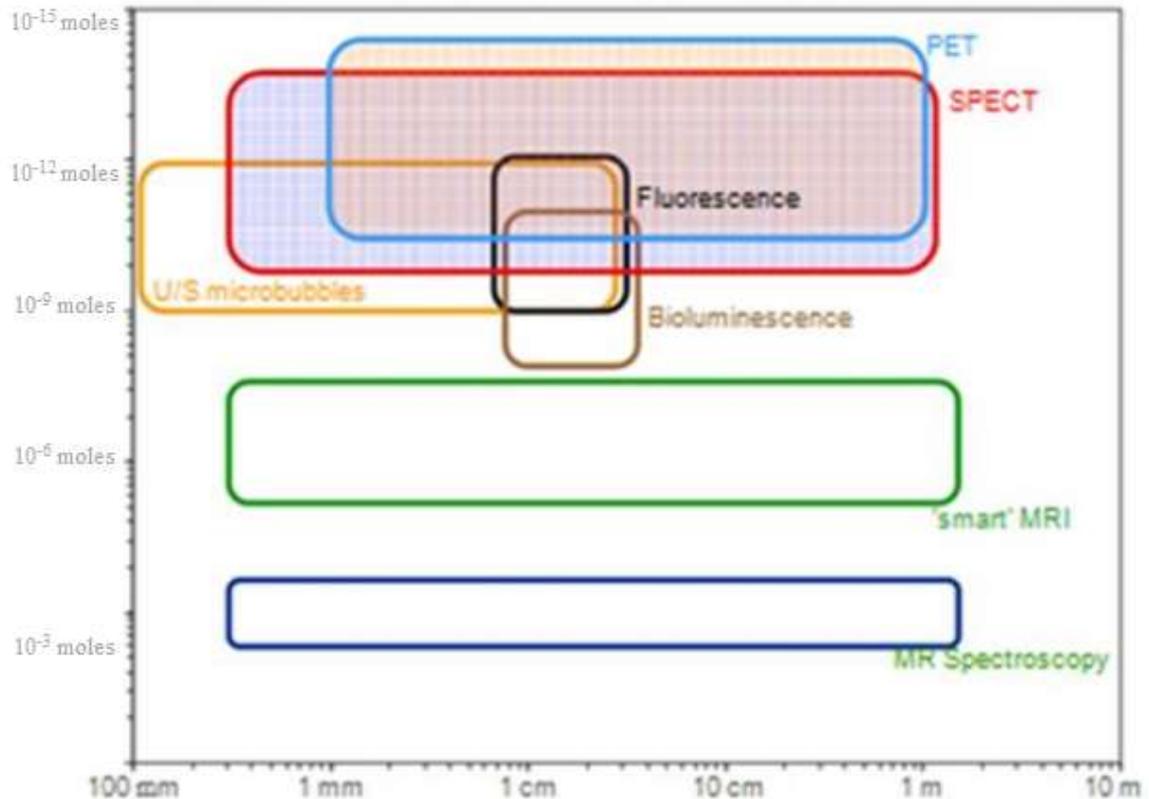
Em 1937, o Tecnécio foi primeiramente isolado a partir do bombardeamento de folha de Molibidênio com deutério e, desde então, vem sendo usado na indústria médica, para imagens radionucleares e na indústria de aço para evitar corrosão em baixas temperaturas (WEAVER *et al.*, 2017).

Em 1961, iniciou-se o uso de Tecnécio-99m para diagnóstico por imagem, aplicando-se pertecnetato ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) para diagnóstico de doenças da tireóide, no pressuposto de que este

composto se comportaria de modo similar ao iodeto, conhecido por ser absorvido pela tireóide (ULRICH; ROGER, 2006). Na década de 1980, a pesquisa em radiofármacos estava focada principalmente no desenvolvimento de radiofármacos de perfusão, cuja biodistribuição depende do fluxo sanguíneo no órgão alvo, como o coração e o cérebro (LIU, 2004). No novo século XXI, a pesquisa na área radiofarmacêutica tem se direcionado para o uso de ligantes com o objetivo de sintetizar radiofármacos mais específicos.

Os métodos diagnósticos que utilizam radiofármacos apresentam uma sensibilidade de detecção na escala de 10^{-15} moles (Figura 6). Isto quer dizer, de maneira geral, que com uma quantidade muito pequena de um radiofármaco, 10^{-15} moles, já consegue obter uma imagem precisa, ou seja, apresenta alta especificidade. Outro ponto importante é o seu escalonamento espacial, por ser um método altamente específico a possibilidade de translacionar é a maior de todas as técnicas disponíveis. Isto é essencial, porque o ato de translacionar, agiliza a transferência de resultados da pesquisa básica para pesquisas clínicas, a fim de produzir benefícios para a comunidade como um todo (CHAKRAVARTY *et al.*, 2017; CHAKRAVARTY; HONG; CAI, 2014; DEBBAGE; JASCHKE, 2008; GOEL *et al.*, 2017; SANTOS-OLIVEIRA, 2016).

Figura 6 - Comparação de diferentes tecnologias de imagem utilizadas na prática da clínica médica



Legenda: Resonância Magnética (MR); Imagem de Resonância Magnética (MRI); Tomografia por Emissão de Póstron (PET); Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único (SPECT); Ultrassonografia (US).

Fonte: SANTOS-OLIVEIRA, 2016.

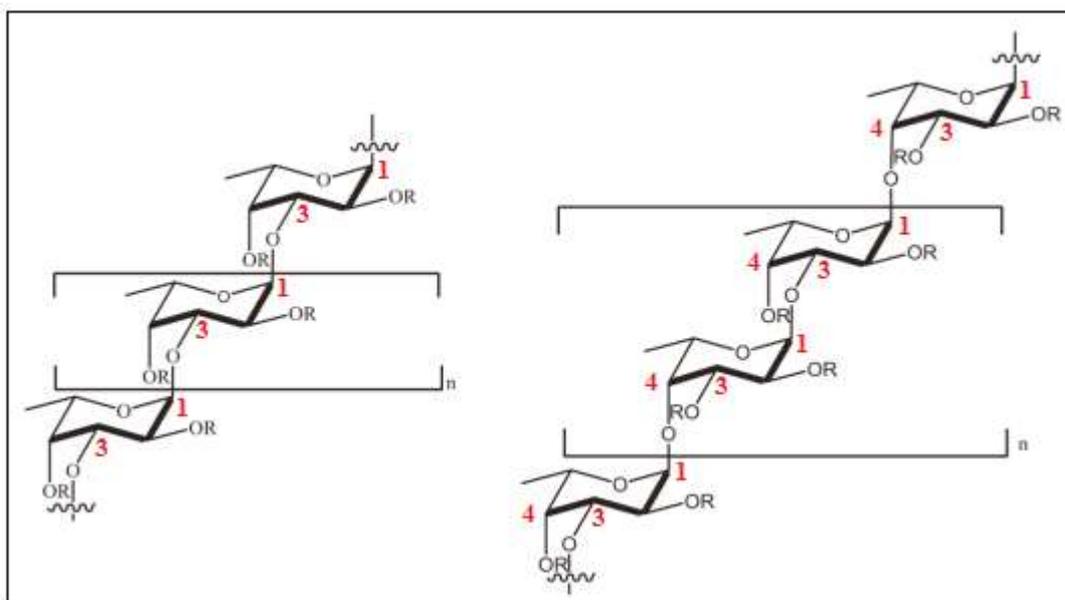
1.5 Fucana

Fucana é um termo usado para uma classe de polissacarídeos sulfatados e ricos em α -L-fucose, de carga negativa, altamente higroscópico e solúvel em água e soluções ácidas, podendo ser encontrada em pepinos do mar, ouriço do mar e algas marinhas marrons. Sua estrutura é complexa e pode variar de acordo com a espécie da qual é extraída, com a época e o método de purificação (FLETCHER *et al.*, 2017; LUTHULI *et al.*, 2019).

Até então, dois tipos de esqueleto foram descritos (Figura 7): Um, composto por resíduos de α -L-fucopirranose com ligações (1 \rightarrow 3) e o outro, constituído por ligações alternadas (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4) de resíduos α -L-fucopirranose, no qual a ramificação R pode ser um monossacarídeo (ramnose, glicose, galactose, xilose, manose, arabinose, ribose e ácido

glicurônico) ou um grupamento sulfato, este último com grande importância para a atividade biológica da Fucana (FLETCHER *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2008).

Figura 7 - Estruturas da Fucana



Legenda: (A) resíduos de α -L-fucopirranose com ligações (1 \rightarrow 3); (B) resíduos de α -L-fucopirranose com ligações alternadas (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4); Oxigênio (O); Radical (R) pode ser Fucopirranose, ácido glucurônico ou grupos de sulfato.

Fonte: LUTHULI *et al.*, 2019.

São descritas como detentoras de atividades biológicas com potencial terapêutico, incluindo antitumoral (VAN WEELDEN *et al.*, 2019); antitrombótico e anticoagulante (MANSOUR *et al.*, 2019); anti-inflamatório (APOSTOLOVA *et al.*, 2020); dentre outras e devido a isso têm sido um objeto de pesquisa intensiva.

1.5.1 Fucana de *Fucus vesiculosus*

Fucus, um gênero abundante e amplamente distribuído de algas marinhas marrons, perenes e comestíveis, tem ganhado atenção cada vez maior nos últimos anos. Este gênero ocupa o clima frio-temperado nas águas das regiões litorânea ao longo das costas rochosas do hemisfério norte (Figura 8) e é composta por 66 espécies, sendo a *F. vesiculosus* a espécie mais conhecida do gênero Fucus (RINNE; SALOVIUS-LAURÉN, 2020).

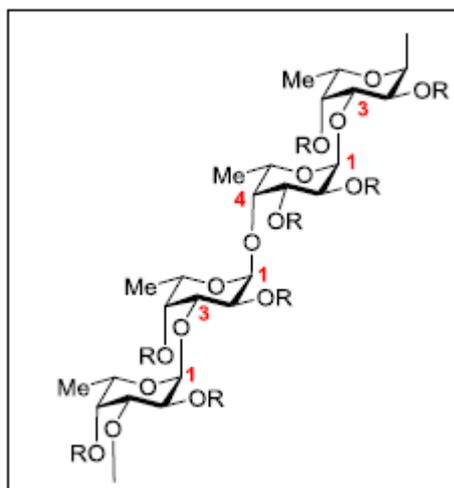
Figura 8 - Distribuição geográfica de *Fucus* spp.

Fonte: CATARINO; SILVA; CARDOSO, 2018.

Com alto teor de fibra alimentar, minerais e vitaminas, e baixo teor de gordura, algas pertencentes a este gênero tem uma combinação excepcional de macro e micronutrientes que os tornam muito interessante do ponto de vista nutricional. Do ponto de vista medicinal, também existe certo interesse, uma vez que *Fucus* apresenta vários compostos bioativos, como fucanas, florotaninos e fucoxantina, possuídores de importantes propriedades terapêuticas. Graças a presença de tais compostos funcionais, *Fucus* spp. é vista com grande interesse e aplicabilidade não só na área cosmética e farmacêutica, mas também nas indústrias de alimentos e nutracêuticos (CATARINO; SILVA; CARDOSO, 2018).

Independente da variabilidade estrutural inerente desses polissacarídeos, a Fucana proveniente da alga *Fucus vesiculosus* é constituída por resíduos de α -L-fucose ligados de maneira alternada, (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4), com os carbonos C-2 e / ou C-4 sulfatados e com ramificações de fucose (Figura 9). Apresenta peso molecular de 82 kDa; conteúdo de sulfato de 24.5% (w/w); e os principais monossacarídeos são manose (1.27%), fucose (38%) e galactose (3%) (USTYUZHANINA *et al.*, 2013).

Figura 9 - Estrutura da Fucana proveniente da *Fucus vesiculosus*



Legenda: Hidrogênio ou monossacarídeo (R); oxigênio (O); grupamento metila (Me).

Fonte: A autora, 2022.

Os vários efeitos farmacológicos da Fucana, como atividade anti-inflamatória, antiviral e antitumoral são atribuídos à sua capacidade de modular algumas ações da resposta imune-inata mediante a interação com diferentes receptores, como receptores Toll-like (TLRs); receptor de complemento-3 (CR-3); e *receptores scavenger* em células dendríticas, macrófagos e outros leucócitos, bem como receptores selectinas, presentes em plaquetas, leucócitos e no endotélio ativado (ALE; MIKKELSEN; MEYER, 2011; ASANKA SANJEEWA *et al.*, 2019; CARVALHO *et al.*, 2014; LIN *et al.*, 2020b; WANG *et al.*, 2019).

1.5.2 Atividade anti-inflamatória

Sabe-se que a Fucana atua em diferentes estágios do processo inflamatório: a) bloqueio de adesão e infiltração de leucócitos; b) redução da síntese de citocinas pró-inflamatórias (APOSTOLOVA *et al.*, 2020).

O bloqueio de adesão e infiltração de leucócitos é um dos mecanismos que justifica a ação anti-inflamatória da Fucana, uma vez que ela é capaz de inibir receptores de selectinas, cuja expressão é exacerbada frente a um estímulo inflamatório e permite essa migração celular dos vasos sanguíneos para o tecido inflamado (FITTON; STRINGER; KARPINIEC, 2015; MEDZHITOV, 2008).

Outro mecanismo de ação que explica os efeitos benéficos da Fucana sobre doenças inflamatórias, isquemia, disfunção imunológica e tumores está relacionado à regulação negativa das vias de sinalização de MAPK e NF- κ B e a consequente diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias (APOSTOLOVA *et al.*, 2020; JNK *et al.*, 2019).

A proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK) é uma família de proteínas quinases, sendo os principais membros as quinases reguladas por sinal extracelular (ERK), p38 e c-Jun N-terminal quinase (JNK), que apresentam cascatas de sinalização diferente (MAI *et al.*, 2020). Embora as MAPKs possam fosforilar substratos citoplasmáticos, a maioria das vias de sinalização MAPK convergem para o núcleo a fim de regular a expressão gênica, através da fosforilação de fatores de transcrição aumentando, desta forma, a sua atividade (TERAMOTO; GUTKIND, 2004). Essas vias de sinalização estão estreitamente envolvidas com várias respostas celulares, como apoptose, proliferação e diferenciação, e produção de citocinas e quimiocinas inflamatórias (ZHANG; PIZZUTE; PEI, 2014).

Já o fator nuclear kappa-B (NF- κ B) representa uma família de fatores de transcrição, que regula uma grande variedade de genes envolvidos no desenvolvimento e progressão da inflamação, de modo direto, através do aumento da produção de citocinas inflamatórias, quimiocinas e moléculas de adesão, mas também regulando a proliferação celular, apoptose, morfogênese e diferenciação (LIU *et al.*, 2017).

1.5.3 Atividade antiviral

A Fucana tem a propriedade de aumentar a resistência a infecção por vírus (efeito preventivo); afeta diretamente as partículas de vírus (efeito virucida); e inibe o estágio inicial de replicação do vírus (efeito de inibição do vírus) (KRYLOVA *et al.*, 2020). Os possíveis mecanismos de atividade antiviral da Fucana podem estar relacionados a sua capacidade de impedir a entrada do vírus na célula hospedeira e a inibição da replicação viral pela produção de interferon tipo I (IFN-1) (KRYLOVA *et al.*, 2020; LUTHULI *et al.*, 2019).

A via de entrada do vírion, que pode ocorrer por meio de endocitose, fusão ou penetração direta, é determinada pelos receptores presentes na célula do hospedeiro (DAI *et al.*, 2020). É descrito que a Fucana inibe a ligação do vírus às células hospedeiras, interagindo com o domínio das glicoproteínas do envelope viral, que estão envolvidas na fixação do vírus (WANG *et al.*, 2019).

Os interferons são citocinas normalmente produzidas durante a defesa do hospedeiro contra infecções virais. São dois os tipos de interferons conhecidos, do Tipo I (IFN- α e - β , predominantemente) e do Tipo II (IFN- γ). Os interferons alfa (IFN- α) e beta (IFN- β) são produzidos por várias células em resposta à infecção viral, dupla-fita de RNA ou outros estímulos, enquanto o interferon gama (IFN- γ) é frequentemente produzido por linfócitos T e células *natural killer* (NK) após o reconhecimento de antígenos e mitógenos específicos (STARK *et al.*, 1998). Após a infecção viral, IRF3 e IRF7, fatores reguladores de interferon que residem no citosol, sofrem fosforilação o que provoca a sua translocação para o núcleo, onde ativam a transcrição de genes do IFN tipo I. A Fucana aumenta a ativação de IRF3 e IRF7 na condição de infecção viral, o que leva a produção de INF-1 (LI *et al.*, 2017).

1.5.4 Atividade antitumoral

A Fucana pode exercer ações antitumorais por meio de quatro ações: a) indução de apoptose; b) parada do ciclo celular; c) inibição da formação de VEGF (fator de crescimento de endotelial vascular); d) imunomodulação (JIN *et al.*, 2021).

A via da caspase desempenha um papel central na indução da apoptose. Após sua ativação através da clivagem, a caspase ativará a via apoptótica. A via da caspase está conectada com a via da MAPK, que por sua vez, sofre regulação negativa pela ação da Fucana. A apoptose induzida pela Fucana é frequentemente associada a uma diminuição da sinalização da MAPK, a ativação de caspases-3, -8, e -9 e a uma mudança na permeabilidade da membrana mitocondrial (VAN WEELDEN *et al.*, 2019).

O ciclo celular consiste em G0 (quiescência), fase G1, fase S, fase G2 e fase M, cuja regulação da progressão dessas fases é controlado por quinases dependentes de ciclinas (CDKs), que parecem sofrer regulação negativa pela ação da Fucana (HSU; HWANG, 2019).

Ao inibir a formação de VEGF, a Fucana é capaz de suprimir a angiogênese, cortando o suprimento de nutrientes e oxigênio do tumor, reduzindo seu volume e bloqueando a propagação e transferência de células cancerígenas (HUANG *et al.*, 2015).

Apesar da sua ação antiinflamatória, a Fucana pode aumentar a atividade de células imunes, como NK, linfócitos e macrófagos. Em geral, as células relacionadas com imunidade produzem várias citocinas e espécies reativas de oxigênio que exercem atividade anticancerígena (HSU; HWANG, 2019; LIN *et al.*, 2020a).

Diante disso, a Fucana tem potencial para ser usado como uma nova alternativa antitumoral ou como um adjuvante em combinação com um medicamento antitumoral devido à sua alta atividade biológica, fonte abundante e renovável, baixa capacidade de desenvolvimento de resistência e baixos efeitos colaterais (LUTHULI *et al.*, 2019).

1.5.5 Farmacocinética da Fucana

O estudo da farmacocinética e a distribuição nos tecidos são cruciais para a compreensão da atividade biológica e para o desenvolvimento e a aprovação de agentes terapêuticos e de diagnósticos. Atualmente, a Fucana está disponível para uso em cosméticos, alimentos funcionais, suplementos dietéticos e suplementos alimentares para animais de estimação, gado e aquicultura (POZHARITSKAYA; OBLUCHINSKAYA; SHIKOV, 2020). E embora não tenha sido aprovada para finalidades biomédicas, pesquisas sobre a bioatividade deste composto aumentou exponencialmente nos últimos anos, com o enfoque na sua aplicação como agentes de distribuição de fármacos, biomateriais, e agentes terapêuticos (PALACIOS-GORBA *et al.*, 2020).

Devido à complexidade da estrutura da Fucana, que pode sofrer alterações conforme a fonte na qual é obtida e conforme o método de extração empregado e devido à dificuldade de analisar a concentração da Fucana em amostras biológicas e sua baixa concentração sanguínea *in vivo* após administração oral, há poucos estudos sobre o perfil farmacocinético deste polissacarídeo (FLETCHER *et al.*, 2017; LUTHULI *et al.*, 2019).

É relatado no estudo de Pozharitskaya *et al.* (2018) que após a ingestão oral em dose única da Fucana proveniente de *Fucus vesiculosus*, baixos níveis plasmáticos são detectados e a distribuição nos tecidos exibe considerável heterogeneidade. Este polissacarídeo apresentou longo tempo de absorção, cuja concentração máxima foi quantificada 4 horas após a administração e longo tempo de permanência no sangue, visto que o tempo médio de residência foi de 6,79 horas (POZHARITSKAYA *et al.*, 2018).

Pozharitskaya *et al.* (2019) ainda realizaram um estudo que avaliou a farmacocinética da Fucana após a administração tópica, que indicou deposição deste polissacarídeo na pele e no tecido muscular em 60 minutos após a aplicação, não sendo observado acúmulo de Fucana no plasma após aplicação tópica repetidas vezes (durante 5 dias). Os autores acreditam que a

deposição do composto nesses tecidos poderia estar relacionada a meia-vida prolongada após a administração tópica de Fucana (POZHARITSKAYA *et al.*, 2019).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste projeto é desenvolver e avaliar a Fucana assim como a Fucana radiomarcada com ^{99m}Tecnécio. No caso da Fucana pura, pretende-se estabelecer sua aplicação como um fármaco com atividade anti-inflamatória e a forma radiomarcada como um possível marcador precoce da resposta inflamatória.

2.2 Objetivos específicos

- a) marcar a Fucana com o radionuclídeo Tecnécio-99 metaestável;
- b) avaliar o perfil de biodistribuição da Fucana marcada com Tecnécio-99 metaestável em camundongos C57BL/6 com inflamação pulmonar induzida por LPS;
- c) avaliar ação anti-inflamatória da Fucana em camundongos C57BL/6 com artrite induzida por zimosan e com inflamação pulmonar induzida por LPS.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Modelo experimental

3.1.1 Animais e reagentes

Camundongos C57BL/6 machos e fêmeas, (39 animais) foram adquiridos do biotério da Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro) ou do Centro Multidisciplinar de Pesquisas Biológicas (CEMIB) (UNICAMP, São Paulo, Brasil). Os animais de 7 a 12 semanas de idade com peso de 20 e 30 g foram alojados em gaiolas padrão de plástico transparente com água filtrada e ração padrão para roedores sem restrição, em salas com temperatura controlada (21–25 °C) e umidade relativa do ar de aproximadamente 70% com um ciclo claro / escuro de 12:12 horas. Todos os procedimentos com animais foram previamente submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética para uso de Animais conforme aprovação do protocolo do estudo (CEUA UEZO 001/2015, CEUA IPEN 181/2017, CEUA FIOCRUZ LW-43/14, CEUA IOC 001/19).

A Fucana proveniente da alga marrom *Fucus vesiculosus* (Sigma-Aldrich); zimosan de *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma-Aldrich); lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* O127:B8 (Sigma-Aldrich); Pertecnetato de tecnécio (NaTc^{99m}O₄) (IPEN/CNEN); e Cloreto estano (SnCl) (Sigma-Aldrich).

3.1.2 Modelo de artrite reumatoide induzido por zimosan

A inflamação articular foi induzida por injeção intra-articular de 500 µg de zimosan, em 25 µL de solução salina estéril na articulação do joelho direito cavidade. Os animais do grupo controle receberam uma injeção intra-articular de um volume igual de solução salina estéril. Após 24 horas da indução da inflamação articular, os camundongos foram sacrificados com excesso de anestésico (pentobarbital sódico 3% - Hypnol) para posteriores análises.

Os animais foram tratados com Fucana, na dose de 100 mg / kg, diluído em água filtrada e administrado por via oral (v.o.) (200 µL) ou intraperitoneal (i.p.) (100 µL) 1 hora antes da

estimulação com zimosan. O mesmo volume de veículo foi administrado ao grupo controle. Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais, consistindo de pelo menos 5 animais: a) estimulados com solução salina; b) estimulado com zimosan e tratado com veículo; c) estimulado com zimosan e tratado com Fucana por via oral; d) estimulado com zimosan e tratado com Fucana por via intraperitoneal.

3.1.3 Modelo de inflamação pulmonar induzido por LPS

A inflamação pulmonar foi induzida em camundongos anestesiados com uma mistura de isofluorano (0,5%) e ar atmosférico por aspiração orofaríngea de LPS (25 μ g / 25 μ L) (1mg / mL) ou solução salina estéril (grupo controle). As análises foram realizadas 24 horas após a estimulação com LPS. Os animais foram sacrificados com cetamina (300 mg / Kg) e xilazina (30 mg / kg).

Os animais foram tratados com Fucana, na dose de 100 mg / kg, diluído em água filtrada e administrado por via intravenosa (100 μ L), 22 h após a estimulação com LPS. O mesmo volume de veículo foi administrado aos grupos de controle. Os animais foram divididos em 3 grupos experimentais, consistindo de pelo menos 6 animais: a) estimulados com solução salina; b) estimulado com LPS e tratado com veículo; c) estimulado por LPS e tratado com Fucana.

3.2 **Marcação da Fucana com Tecnécio – ^{99m}Tc**

Processo de radiomarcagem é realizado pelo método direto no qual é diluído 3mg de cloreto estânico (SnCl₂) em 10 mL de soro fisiológico em tubo a vácuo para realização de diluição serial, retirando-se 1mL desta solução e adicionando-a em outro tubo à vácuo, no qual será adicionado 9mL de soro.

Para fazer a marcação com o radioisótopo, coloca-se 150 μ L de SnCl₂ diluído, em tubo à vácuo e adiciona-se 300 μ L de ^{99m}Tc (100 μ Ci de ^{99m}Tc) a este e aguarda-se 10 minutos.

Para finalizar, adicione a esta mesma solução, 150 μ L da solução de fucana previamente preparada (10 mg/mL em soro fisiológico) e aguardar mais 10 minutos para aí então ser usada para experimentação.

Como forma de verificar a qualidade da marcação, se a fucana está coordenada com tecnécio, é realizada cromatografia em papel, utilizando o papel Whatman n° 1 (papel em tiras de 14 cm de comprimento por 1 cm de largura) e acetona (300 µL), adicionando uma gota da solução final que corresponde a fucana marcada.

A eficácia da marcação é realizada em triplicata nos seguintes horários: imediata (15 minutos após a marcação); 0h; 1h; 2h; 4h; 6h; e 24 horas em triplicata após o processo de marcação.

Após o processo da cromatografia, duas tiras são cortadas ao meio para separar o topo da origem, e uma fita em quatro cortes, sendo realizada a leitura das mesmas no contador Gama (Perkin Elmer modelo Wizard® 2470).

Os resultados da contagem por minuto (CPM) de ^{99m}Tc são calculados por porcentagem de captação em cada parte da fita cromatográfica.

3.3 Estudo de biodistribuição de ^{99m}Tc -Fucana

O radiofármaco ^{99m}Tc -Fucana (3,7 MBq / 0,2 mL) foi injetado por via intravenosa, no seio retro orbital, nos camundongos C57BL/6 previamente anestesiados e após duas horas foram sacrificados por asfixia (câmara CO₂) e órgãos de interesse (coração, cérebro, estômago, intestino delgado, intestino grosso, rim direito, rim esquerdo, pulmão direito, pulmão esquerdo, fígado, baço e pâncreas) foram removidos e pesados para estimativa quantitativa de contagem gama usando um contador Gama (Perkin Elmer, Wizard® 2470). Os resultados foram expressos como porcentagem da dose injetada por grama de tecido (%ID/órgão).

3.4 Captação de ^{99m}Tc -Fucana no sítio inflamado

Os animais foram divididos em 2 grupos: (1) inflamados; e (2) não inflamados. Ambos os grupos, previamente anestesiados, receberam ^{99m}Tc -Fucana (3,7 MBq / 0,2 mL) por via intravenosa, no seio retro orbital, após duas horas foram sacrificados por asfixia (câmara CO₂) e órgãos de interesse (coração, cérebro, estômago, intestino delgado, intestino grosso, rim direito, rim esquerdo, pulmão direito, pulmão esquerdo, fígado, baço e pâncreas) foram

removidos e pesado para estimativa quantitativa de contagem gama usando um contador Gama (Perkin Elmer, Wizard® 2470). Os resultados foram expressos como porcentagem da dose injetada por grama de tecido (%ID/órgão).

3.5 Recrutamento de leucócitos

O recrutamento de leucócitos para a articulação fêmur-tibial foi determinado 24 horas após a injeção do estímulo inflamatório. As cavidades articulares foram lavadas 2 vezes com 150 µL por aspiração com solução de PBS / EDTA 10 mM. Este lavado é centrifugado em micro centrífuga por 10 minutos, a 4 °C a 1500 rpm. O precipitado é ressuspensionado em PBS para contagem total e diferencial de leucócitos.

Para a análise das células infiltradas nas vias aéreas realizou-se a lavagem broncoalveolar (BALF) duas vezes com 750 µL de PBS com etilenodiamina ácido tetra-acético (EDTA, 10 mM). O BALF foi centrifugado (3000 rpm, 4 °C por 10 minutos) e o pellet celular ressuspensionado em EDTA – PBS (250 µL).

3.5.1 Contagem total de leucócitos

A contagem total de leucócitos foi realizada em contador automático de partículas (Coulter Z2, Beckman Coulter Inc., Brea, CA, EUA)

3.5.2 Contagem diferencial de leucócitos

A contagem diferencial de células foi realizada em microscopia de luz (1000 ×) usando esfregaços de cytopspin (Cytospin 3, Shandon Inc., Pittsburgh, PA, EUA) corados de acordo com o método May – Grunwald – Giemsa. Os resultados foram expressos como o número de neutrófilos e células mononucleares por cavidade ($\times 10^5$).

3.6 Avaliação do edema

O edema foi avaliado medindo os diâmetros transversais das articulações do joelho com auxílio de paquímetro digital (Digmatic Caliper, Mitutoyo Corporation, Kanagawa, Japan). Os valores obtidos foram expressos em milímetros (mm) como a diferença do diâmetro da articulação do joelho antes e 24 horas após a indução da inflamação articular (Δ).

3.7 Análise estatística

Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão da média e foram estatisticamente analisados através do teste de variância (ANOVA) seguido do teste de Student-Newman-Keuls ou do teste Tukey para a comparação entre mais de dois grupos experimentais, enquanto que o teste “t” de Student foi usado para comparar dois grupos experimentais. Todos os testes foram realizados GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software, La Jolla, California USA). Os valores p menores ou iguais (\leq) à 0,05 foram considerados significativos (* ; +).

4 RESULTADOS

4.1 Marcação da Fucana com Tecnécio – ^{99m}Tc

O processo de radiomarcção utilizando Fucana pura e tecnécio 99 metaestável por um processo de radiomarcção direta mostrou-se uma metodologia eficiente com mais de 95% de eficácia em 24 horas, conforme mostra na Tabela 2.

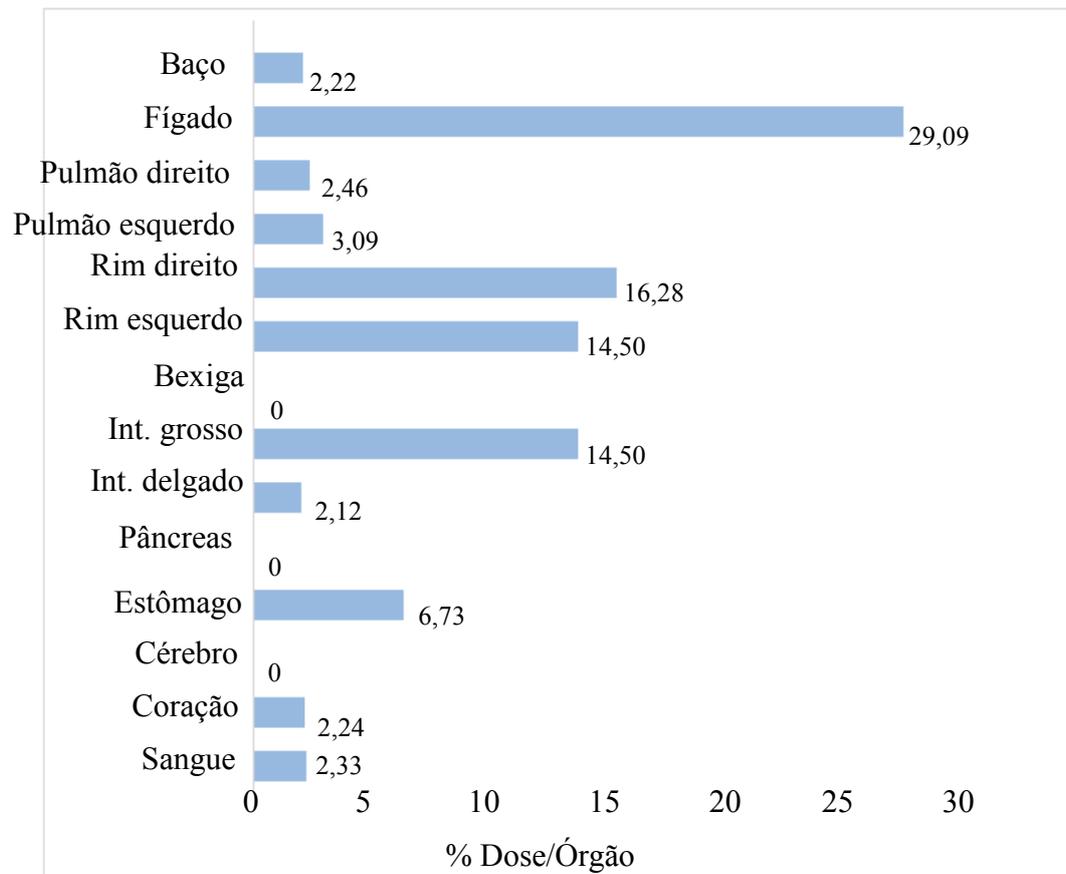
Tabela 2 - Eficiência da etapa de marcação da Fucana ao longo do tempo após cromatografia de papel

Tempo (h)	Marcação (%)
0	99.9± 0.4
1	99.9± 0.5
2	99.8± 0.3
4	99.8± 0.6
6	99.1± 0.4
24	99.6± 0.5

Fonte: A autora, 2022.

4.2 Estudo de biodistribuição de ^{99m}Tc - Fucana

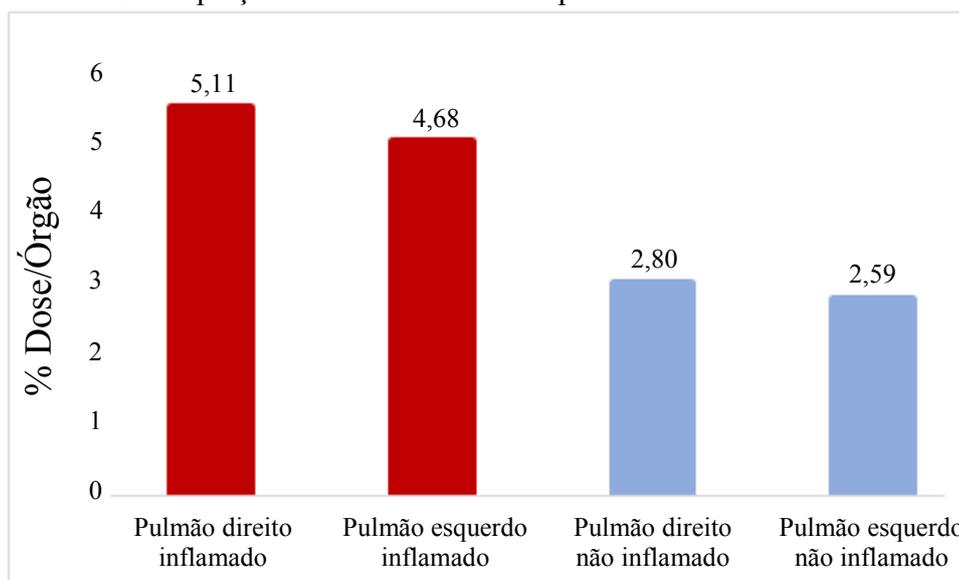
A Biodistribuição de ^{99m}Tc -Fucana mostrou um comportamento difuso, com captação em vários órgãos. Os órgãos que mereceram mais atenção foram (Gráfico 1): fígado (29,08%), estômago (6,73%), intestino grosso (14,5%), rins (Σ 30,78%) e pulmões (Σ 5,55%).

Gráfico 1 - Biodistribuição de ^{99m}Tc -Fucana em animais saudáveis

Nota: A captação de radioatividade no tecido foi medida usando um contador gama, e os resultados foram expressos como uma porcentagem da dose injetada por grama de tecido.
 Fonte: A autora, 2022.

4.3 Captação de ^{99m}Tc – Fucana no sítio inflamado

Os resultados da captação de ^{99m}Tc -Fucana no tecido inflamado são apresentados na gráfico abaixo (Gráfico 2). É possível observar uma captação maior nos pulmões inflamados (Σ 9,79) do que nos pulmões não inflamados (Σ 5,39).

Gráfico 2 - Captação de ^{99m}Tc -Fucana em pulmões inflamados e saudáveis

Nota: A captação de radioatividade no tecido foi medida usando um contador gama, e os resultados foram expressos como uma porcentagem da dose injetada por grama de tecido.

* $p < 0,01$ quando comparado ao pulmão direito inflamado; # $p < 0,01$ quando comparado ao pulmão esquerdo inflamado.

Fonte: A autora, 2022.

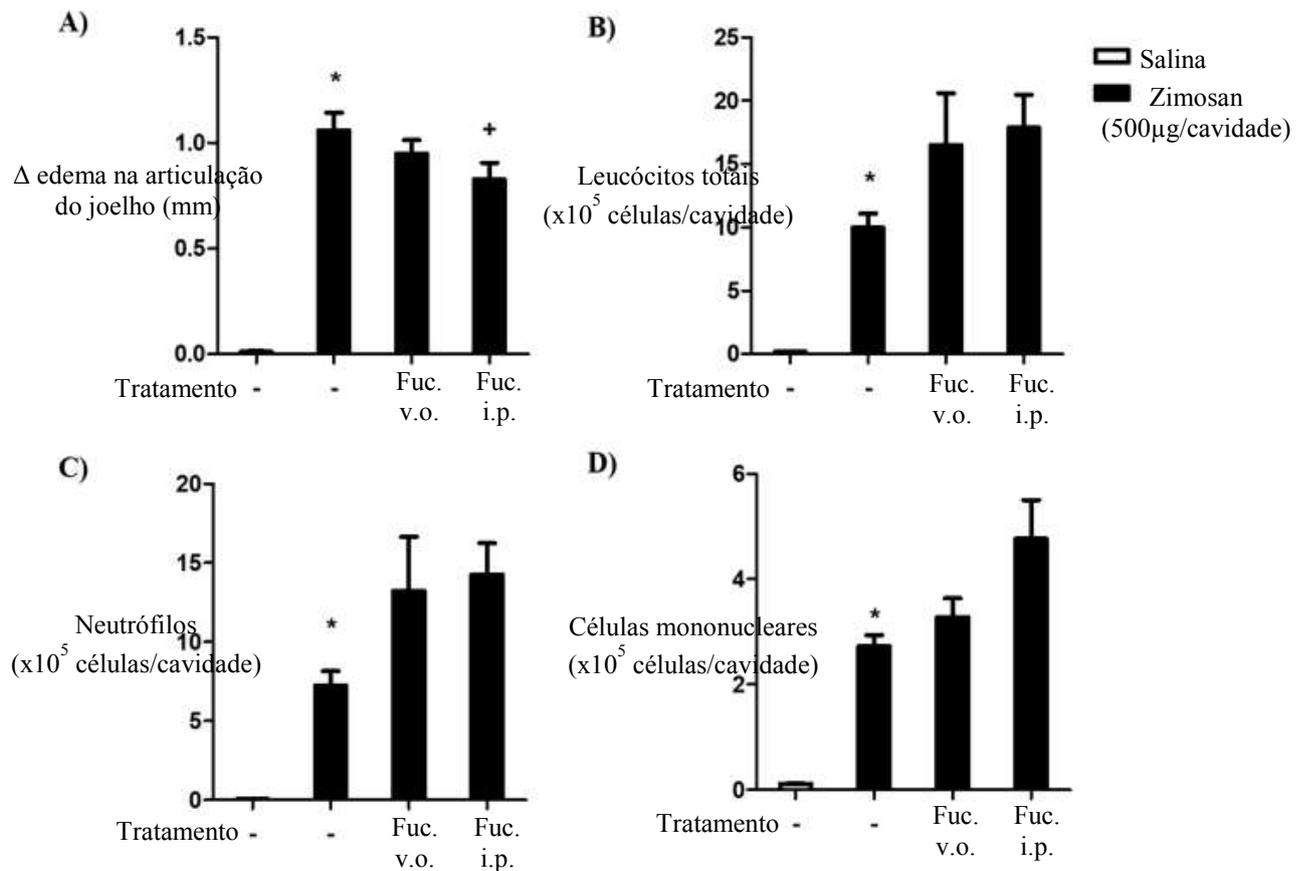
4.4 Efeito da Fucana na resposta inflamatória induzida por zimosan

Os resultados *in vivo* para o modelo de artrite são demonstrados na figura abaixo. Estudos anteriores demonstram que a administração intra-articular de zimosan induz uma resposta inflamatória local em 24 horas, caracterizada pela formação de edema e influxo maciço de neutrófilos (aproximadamente 90% do total de leucócitos).

Ao examinar os efeitos da Fucana neste modelo murino de inflamação articular observou-se que o tratamento dos camundongos com Fucana (100 mg / kg; i.p.) 1 hora antes da estimulação com zimosan inibiu significativamente a formação do edema induzido pelo zimosan em 24 horas. No entanto, quando o tratamento com Fucana ocorreu por via oral (100 mg / kg; v.o.), não houve inibição significativa na formação de edema do grupo tratado (Gráfico 3 A).

O tratamento por via oral ou i.p. com Fucana também não inibiu a migração de leucócitos para a cavidade sinovial (Gráfico 3, legendas B-D).

Gráfico 3 - Efeito de Fucana no edema e na migração de leucócitos na inflamação articular induzida por zimosan



Legenda: (A) Diferença entre a espessura da articulação do joelho antes e 24 horas após a estimulação com zimosan. (B) Leucócitos totais. (C) Neutrófilos. (D) Migração de células mononucleares.

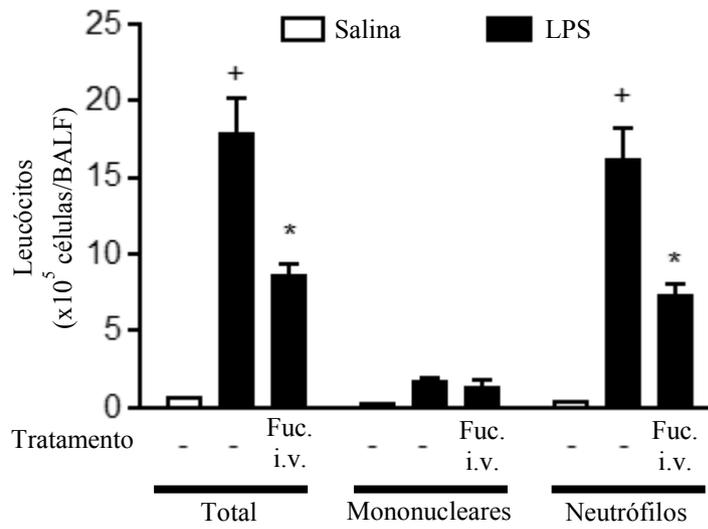
Nota: Os dados foram apresentados como média ± SEM (n = 6). Estatisticamente significantes ($P \leq 0,05$) são indicados entre os grupos estimulados e não estimulados (*) e entre os grupos tratados e não tratados (+).

Fonte: A autora, 2022.

4.5 Efeito da Fucana na resposta inflamatória induzida por LPS

A estimulação de LPS produziu um aumento significativo no número total de leucócitos no BALF, cuja elevação é justificada por um aumento expressivo no número de neutrófilos. Esse fenômeno é claramente sensível ao tratamento com Fucana, conforme aponta o Gráfico 4.

Gráfico 4 - Efeito de Fucana na migração de leucócitos na inflamação pulmonar induzida por LPS



Legenda: Lipopolissacarídeo (LPS); Fuc. i.v: Fucana administrada pela via intravenosa.

Nota: (P < 0,05) em comparação entre os camundongos estimulados com solução salina (+). (P < 0,05) em comparação com camundongos estimulados por LPS (*).

Fonte: A autora, 2022.

5 DISCUSSÃO

5.1 Radiomarcção da Fucana com Tecnécio-99m

O processo de radiomarcção direta com Tecnécio-99m mostrou-se eficiente, já que o rendimento da reação é superior a 90%, conforme preconiza a literatura. A presença de vários grupos reativos incluindo grupos alquil e sulfatos, na estrutura da Fucana, auxília na reação de conjugação com ^{99m}Tc . A apresentação comercial na forma de pó em conjunto com alta solubilidade da Fucana em solução salina e a excelente eficácia da marcação deste polissacarídeo sulfatado com ^{99m}Tc configuram enormes vantagens para o desenvolvimento de um kit para marcação para uso na prática clínica da rádiofarmacia hospitalar.

No que se refere à estabilidade deste novo radiofármaco, que é maior que 90% em um período superior ao decaimento do radionuclídeo, é mais um fator que corrobora para seu uso na prática clínica.

5.2 Biodistribuição de ^{99m}Tc -Fucana

O estudo de biodistribuição aponta a utilidade e a eficácia do radiofármaco. Este ensaio permite avaliar e quantificar a captação do radiofármaco nos tecidos e a forma como é excretado do organismo (DUATTI, 2020). Os resultados obtidos da biodistribuição da Fucana marcada com Tc-99m mostram que a maior atividade foi encontrada 30,78% em ambos os rins e 29,08% no fígado, enquanto que nas outras vísceras a captação foi muito menor, sendo as mais significativas 14,5% no intestino grosso; 6,73% no estômago; e 5,52% nos pulmões.

Como a captação no fígado, intestino e rim foi muito semelhante, não é possível confirmar se a excreção do radiofármaco é realizada pelo sistema hepatobiliar ou por via renal. A alta captação nos tecidos renais aponta a forma pela qual o radiofármaco é excretado, sendo esta via interessante devido a uma menor exposição da radiação. A Fucana marcado com ^{99m}Tc também tem certa parcela excretada pela via hepatobiliar.

Devido à afinidade intrínseca que ^{99m}Tc -Fucana apresentou pelo trato gastrointestinal inferior, poderia fornecer imagens que auxiliem no diagnóstico e acompanhamento da doença

inflamatória intestinal, configurando uma técnica não invasiva, sendo mais confortável para o paciente.

A passagem pela barreira hematoencefálica, quando se trata de radiofármaco, é uma questão relevante, tendo em vista que a exposição deste tecido à radiação pode ser prejudicial. Com este estudo, é possível observar que não há captação de ^{99m}Tc -Fucana pelo sistema nervoso central, e isso está relacionado com a natureza hidrofílica deste polissacarídeo sulfatado.

5.3 Captação de ^{99m}Tc -Fucana no sítio inflamado

O desenvolvimento de agentes de imagens de SPECT e PET de doenças inflamatórias crônicas tem como principais alvos três categorias diferentes: a) moléculas de adesão celular; b) marcadores de superfície em células imunes; c) citocinas ou enzimas (LEE; EHLERDING; CAI, 2019).

Dentre as moléculas de adesão, as selectinas, em especial as P-selectinas, se apresentam como um atraente e sensível biomarcador de inflamação em plataformas de imagem molecular para revelar mudanças patológicas e monitorar a progressão da doença, uma vez que estes receptores são expressos pelo endotélio ativado devido a um estímulo inflamatório (LEE; EHLERDING; CAI, 2019; MACRITCHIE *et al.*, 2020; PERKINS; ANDERSON; NOVELLI, 2019).

Muito se tem estudado para desenvolvimento de um agente de imagem para detecção de atividades biológicas associadas à superexpressão de P-selectina, explorando a alta afinidade que a Fucana apresenta por este biomarcador (LIN *et al.*, 2020b). Rouzet *et al.* (2011) empregaram dois tipos de modelos experimentais, trombos arteriais ricos em plaquetas e isquemia transitória do miocárdio, para avaliar a capacidade da Fucana marcada com ^{99m}Tc em detectar a expressão de P-selectina, cuja sensibilidade e seletividade da captação e retenção do agente de imagem em ambas as configurações foram excelentes. Li *et al.* (2014) promoveram a marcação da Fucana com ^{68}Ga para imagem de placas de aterosclerose ativas em camundongos que apresentavam deficiência na lipoproteína E e receberam uma dieta rica em colesterol, e constataram o potencial deste radiofármaco em detectar especificamente da expressão de P-selectina na placa de ateroma. Saboural *et al.* (2014) marcaram a Fucana com ^{99m}Tc para o desenvolvimento de um promissor agente de imagens moleculares na síndrome coronariana aguda em ratos com isquemia transitória do miocárdio. O trabalho de Vigne *et al.*

(2019) produziu um agente de imagem molecular específico para selectinas, baseado na Fucana marcada com ^{99m}Tc para avaliação de sua habilidade em acessar, de maneira precoce, o sítio de inflamação em modelo de miocardite autoimune experimental. Confirmou-se que SPECT / CT com ^{99m}Tc -Fucana diagnosticou com precisão o processo inflamatório nas etapas iniciais da miocardite autoimune e tem grande potencial para ser usado no monitoramento da evolução da doença e da eficácia da terapia.

Estes trabalhos corroboram com os resultados obtido neste projeto, no que tange o uso deste polissacarídeo sulfatado como um agente de imagem, pois é evidente que houve uma captação maior em pulmões inflamados ($\Sigma 9,79$) em relação a captação de pulmões não inflamados ($\Sigma 5,38$), e esta diferença, de acordo com tudo o que foi exposto, está relacionada com a afinidade da Fucana ao sítio inflamado. Desta forma, fica evidente o efetivo biodirecionamento do radiofármaco, uma característica importante para a prática clínica que promove a redução da exposição de tecidos saudáveis a irradiação.

5.4 Efeito da Fucana nos tecidos inflamados

Os resultados obtidos mostram claramente uma menor migração de leucócitos no modelo de inflamação pulmonar induzida por LPS. Este achado pode ser resultado do bloqueio de receptores de selectina, ação amplamente documentada, e que tem como consequência impossibilitar a infiltração de leucócitos no sítio da inflamação, atenuando, assim, a resposta inflamatória mensurada a partir da contagem de células (FITTON *et al.*, 2019; PERKINS; ANDERSON; NOVELLI, 2019; VIGNE *et al.*, 2020).

Embora não tenha havido inibição na migração de leucócitos no modelo de inflamação articular induzida por zimosan, a formação do edema foi prejudicada com o tratamento com Fucana por via intraperitoneal. Um mecanismo que pode estar por trás deste efeito é capacidade que a Fucana apresenta em modular a função imune através da inibição das vias de sinalização pró-inflamatória, como mitogen-activated protein kinases (MAPK) e nuclear factor- κB (NF- κB) (MANIKANDAN *et al.*, 2020; PRADHAN *et al.*, 2020; TSAI *et al.*, 2021; WANG *et al.*, 2019).

Presume-se que a Fucana se liga a receptores de glicoproteína específicos na superfície de macrófagos, células dendríticas e outros leucócitos tais quais os receptores TLR; CD14; CR3; SR o que pode resultar na regulação negativa de genes relacionados com essas vias,

inibindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias e os demais processos por elas regulados e estimulados (LIN *et al.*, 2020a, 2020b).

Por fim, este polissacarídeo sulfatado pode ainda atuar como agente antioxidante, eliminando diretamente as espécies reativas de oxigênio ou estimulando a atividade de defesas antioxidantes celulares. Este efeito também pode atenuar a inflamação de maneira direta e indireta, uma vez que espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio levam a dano tecidual e atuam na sinalização de diversas funções celulares, incluindo a ativação das vias da proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK) e Fator nuclear- κ B (NF- κ B) (CATARINO; SILVA; CARDOSO, 2018; PIECHOTA-POLANCZYK; FICHNA, 2014; WANG *et al.*, 2019)

Experimentos *in vivo* em camundongos mostraram que a dose, frequência e a via de administração da Fucana podem influenciar no grau da atividade e nos efeitos observados durante experimentação, visto que esses fatores podem alterar a taxa de absorção e do metabolismo deste polissacarídeo (LIN *et al.*, 2020a).

Neste estudo, a administração oral e intraperitoneal em dose única de Fucana 1 hora antes da indução com zimosan pode ter influenciado a ação anti-inflamatória pouco expressiva reportada para o modelo de artrite reumatoide. Diferente da via intravenosa aplicada no modelo de inflamação pulmonar, a concentração de Fucana que alcançou a articulação inflamada pode não ter sido suficiente para promover alterações significativas nos parâmetros inflamatórios. Em relação a via oral, um estudo sobre a farmacocinética da Fucana da *Fucus vesiculosus* mostrou que ele apresenta tempo de absorção longo ($T_{max} = 5$ horas) e permanece por bastante tempo na circulação (tempo de residência de 6,79 horas) (POZHARITSKAYA *et al.*, 2018).

Dados sobre o perfil farmacocinético da Fucana ainda são insuficientes, mas até o momento, dois ensaios clínicos focados na biodistribuição e tolerância da Fucana estão em andamento. Um deles envolve testes que envolvem a biodistribuição, segurança e dosimetria da Fucana marcada em voluntários saudáveis (ClinicalTrials.gov, Identifier: NCT03422055) e o outro adiciona a Fucana ao tratamento quimioterápico de pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas em estágio III-IV (NSCLC) para determinar o impacto na qualidade de vida (ClinicalTrials.gov, Identifier: NCT03130829). Os resultados desses ensaios clínicos irão desempenhar um papel importante na obtenção de informações sobre os parâmetros farmacocinéticos (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) e toxicidade da Fucana em seres humanos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Muitas classes farmacológicas disponíveis no mercado são derivados de protótipos de produtos naturais, incluindo atropina de *Atropa belladonna*, reserpina de *Rauwolfia serpentina*, digoxina de *Digitalis purpurea*, teofilina de *Camellia sinensis*, morfina e codeína de *Papaver somnifera*, quinino de *Cinchona officinalis*, taxol de *Taxus brevifolia*, e vincristina e vinblastina de *Vinca rosea* (QI, 2015). Existe grande interesse por compostos fitoterápicos a nível global e, neste contexto, a Fucana se apresenta como uma excelente opção, tendo em vista suas atividades biológicas com potencial terapêutico bem documentadas.

O potencial terapêutico da Fucana em debelar e mitigar a inflamação se deu nos termos de inibição da migração de leucócitos no modelo de inflamação pulmonar por LPS e da redução da formação do edema articular induzido por zimosan.

O radiofármaco ^{99m}Tc -Fucana mostrou ser um agente preciso e eficiente capaz de direcionar corretamente o radionuclídeo para o sítio de inflamação. Mais estudos são necessários, especialmente estudos usando micro PET / SPECT para comprovar, por meio de imagens, a capacidade diagnóstica deste radiofármaco

Embora os extratos de Fucana não tenham sido aprovados para fins biomédicos, as pesquisas sobre a bioatividade desse composto aumentaram exponencialmente nos últimos anos, com foco em sua aplicação como agentes de liberação de fármacos, biomateriais e agentes terapêuticos e de imagem.

REFERÊNCIAS

- ABBASI, M. *et al.* Strategies toward rheumatoid arthritis therapy; the old and the new. *J. Cell. Physiol.*, Philadelphia, v. 234, n. 7, p. 10018–10031, Jul. 2019.
- ABDULKHALEQ, L. A. *et al.* The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. *Vet. World*, [s.l.], v. 11, n. 5, p. 627–635, 2018.
- ALANI, A.; SEYMOUR, R. Systemic medication and the inflammatory cascade. *Periodontology 2000*, Copenhagen, v. 64, n. 1, p. 198–210, 2014.
- 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. *Mar. Drugs*, [s.l.], v. 9, n. 10, p. 2106–2130, 2011.
- ALENDE-CASTRO, V. *et al.* Factors influencing erythrocyte sedimentation rate in adults. *Medicine*, Baltimore, v. 98, n. 34, e16816, 2019. doi: 10.1097/MD.00000000000016816.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). *Resolução nº 38*, de 04 de Junho de 2008. Dispõe sobre a instalação e o funcionamento de Serviços de Medicina Nuclear "in vivo". Brasília, DF, 2008. 11p.
- APOSTOLOVA, E. *et al.* Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of fucoidan: a review. *Polymers*, Basel, v. 12, n. 10, p. 1–25, 2020.
- ASANKA SANJEEWA, K. K. *et al.* Fucoidan isolated from *Padina commersonii* inhibit LPS-induced inflammation in macrophages blocking TLR/NF- κ B signal pathway. *Carbohydrate Polymers*, [s.l.], v. 224, p. 115195, Aug. 2019. doi: 10.1016/j.carbpol.2019.115195.
- ATAS, A. *et al.* Comparative study between the Ves-matic and microerythrocyte sedimentation rate method. *J. clin. lab. anal.*, New York, v. 22, n. 1, p. 70–72, 2008.
- BACHOVE, I.; CHANG, C. Anakinra and related drugs targeting interleukin-1 in the treatment of cryopyrin-associated periodic syndromes. *Open Access Rheumatol.*, [s.l.], v. 6, p. 15–25, 2014.
- BAGATINI, M. D. *et al.* Immune System and Chronic Diseases. *J. Immunol. Res.*, [s.l.], v. 2017, 2017. doi: 10.1155/2017/4284327.
- BANERJEE, S. *et al.* JAK – STAT Signaling as a Target for Inflammatory and Autoimmune Diseases : Current and Future Prospects. *Drugs*, New York, v. 77, n. 5, p. 521–546, 2017.
- BEERS, D. R. *et al.* Elevated acute phase proteins reflect peripheral inflammation and disease severity in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Sci. Rep.*, [s.l.], v. 10, n. 1, p. 1–17, 2020.

BERGANTINI, L. *et al.* Effects of rituximab therapy on B cell differentiation and depletion. *Clin. Rheumatol.*, Brussels, v. 39, n. 5, p. 1415–1421, 2020.

BINDU, S.; MAZUMDER, S.; BANDYOPADHYAY, U. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: a current perspective. *Biochem. pharmacol.*, Oxford, v. 180, p. 114147, Oct. 2020. doi: 10.1016/j.bcp.2020.114147.

BLANC, P. *et al.* The use of labelled leucocyte scintigraphy to evaluate chronic periprosthetic joint infections: a retrospective multicentre study on 168 patients. *Eur. j. clin. microbiol. infect. dis.*, Berlin, v. 38, n. 9, p. 1625–1631, 2019.

BUCKLEY, L. F. *et al.* Role for Anti-Cytokine Therapies in Severe Coronavirus Disease 2019. *Crit. Care Explorat.*, [s.l.], v. 2, n. 8, p. e0178, 2020. doi: 10.1097/CCE.0000000000000178.

CARVALHO, A. C. S. *et al.* Protective effects of fucoidan, a P- and L-selectin inhibitor, in murine acute pancreatitis. *Pancreas*, New York, v. 43, n. 1, p. 82–87, 2014.

CATARINO, M. D.; SILVA, A. M. S.; CARDOSO, S. M. Phycochemical constituents and biological activities of *Fucus* spp. *Mar. Drugs*, [s.l.], v. 16, n. 8, p. 249, Jul. 2018. doi: 10.3390/md16080249.

CHAKRAVARTY, R. *et al.* Radiolabeled inorganic nanoparticles for positron emission tomography imaging of cancer: an overview. *Q. j. nucl. med. mol. imaging.*, Torino, v. 61, n. 2, p. 139–148, Mar. 2017.

CHAKRAVARTY, R.; HONG, H.; CAI, W. Positron Emission Tomography Image-Guided Drug Delivery: Current Status and Future Perspectives. *Mol. Pharm.*, Washington, v. 11, n. 11, p. 3777- 3797, Nov. 2014

CHEN, L. *et al.* Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*, [s.l.], v. 9, n. 6, p. 7204–7218, 2018.

CHOY, E. H. *et al.* Translating IL-6 biology into effective treatments. *Nat. rev., Rheumatol.*, London, v. 16, n. 6, p. 335–345, 2020.

CLARK, J. D.; FLANAGAN, M. E.; TELLIEZ, J. Discovery and Development of Janus Kinase (JAK) Inhibitors for Inflammatory Diseases. *J. med. chem.*, Washington, v. 57, p. 5023–5038, 2014.

CRAY, C.; ZAIAS, J.; ALTMAN, N. H. Acute phase response in animals: a review. *Comp. Med.*, Memphis, v. 59, n. 6, p. 517–526, 2009.

DAI, X. *et al.* Host receptors: the key to establishing cells with broad viral tropism for vaccine production. *Crit. rev. microbiol.*, Boca Raton, v. 46, n. 2, p. 147–168, 2020.

DAMSKY, W. *et al.* The emerging role of Janus kinase inhibitors in the treatment of autoimmune and inflammatory diseases. *J. allergy clin. immunol.*, St. Louis, v. 147, n. 3, p. 814–826, 2021.

- DEBBAGE, P.; JASCHKE, W. Molecular imaging with nanoparticles: giant roles for dwarfactors. *Histochem. Cell. Biol.*, Berlin, v. 130, n. 5, p. 845-875, Nov. 2008.
- DINARELLO, C. A. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood*, [s.l.], v. 117, n. 14, p. 3720–3732, 2011.
- DOHERTY, T. A.; BRYDGES, S. D.; HOFFMAN, H. M. Autoinflammation: translating mechanism to therapy. *J. leukoc. biol.*, Winston-Salem, v. 90, n. 1, p. 37–47, 2011.
- DUAN, H.; IAGARU, A.; APARICI, C. M. Radiotheranostics - Precision Medicine in Nuclear Medicine and Molecular Imaging. *Nanotheranostics*, [s.l.], v. 6, n. 1, p. 103–117, 2021.
- DUATTI, A. Review on ^{99m}Tc radiopharmaceuticals with emphasis on new advancements. *Nucl. med. biol.*, Oxford, n. 92, p. 202-216, Jan. 2020.
- DUBOIS, E. A.; RISSMANN, R.; COHEN, A. F. Riloncept and canakinumab. *Br. j. clin. pharmacol.*, London, v. 71, n. 5, p. 639–641, 2011.
- FEEHAN, K. T.; GILROY, D. W. Is Resolution the End of Inflammation? *Trends mol. med.*, Oxford, v. 25, n. 3, p. 198–214, 2019.
- FITTON, J. H. *et al.* Therapies from fucoidan: New developments. *Mar. Drugs*, [s.l.], v. 17, n. 10, 2019.
- FITTON, J. H.; STRINGER, D. N.; KARPINIEC, S. S. Therapies from fucoidan: An update. *Mar. Drugs*, [s.l.], v. 13, n. 9, p. 5920–5946, 2015.
- FLETCHER, H. R. *et al.* The seasonal variation of fucoidan within three species of brown macroalgae. *Algal Res.*, [s.l.], v. 22, p. 79–86, 2017.
- FOX, R. I. *et al.* Mechanism of action for leflunomide in rheumatoid arthritis. *Clin. immunol.*, Orlando, v. 93, n. 3, p. 198–208, 1999.
- GERMOLEC, D. R. *et al.* Markers of inflammation. *Methods mol. biol.*, Totowa, v. 1803, p. 57–79, 2018.
- GKRETSI, V.; ZACHARIA, L. C.; STYLIANOPOULOS, T. Targeting Inflammation to Improve Tumor Drug Delivery. *Trends Cancer*, [s.l.], v. 3, n. 9, p. 621–630, 2017.
- GOEL, S. *et al.* Positron emission tomography and nanotechnology: A dynamic duo for cancer theranostics. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, Amsterdam, v. 113, p. 157-176, Apr. 2017.
- GREENLEE-WACKER, M. C. Clearance of apoptotic neutrophils and resolution of inflammation. *Immunol. rev.*, Copenhagen, v. 273, n. 1, p. 357–370, Set. 2016.
- GRUYS, E. *et al.* Acute phase reaction and acute phase proteins. *J. Zhejiang Univ. Sci.*, Hangzhou, v. 6 B, n. 11, p. 1045–1056, 2005.

HARJUNPÄÄ, H. *et al.* Cell adhesion molecules and their roles and regulation in the immune and tumor microenvironment. *Front. immunol.*, [s.l.], v. 10, n. May, 2019.

HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. Review Shared Principles in NF- κ B Signaling. *Cell*, Cambridge, v. 132, p. 344–362, 2008.

HOSSEINI, A. *et al.* CTLA-4: From mechanism to autoimmune therapy. *Int. Immunopharmacol.*, Amsterdam, v. 80, Mar. 2020. doi: 10.1016/j.intimp.2020.106221

HSU, H.; HWANG, P. Clinical applications of fucoidan in translational medicine for adjuvant cancer therapy. *Clin. Transl. Med.*, [s.l.], v. 8, n. 1, p. 1–18, 2019.

HUANG, T. H. *et al.* Prophylactic administration of fucoidan represses cancer metastasis by inhibiting vascular endothelial growth factor (VEGF) and matrix metalloproteinases (MMPs) in Lewis tumor-bearing mice. *Mar. Drugs*, [s.l.], v. 13, n. 4, p. 1882–1900, 2015.

IVANENKOV, Y. A.; BALAKIN, K. V.; LAVROVSKY, Y. Small Molecule Inhibitors of NF- κ B and JAK / STAT Signal Transduction Pathways as Promising Anti-Inflammatory Therapeutics. *Mini rev. med. chem.*, Hiversum, v. 7, n. 495, p. 55–78, 2011.

JACOBS, P.; BISSONNETTE, R.; GUENTHER, L. C. Socioeconomic burden of immune-mediated inflammatory diseases - Focusing on work productivity and disability. *J. Rheumatol.*, Toronto, v. 38, n. suppl. 88, p. 55–61, 2011.

JIN, J. O. *et al.* The therapeutic potential of the anticancer activity of fucoidan: Current advances and hurdles. *Mar. Drugs*, [s.l.], v. 19, n. 5, p. 1–17, 2021.

WANG, X. *et al.* Anti-Metabolic Syndrome Effects of Fucoidan from *Fucus vesiculosus* via Reactive Oxygen Species-Mediated Regulation of JNK, Akt, and AMPK Signaling. *Molecules*, Basel, v. 24, n. 18, p. 3319, Set. 2019.

KAPUGI, M.; CUNNINGHAM, K. Corticosteroids. *Orthop. Nurs.*, Lawrenceville NJ, v. 38, n. 5, p. 336–339, 2019.

KRYLOVA, N. V. *et al.* The Comparative Analysis of Antiviral Activity of Native and Modified Fucoidans from Brown Algae *Fucus evanescens* In Vitro and In Vivo. *Mar. Drugs*, [s.l.], v. 18, n. 4, 2020.

LEE, H. J.; EHLERDING, E. B.; CAI, W. Antibody- Based Tracers for PET/SPECT Imaging of Chronic Inflammatory Diseases. *ChemBioChem*, Weinheim, v. 20, n. 4, p. 422–436, Fev. 2019.

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

LI, H. *et al.* Fucoidan from *Fucus vesiculosus* suppresses hepatitis B virus replication by enhancing extracellular signal-regulated Kinase activation. *Virol. J.*, London, v. 14, n. 1, p. 1–8, 2017.

- LIN, Y.-J.; ANZAGHE, M.; SCHÜLKE, S. Update on the Pathomechanism, Diagnosis, and Treatment Options for Rheumatoid Arthritis. *Cells*, [s.l.], v. 9, n. 4, p. 880, abr. 2020.
- LIN, Y. *et al.* The anti-cancer effects of fucoidan: A review of both in vivo and in vitro investigations. *Cancer Cell Int.*, London, v. 20, n. 1, p. 1–14, 2020a.
- LIN, Z. *et al.* Molecular targets and related biologic activities of fucoidan: a review. *Mar. Drugs*, [s.l.], v. 18, n. 8, 2020b.
- LITTLEJOHN, E. A.; MONRAD, S. U. Early Diagnosis and Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Prim. Care*, Philadelphia, v. 45, n. 2, p. 237–255, Jun. 2018.
- LIU, C. H. *et al.* Imaging inflammation and its resolution in health and disease: current status, clinical needs, challenges, and opportunities. *FASEB j.*, Bethesda, v. 33, n. 12, p. 13085–13097, Dec. 2019.
- LIU, T. *et al.* NF- κ B signaling in inflammation. *Sig. Transduct. Target Ther.*, [s.l.], v. 2, n. 1, p. 17023, Dec. 2017.
- LUTHULI, S. *et al.* Therapeutic Effects of Fucoidan: A Review on Recent Studies. *Mar. Drugs*, [s.l.], v. 17, n. 9, p. 487, 2019. doi: 10.3390/md17090487.
- MACRITCHIE, N. *et al.* Molecular imaging of inflammation - Current and emerging technologies for diagnosis and treatment. *Pharmacol. Ther.*, [s.l.], v. 211, 2020. doi: 10.1016/j.pharmthera.2020.107550.
- MAI, L. *et al.* p38 mitogen-activated protein kinase and pain. *Life Sci.*, Oxford, v. 256, n. May, p. 117885, 2020. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117885>.
- MAKARENKOVA, I. D. *et al.* Interactions between sulfated polysaccharides from sea brown algae and toll-like receptors on HEK293 eukaryotic cells in vitro. *Bull. exp. biol. med.*, London, v. 154, n. 2, p. 241–244, 2012.
- MANIKANDAN, R. *et al.* Studies on isolation, characterization of fucoidan from brown algae *Turbinaria decurrens* and evaluation of its in vivo and in vitro anti-inflammatory activities. *Int. j. biol. macromol.*, Guildford, v. 160, p. 1263–1276, 2020.
- MANSOUR, M. BEN *et al.* Primary structure and anticoagulant activity of fucoidan from the sea cucumber *Holothuria polii*. *Int. j. biol. macromol.*, Guildford, v. 121, p. 1145–1153, 2019.
- MARUYAMA, M. *et al.* Modulation of the Inflammatory Response and Bone Healing. *Front Endocrinol.*, Lausanne, v. 11, p. 1–14, 2020.
- MATHERS, C. D.; LONCAR, D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med.*, San Francisco, v. 3, n. 11, p. 2011–2030, 2006.
- MCELVANEY, O. J. *et al.* Interleukin-6: obstacles to targeting a complex cytokine in critical illness. *Lancet Respiratory Med.*, [s.l.], v. 9, n. 6, p. 643–654, 2021.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, London, n. 454 , p. 428–435, 2008.

MULLER, W. A. Getting Leukocytes to the Site of Inflammation. *Vet. Pathol.*, Basel, v. 50, n. 1, p. 7–22, Jan. 2013.

MURRAY, K. N.; PARRY-JONES, A. R.; ALLAN, S. M. Interleukin-1 and acute brain injury. *Front. cell. neurosc.*, Lausanne, v. 9, Feb. 2015. doi: 10.3389/fncel.2015.00018. eCollection 2015.

O'CONNELL, T. X.; HORITA, T. J.; KASRAVI, B. Understanding and interpreting serum protein electrophoresis. *Am. fam. physician.*, Kansas City, v. 71, n. 1, p. 105–112, 2005.

PALACIOS-GORBA, C. *et al.* Caenorhabditis elegans as an in vivo model to assess fucoidan bioactivity preventing Helicobacter pylori infection. *Food Funct.*, Cambridge, v. 11, n. 5, p. 4525–4534, 2020.

PALESTRO, C. J.; GLAUDEMANS, A. W. J. M.; DIERCKX, R. A. J. O. Multiagent imaging of inflammation and infection with radionuclides. *Clin. Transl. Imaging*, [s.l.], v. 1, n. 6, p. 385–396, 2013.

PERKINS, L. A.; ANDERSON, C. J.; NOVELLI, E. M. Targeting P-selectin adhesion molecule in molecular imaging: P-selectin expression as a valuable imaging biomarker of inflammation in cardiovascular disease. *J. nucl. med.*, New York, v. 60, n. 12, p. 1691–1697, 2019.

PERRONE, M. G. *et al.* Cyclooxygenase Inhibition Safety and Efficacy in Inflammation-Based Psychiatric Disorders. *Molecules*, Basel, v. 25, n. 22, p. 5388, Nov. 2020.

PICADO, C.; ROCA-FERRER, J. Role of the cyclooxygenase pathway in the association of obstructive sleep apnea and cancer. *J. Clin. Med.*, [s.l.], v. 9, n. 10, p. 1–19, 2020.

PIECHOTA-POLANCZYK, A.; FICHNA, J. Review article: the role of oxidative stress in pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, [s.l.], v. 387, n. 7, p. 605–620, Jul. 2014.

PONTICELLI, C.; MORONI, G. Hydroxychloroquine in systemic lupus erythematosus (SLE). *Expert Opin. Drug Saf.*, [s.l.], v. 16, n. 3, p. 411–419, 2017.

POZHARITSKAYA, O. N. *et al.* Pharmacokinetic and Tissue Distribution of Fucoidan from Fucus vesiculosus after Oral Administration to Rats. *Mar. Drugs*, [s.l.], v. 16, p. 1–10, 2018.

POZHARITSKAYA, O. N. *et al.* The pharmacokinetics of fucoidan after topical application to rats. *Mar. Drugs*, [s.l.], v. 17, n. 12, p. 1–9, 2019.

POZHARITSKAYA, O. N.; OBLUCHINSKAYA, E. D.; SHIKOV, A. N. Mechanisms of Bioactivities of Fucoidan from the Brown Seaweed Fucus vesiculosus L. of the Barents Sea. *Mar. Drugs*, [s.l.], v. 18, n. 5, p. 275, May 2020.

- PRADHAN, B. *et al.* Multifunctional role of fucoidan, sulfated polysaccharides in human health and disease: A journey under the sea in pursuit of potent therapeutic agents. *Int. j. biol. macromol.*, Guildford, v. 164, p. 4263–4278, 2020.
- PRESHAW, P. M. Host modulation therapy with anti-inflammatory agents. *Periodontology 2000*, Copenhagen, v. 76, n. 1, p. 131–149, 2018.
- QI, Z. WHO Traditional Medicine Strategy 2014-2023: Background and progress in the last decade. *Global Health Hist. Sem. Tradit. Med. Ayurveda*, [s.l.], p. 1–28, Mar. 2015.
- RACHID, O. *et al.* CTLA4-Ig (abatacept): a promising investigational drug for use in type 1 diabetes. *Expert opin. investig. drugs.*, London, v. 29, n. 3, p. 221–236, 2020.
- REMPEL, B. P.; PRICE, E. W.; PHENIX, C. P. Molecular Imaging of Hydrolytic Enzymes Using PET and SPECT. *Mol. imaging (Online)*, [s.l.], v. 16, p. 1–30, 2017.
- RINNE, H.; SALOVIUS-LAURÉN, S. The status of brown macroalgae *Fucus* spp. and its relation to environmental variation in the Finnish marine area, northern Baltic Sea. *Ambio*, Stockholm, v. 49, n. 1, p. 118–129, 2020.
- ROBB, C. T. *et al.* Non-steroidal anti-inflammatory drugs, prostaglandins, and COVID-19. *Br. J. Pharmacol.*, London, v. 177, n. 21, p. 4899–4920, 2020.
- RODENBURG, R. J. T. *et al.* The antiinflammatory drug sulfasalazine inhibits tumor necrosis factor α expression in macrophages by inducing apoptosis. *Arthritis rheum.*, Atlanta, v. 43, n. 9, p. 1941–1950, Set. 2000.
- ROIIVAINEN, A. *et al.* In Vivo Imaging of Inflammation and Infection 2019. *Contrast. Media Mol. Imaging.*, [s.l.], v. 2020, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2020/6824583>. Acesso em: 20 mar. 2022.
- SAHA, G. B. *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*. 7. ed. Nova Iorque: Springer Verlag, 2018. 428p
- SANTOS-OLIVEIRA, R. *Comparação das diversas tecnologias de imagem disponíveis atualmente no mundo e em uso em medicina*. Rio de Janeiro: Instituto de Engenharia Nuclear, 2016. Notas de aula.
- SCHETT, G.; NEURATH, M. F. Resolution of chronic inflammatory disease: universal and tissue-specific concepts. *Nature Communications*, [s.l.], v. 9, n. 1, 2018. doi: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05800-6>.
- SIGNORE, A.; GLAUDEMANS, A. W. J. M. The molecular imaging approach to image infections and inflammation by nuclear medicine techniques. *Ann. nucl. med.*, Tokyo, v. 25, n. 10, p. 681–700, 2011.
- STACY, M. R.; MAXFIELD, M. W.; SINUSAS, A. J. Targeted molecular imaging of angiogenesis in PET and SPECT: A review. *Yale j. biol. med.*, New Haven, v. 85, n. 1, p. 75–86, 2012.

- STARK, G. R. *et al.* How cells respond to interferons. *Ann. rev. biochem.*, Palo Alto, v. 67, n. 1, p. 227–264, Jun. 1998.
- STRONG, K. *et al.* Preventing chronic diseases: How many lives can we save? *Lancet*, London, v. 366, n. 9496, p. 1578–1582, 2005.
- SUGHRA, K. *et al.* Interaction of the TNFR-receptor associated factor TRAF1 with I-kappa B kinase-2 and TRAF2 indicates a regulatory function for NF-kappa B signaling. *PLoS ONE*, San Francisco, v. 5, n. 9, p. 1–8, 2010.
- SUGIMOTO, M. A. *et al.* Mediators of the Resolution of the Inflammatory Response. *Trends in Immunol.*, Oxford, v. 40, n. 3, p. 212–227, 2019.
- TABAS, I.; GLASS, C. K. Anti-inflammatory therapy in chronic disease: Challenges and opportunities. *Sci.*, Washington, v. 339, n. 6116, p. 166–172, 2013.
- TERAMOTO, H.; GUTKIND, J. S. Mitogen-Activated Protein Kinase Family. In: LENNARZ, W. J.; LANE, M. D. *Encyclopedia of Biological Chemistry*. 2. ed. Amsterdam: Elsevier, 2013. v. 2, p. 176–180.
- TSAI, M. Y. *et al.* The ameliorative effects of fucoidan in thioacetaide-induced liver injury in mice. *Molecules*, Basel, v. 26, n. 7, p. 1937, 2021.
- TVAROŠKA, I.; SELVARAJ, C.; KOČA, J. Selectins—The Two Dr. Jekyll and Mr. Hyde Faces of Adhesion Molecules—A Review. *Molecules*, Basel, v. 25, n. 12, p. 2835, Jun. 2020.
- USTYUZHANINA, N. E. *et al.* Influence of fucoidans on hemostatic system. *Mar. Drugs*, [s.l.], v. 11, n. 7, p. 2444–2458, 2013.
- VAN WEELDEN, G. *et al.* Fucoidan structure and activity in relation to anti-cancer mechanisms. *Mar. Drugs*, [s.l.], v. 17, n. 1, p. 32, 2019.
- VIGNE, J. *et al.* Early Detection of Localized Immunity in Experimental Autoimmune Myocarditis Using [99mTc]Fucoidan SPECT. *Mol. imaging biol.*, New York, v. 22, n. 3, p. 643–652, 2020.
- WANG, Y. *et al.* Biological activities of fucoidan and the factors mediating its therapeutic effects: A review of recent studies. *Mar. Drugs*, [s.l.], v. 17, n. 3, p. 15–17, 2019.
- WITTE, S.; MULJO, S. A. Integrating non-coding RNAs in JAK-STAT regulatory networks. *JAK-STAT*, v. 3, n. 1, p. e28055, Jan. 2014. doi: 10.4161/jkst.28055
- ZAHID, A. *et al.* Pharmacological inhibitors of the nlrp3 inflammasome. *Front. immunol.*, [s.l.], v. 10, p. 2538, 2019. doi: 10.3389/fimmu.2019.02538.
- ZHANG, C.; CHU, M. Leflunomide: A promising drug with good antitumor potential. *Biochem. biophys. res. commun.*, New York, v. 496, n. 2, p. 726–730, 2018.
- ZHANG, H. *et al.* Therapeutic potential of TNF α inhibitors in chronic inflammatory disorders: Past and future. *Genes Dis.*, [s.l.], v. 8, n. 1, p. 38–47, 2021.

ZHANG, Y.; PIZZUTE, T.; PEI, M. A review of crosstalk between MAPK and Wnt signals and its impact on cartilage regeneration. *Cell Tissue Res.*, Berlin, v. 358, n. 3, p. 633–649, Dec. 2014.

ZHAO, H. *et al.* Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention. *Sig. Transduct. Target. Ther.*, [s.l.], v. 6, n. 1, 2021. doi: <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00658-5>.

ZINDEL, J.; KUBES, P. DAMPs, PAMPs, and LAMPs in Immunity and Sterile Inflammation. *Annu. Rev. Pathol.*, [s.l.], v. 15, p. 493–518, Jan. 2020.

ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética



UEZO
FUNDAÇÃO CENTRO UNIVERSITÁRIO
ESTADUAL DA ZONA OESTE
Rio de Janeiro / RJ / Brasil

*Comissão de Ética no
Uso de Animais*

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Desenvolvimento de Nanorradiofarmacos.", protocolada sob o CEUA nº 8059100220, sob a responsabilidade de **Ralph Santos-Oliveira** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste (CEUA/UEZO) na reunião de 28/10/2021.

We certify that the proposal "Development of Nanoradio pharmaceuticals", utilizing 100 Heterogenics mice (males and females), protocol number CEUA 8059100220, under the responsibility of **Ralph Santos-Oliveira** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Foundation Center State University of West Zone (CEUA/UEZO) in the meeting of 10/28/2021.

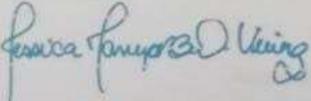
Finalidade da Proposta: *Pesquisa (Acadêmica)*

Vigência da Proposta: de 03/2020 a 03/2022 Área: *Ciências Biológicas*

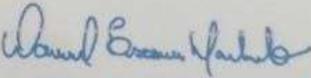
Origem:	<i>Não aplicável biotério</i>		
Espécie:	<i>Camundongos heterogênicos</i>	sexo:	<i>Machos e Fêmeas</i>
Linhagem:	<i>Balb/C</i>	idade:	<i>2 a 12 meses</i>
		Peso:	<i>150 a 500 g</i>
		N:	<i>100</i>

Local do experimento: Laboratório de Nanorradiofármacos e Novos radiofármacos do Instituto de Engenharia Nuclear da Comissão Nacional de Energia Nuclear. As atividades laboratoriais com animais também ocorrerão em laboratórios da Universidade Federal do Rio de Janeiro e da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Campo Grande, 29 de outubro de 2021



Prof. Dr. Fábio da Silva de Azevedo Fortes
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste



Prof. Dr. Daniel Escorsim Machado
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste

Av. Manuel Cabreira de Alvarenga, 1.203 Campo Grande - Rio de Janeiro/RJ - CEP 23070-200 - tel: 55 (21) 2332-7525 / 2333-6962
 Horário de atendimento: 2ª a 6ª das 8 às 16h - e-mail: ceua.uezo@gmail.com
 CEUA N 8059100220



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
 Fundação Oswaldo Cruz
 Vice- Presidência de Pesquisa e
 Coleções Biológicas



**Comissão de Ética
 no Uso de Animais**

LICENÇA

LW-14/18

Certificamos que o protocolo (P-7/18-4), intitulado "Farmacologia Aplicada ao Desenvolvimento de Medicamentos com Ação Anti-Inflamatória.", sob a responsabilidade de Elaine Cruz Rosas, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 03/12/2022 e inclui o uso total de :

Mus musculus

- 2170 Machos de C57 BL6/J, Idade: 5 Semana(s).

Mus musculus

- 3696 Machos de Swiss Webster, Idade: 4 Semana(s).

Mus musculus

- 336 Machos de DBA/1JlacJ, Idade: 4 Semana(s).

Rio de Janeiro, 3 de dezembro de 2018

Octavio Augusto França Presgrave
 Coordenador da CEUA

ANEXO B - Comprovação de submissão do artigo científico

This is an automated message.

Journal: Food Hydrocolloids for Health

Title: Fucoidan as a New Agent for Inflammation Diagnosis and Therapy

Corresponding Author: Prof. Dr. Ralph Santos-Oliveira

Co-Authors: Bianca Costa; Luana Barbosa Corrêa; Patrícia Machado Rodrigues e Silva; Yago Amigo

Pinho Jannini Sá; Fernanda Verdini Guimarães; Luciana Magalhães Rebelo Alencar; Rafael L Simoes;

Edward Helal-Neto; Eduardo Ricci-Junior; Maria das Graças Muller de Oliveira Henriques; Elaine Cruz Rosas

Manuscript Number: FHFH-D-21-00132

Dear Dr Bianca Costa,

The corresponding author Prof. Dr. Ralph Santos-Oliveira has listed you as a contributing author of the following submission via Elsevier's online submission system for Food Hydrocolloids for Health.

Submission Title: Fucoidan as a New Agent for Inflammation Diagnosis and Therapy

Elsevier asks all authors to verify their co-authorship by confirming agreement to publish this article if it is accepted for publication.

Please read the following statement and confirm your agreement by clicking on this link:

<https://www.editorialmanager.com/fhfh/l.asp?i=19833&l=H1TVAKU2>

I irrevocably authorize and grant my full consent to the corresponding author of the manuscript to: (1) enter into an exclusive publishing agreement with Elsevier on my behalf (or, if the article is to be published under a CC BY license, a non-exclusive publishing agreement), in the relevant form set out at www.elsevier.com/copyright ; and (2) unless I am a US government employee, to transfer my copyright or grant an exclusive license of rights to Elsevier as part of that publishing agreement, effective on acceptance of the article for publication. If the article is a work made for hire, I am authorized to confirm this on behalf of my employer. I agree that the copyright status selected by the corresponding author for the article if it is accepted for publication shall apply and that this agreement is subject to the governing law of the country in which the journal owner is located.

If you did not co-author this submission, please contact the corresponding author directly at presidenciafarmacia@gmail.com.

Thank you,

Food Hydrocolloids for Health

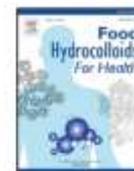
ANEXO C – Formato final do artigo científico submetido

Food Hydrocolloids for Health 2 (2022) 100049



Contents lists available at ScienceDirect

Food Hydrocolloids for Health

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fhfhUsing pure Fucoïdan and radiolabeled Fucoïdan (^{99m}Tc -Fucoïdan) as a new agent for inflammation diagnosis and therapy

Bianca Costa^a, Luana Barbosa Corrêa^{a,b,c}, Patrícia Machado Rodrigues e Silva^d, Yago Amigo Pinho Jannini de Sá^d, Fernanda Verdini Guimarães^d, Luciana Magalhães Rebelo Alencar^e, Rafael Loureiro Simões^a, Edward Helal-Neto^a, Eduardo Ricci-Junior^f, Maria das Graças Muller de Oliveira Henriques^{b,c,g}, Elaine Cruz Rosas^{b,c}, Ralph Santos-Oliveira^{a,g}

^a Brazilian Nuclear Energy Commission, Nuclear Engineering Institute, Laboratory of Nanoradiopharmaceuticals and Synthesis of Novel Radiopharmaceuticals, Rio de Janeiro, 21941906, Brazil

^b National Institute for Science and Technology on Innovation on Diseases of Neglected Populations (INCT/IDPN), Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, 21041361, Brazil

^c Laboratory of Applied Pharmacology, Farmanguinhos, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, 21041361, Brazil

^d Laboratory of Inflammation, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro 21040-360, Brazil

^e Laboratory of Biophysics and Nanosystems, Federal University of Maranhão, Maranhão 65060-805, Brazil

^f Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941000, Brazil

^g Zona Oeste State University, Laboratory of Radiopharmacy and Nanoradiopharmaceuticals, Rio de Janeiro, 23070200, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Inflammation

Therapy

Radionuclide therapy

Radiopharmacy

ABSTRACT

Inflammation is a phenomenon responsible for the perturbation of homeostasis in several levels, with many sources, such as infection, injury, and exposure to contaminants. The necessity of new products that are effective in treating inflammation processes as can selectively imaging an inflammation site is a global issue. In this study, we have evaluated the applicability of Fucoïdan as a therapeutic and imaging agent. We have assessed the Fucoïdan in two inflammation models for therapeutic purposes: arthritis and lungs (LPS). In the case of use as an imaging agent, we evaluated the radiolabeled Fucoïdan with ^{99m}Tc in inflamed lungs (LPS). The results demonstrated that Fucoïdan has a therapeutic anti-inflammatory effect, especially in the lung model (LPS). Additionally, the imaging application demonstrated that radiolabeled Fucoïdan (^{99m}Tc -Fucoïdan) has an important chemoattraction for inflammation sites with very high bioaccumulation, which permits to think in an imaging application.

Introduction

Inflammation is a vital defense mechanism for health and is triggered by harmful stimuli such as pathogens, damaged cells, toxic compounds, or radiation, and it works by removing these stimuli to promote healing and restore homeostasis to the affected tissue (Abdulkhaleq et al., 2018; Medzhitov, 2008). The inflammatory response can lead to immunological tissue alterations, causing changes in their phenotype and cell function, with no reestablishment of normal conditions, as it leads to an adapted state of homeostasis, in which the tissue is different from the previous state, contributing to the development and aggravation of many pathologies of an inflammatory nature (Feehan & Gilroy, 2019). The early detection and assessment of inflammation sites require sensitive and non-invasive diagnostic methods. In this sense, molecular imaging modalities are fundamental tools. They allow the evaluation of tis-

sue morphology and eventual changes due to the inflammatory process, making it possible for early treatment, improving the individual's quality of life.

Fucoïdan, a general term used for a class of sulfated polysaccharides rich in α -L-fucose, negatively charged, highly hygroscopic, and soluble in water and acidic solutions found in sea cucumbers, sea urchins, and brown seaweed, has been investigated as an anti-inflammatory drug. Its structure is complex and can vary according to the species from which it is extracted, with the time and method of purification (Fletcher, Biller, Ross, & Adams, 2017; Luthull et al., 2019). The various pharmacological effects of Fucoïdan include anti-inflammatory, antiviral and antitumor activities, which are attributed to its ability to modulate some actions of the immune response through interaction with different receptors, such as Toll-like receptors (TLRs); complement receptor-3 (CR-3); and

* All correspondence to: Laboratory of Radiopharmacy and Nanoradiopharmaceuticals, CNEN: Comissao Nacional de Energia Nuclear, Brazil.
E-mail address: roliveira@ien.gov.br (M.d.G. Muller de Oliveira Henriques).

<https://doi.org/10.1016/j.fhfh.2021.100049>

Received 4 October 2021; Received in revised form 8 December 2021; Accepted 10 December 2021

2667-0259/© 2021 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

scavenger receptors on dendritic cells, macrophages, and other leukocytes, as well as selecting receptors presented on platelets, leukocytes and activated endothelium (Ale, Mikkelsen, & Meyer, 2011; (Asanka-Sanjeewa et al., 2019; Carvalho et al., 2014)). It is known that Fucoidan acts at different stages of the inflammatory process, such as blockade of lymphocyte adhesion and invasion, inhibition of multiple enzymes, induction of apoptosis (Makarenkova et al., 2012). The possible mechanism of action is related to the down-regulation of MAPK and NF- κ B signaling pathways followed by a decrease in pro-inflammatory cytokine production (Apostolova et al., 2020). The increasing number of investigations in the past years have demonstrated the effects of Fucoidan on the cardiovascular system (Yim & Yao, 2021), tissue regeneration (Sumayya & Kurup, 2021; Lu, HT et al., 2019), arthritis (Phuil, Majid, Haq, Khan, & Kim, 2017) and pulmonary fibrosis (Wu et al., 2021), suggesting an important role of Fucoidan in the clinical treatment of several pathologies.

The use of Fucoidan as an imaging agent has been performed by Rouzet et al. (2011), who used ^{99m}Tc -labeled Fucoidan to detect the presence of platelet-rich arterial thrombi in a model of abdominal aortic aneurysms (AAAs) in rats. Recently, Vigne et al. (2019) evaluated the use of ^{99m}Tc -labeled Fucoidan as an imaging agent for early detection of myocarditis using *in vivo* model of myocarditis. In both cases, the results showed the avidity and affinity of Fucoidan for the inflammatory site and the possibility of using the radiolabeled compound as an imaging agent.

In this study Fucoidan (pure) and Fucoidan radiolabeled with ^{99m}Tc were tested to evaluate their ability as therapeutic and imaging agents in several *in vivo* models of inflammation.

Methodology

Reagents and solvents

All reagents and solvents used in all experiments were purchased from Sigma-Aldrich.

Radiolabeling with ^{99m}Tc

The labeling process was performed using 150 μg of Fucoidan, which was incubated with stannous chloride (SnCl_2) solution (80 $\mu\text{L}/\text{mL}$) (Sigma-Aldrich) for 20 min at room temperature, followed by the addition of 100 μCi (approximately 300 μL) of technetium-99 m.

Quality control of the labeling process with Tc-^{99m}

To confirm the efficacy of the radiolabeling process, Radio Thin Layer Chromatography (RTLC) was done using Whatman paper n $^{\circ}$ 1. In this regard, 2 μL of ^{99m}Tc - Fucoidan (Sigma-Aldrich) and acetone (Sigma-Aldrich) as mobile phase at times of 2 and 4 and 24 h was evaluated. The radioactivity of the strips was verified in a γ -counter (Perkin Elmer Wizard $^{\text{®}}$ 2470, Shelton, CT City, State). The RTLC was performed in triplicate for each time.

Animals

C57BL/6 mice, male and female (20–30 g), were obtained from Oswaldo Cruz Foundation breeding unit (Rio de Janeiro, Brazil) or the Multidisciplinary Center for Biological Research (CEMIB) (UNICAMP, São Paulo, Brazil) and housed in standard plastic cages coated with white Pinus wood shavings as bedding, and stainless-steel cover lids. Cages were maintained under controlled room temperature ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), relative air humidity (app.70%), and a 12 h light-dark cycle. All mice were kept with free access to filtered water and standard rodent chow. According to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH), all experiments were conducted. The Institutional Review Board and the Animal Ethics Committee approved the study protocol (CEUA UEZO 001/2015, CEUA IPEN 181/2017, CEUA FIOCRUZ LW-43/14, CEUA IOC 001/19).

Biodistribution of ^{99m}Tc -Fucoidan

Animals were injected with intravenous injection (retro-orbital sinus) of ^{99m}Tc Fucoidan (3.7 MBq/0.2 mL) and, two hours later, killed by CO_2 inhalation. Blood and several organs (heart, brain, stomach, small and large intestines, bladder, left and right lungs, left and right kidneys, liver, spleen, and pancreas) were removed and weighed. Tissue radioactive uptake was measured using a gamma counter (Wizard 2470, Perkin Elmer), and the results were expressed as a percentage of the injected dose per gram of tissue.

Uptake of ^{99m}Tc -Fucoidan in inflamed site

Animals were divided into two groups (inflamed and non-inflamed) received by installation ^{99m}Tc Fucoidan (3.7 MBq/0.2 mL) and 2 h post-injection they were euthanized by CO_2 inhalation and had both lungs (right and left) removed, weighed, and the radioactive tissue uptake measured using a gamma counter (Wizard 2470, Perkin Elmer). Results were expressed as the percentage of injected dose per gram of tissue.

Model of inflammatory arthritis

Joint Inflammation was induced by intra-articular (i.a.) injection of zymosan (500 $\mu\text{g}/\text{cavity}$) that was diluted in sterile saline to a final volume of 25 μL (Rosas et al., 2015; Correa et al., 2016). Control animals received, i.a., injection of an equal volume of sterile saline. Knee-joint swelling was evaluated by measuring the transverse diameters of each knee joint using digital calipers (Digmatic Caliper, Mitutoyo Corporation, Kanagawa, Japan). Values of knee joint thickness were expressed in millimeters (mm) as the difference of the knee-joint diameter before and after the induction of articular Inflammation (Δ). After 24 h of joint inflammation induction, the mice were euthanized using an excess of anesthetic (sodium pentobarbital 3% - Hypnol). Knee synovial cavities were washed with 300 μL of PBS containing EDTA (10 mM). Total leukocyte counts were performed in an automatic particle counter (Coulter Z2, Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA). Differential cell counts were performed under light microscopy (100 \times) using cytospin smears (Cytospin 3, Shandon Inc., Pittsburgh, PA, USA) stained according to the May-Grunwald-Giemsa method. The counts were reported as the number of cells per cavity ($\times 10^5$).

Animals were treated with Fucoidan, at a dose of 100 mg/kg, diluted in filtered water, and administered either orally (p.o.) (200 μL) or intraperitoneally (i.p.) (100 μL), 1 h before zymosan stimulation. The same volume of vehicles was administered to the control groups. Animals were divided into four experimental groups: at least five animals - i) saline-stimulated; ii) zymosan-stimulated and treated with vehicle; iii) zymosan-stimulated and treated with Fucoidan by oral route, and iv) zymosan-stimulated and treated with Fucoidan by intraperitoneal route.

Model of lung inflammation by LPS

Lung inflammation was induced in mice anesthetized with a mixture of isoflurane (0.5%) and atmospheric air by oropharyngeal aspiration of LPS (25 $\mu\text{g}/25 \mu\text{L}$) (from *E. coli* serotype O127:B8; SIGMA, St. Louis, MO, USA) or sterile saline (control group). The analyses were performed 24 h after the LPS instillation. For the analysis of cells infiltrated into the airways, animals were killed with ketamine (300 mg/kg), and xylazine (30 mg/kg) and the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) obtained after flushing the airways with twice 750 μL of PBS with ethylenediamine tetra-acetic acid (EDTA, 10 mM). BALF was retrieved and centrifuged (3000 rpm, 4°C for 10 min), and the cell pellet was resuspended in EDTA-PBS (250 μL). Total leukocytes were counted in a Neubauer chamber using Türk solution. The differential analysis was performed in cytocentrifuged smears stained with May-Grunwald-Giemsa dye under an oil immersion objective and light microscopy (Olympus BX50). Final counts were reported as the number of cells ($\times 10^5$) per BALF.

Table 1
Percentage of labeled Fucoïdan over time, after ascending chromatograms of ^{99m}Tc compared with free pertechnetate ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4^-$).

Time (h)	Labeling (%)
0	99.9 ± 0.4%
1	99.9 ± 0.5%
2	99.8 ± 0.3%
4	99.8 ± 0.6%
6	99.1 ± 0.4%
24	99.6 ± 0.5%

Animals were treated with Fucoïdan (100 mg/kg), diluted in filtered water, and administered intravenously, 22 h after LPS stimulation. The same volume of vehicles was distributed into the control groups. Animals were divided into three experimental groups, consisting of at least six animals: i) saline-stimulated; ii) LPS-stimulated and treated with vehicle; iii) LPS-stimulated and treated with Fucoïdan.

Statistical analysis

For statistical analysis, GraphPad Prism 5.0 was used. All data are presented as mean ± SD. Two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni post hoc test or T-test student were used for analysis. The significance level was set at $p < 0.05$ or $p < 0.01$.

Results

Radiolabeling with ^{99m}Tc and quality control of the labeling process

The radiolabeling process using pure Fucoïdan and technetium 99 metastable by a direct radiolabeling process showed to be an efficient methodology with over 95% of efficacy in 24 h (Table 1).

Biodistribution of ^{99m}Tc -Fucoïdan

The biodistribution of ^{99m}Tc -Fucoïdan (Fig. 1) showed a ubiquitous behavior with Fucoïdan uptake in several organs. The organs that deserved more attention were: liver (Σ 29.08%), stomach (Σ 6.73%), large intestine (Σ 14.5%), kidneys (Σ 30.78%), and lungs (Σ 5.52%).

Uptake of ^{99m}Tc -Fucoïdan in inflamed site

We next investigated the uptake of ^{99m}Tc -Fucoïdan in inflamed tissue. As expressed in Fig. 2, it is possible to observe a higher uptake in inflamed lungs (Σ 9.79) rather than not-inflamed lungs (Σ 5.38).

Fucoïdan effect on articular inflammatory response induced by zymosan

Previous reports have demonstrated that, i.e., injection of zymosan-induced, an articular inflammatory response within 24 h, characterized by a significant increase in edema formation and massive neutrophil influx (approximately 90% of total leucocytes). We examined the anti-inflammatory effects of Fucoïdan in this murine model of articular inflammation and observed that mouse pretreatment with Fucoïdan (100 mg/kg; i.p) 1 h before i.a. zymosan stimulation significantly impaired zymosan-induced edema formation within 24 h. However, treatment with Fucoïdan did not substantially inhibit edema formation (Fig. 3A). Treatment by oral or i.p. with Fucoïdan also did not deter the migration of leukocytes into the synovial cavity (Fig. 3B-D).

Fucoïdan effect on lung inflammation by LPS

LPS stimulation of C57BL/6 mice yielded a significant increase in total leukocyte numbers in the BALF. The elevation in leukocyte counts was accounted for by a considerable increase in the number of neutrophils. These changes were sensitive to treatment with Fucoïdan (100 mg/kg, i.v.) (Fig. 4).

Discussion

Inflammation is a vital defense mechanism for health. The early detection of the inflammation process through sensitive and non-invasive diagnostic methods allows early treatment and quality of life. Here, we observed that Fucoïdan could act as a therapeutic and possible imaging agent in classical *in vivo* models of inflammation.

The direct radiolabeling process using ^{99m}Tc showed to be efficient in reducing inflammatory parameters, such as edema formation and leukocyte migration. To reach this, we conjugate Fucoïdan with ^{99m}Tc that allows us to analyze the capacity of Fucoïdan to act as a therapeutic and imaging agent. In this context, the presence of several reactive groups, including alkyl groups and sulfo groups in the structure of Fucoïdan, aids in the conjugation reaction with ^{99m}Tc , especially in $[\text{99mTc} = \text{O}^{3+}]$ or $[\text{99mTc}(\text{CO}_3)]^+$ core configuration. The $[\text{99mTc} = \text{O}^{3+}]$ is the most common core used for radiolabeling with ^{99m}Tc complexes. In this reaction, due to the presence of sulfo groups, the ^{99m}Tc would assume a square pyramidal geometry, with the technetium (^{99m}Tc) in the middle of the structure. In the case of $[\text{99mTc}(\text{CO}_3)]^+$ with the reaction occurring with the methyl group of the structure, probably an octahedral geometry with ^{99m}Tc in the middle of the structure will be formed to stabilize the charges and density of the complex (Costa, Ilem-Özdemir, & Santos-Oliveira, 2019). In both cases, a stable and effective complex of Fucoïdan and ^{99m}Tc will be formed.

The biodistribution assay indicates the usefulness and effectiveness of the radiopharmaceutical. This assay allows for evaluating and quantifying the radiopharmaceutical uptake in tissues and determining how it is excreted from the body (Duatti, 2021). In this study, we showed higher uptake of Tc - 99m -labeled Fucoïdan in kidneys (30.78%) and liver (29.08%), while in other viscera organs, the uptake was lower. The uptake in the large intestine was 14.5%, 6.73% in the stomach, and 5.52% in the lungs. As the liver and kidney uptake was very similar, it is impossible to confirm whether the radiopharmaceutical excretion was predominant in the hepatobiliary or the kidneys system. Even so, the kidney system eliminated a significant fraction, which is an interesting route due to lower radiation exposure. However, complementary studies should be done to determine the time of renal clearance. In confirming so, this radiopharmaceutical could be useful for obtaining dynamic images for morphological imaging (Chigoho, Bridoux, & Hermet, 2021). In addition, the higher uptake in this organ can be advantageous for other clinical applications. Tan J et al. (2020) describes the use of Fucoïdan to treat nephrotic syndrome, including a Fucoïdan-based drug approved by the Chinese Food and Drug Administration in 2003 for the treatment of kidney disease (Wang, Geng, Yue, & Zhang, 2019).

As mentioned above, we show in this study that there was also a significant uptake of ^{99m}Tc -labeled Fucoïdan in the liver. The elimination of this radiopharmaceutical through the hepatobiliary system could measure liver function and potentially identify patients at risk for liver failure. This could provide valuable information in the pre- and postoperative estimation of patients with hepatobiliary disease (Hoekstra et al., 2013; Lambie et al., 2011). Also, due to the affinity of ^{99m}Tc -labeled Fucoïdan for the lower gastrointestinal tract, this radiopharmaceutical could be used to provide images for diagnosis and follow-up of inflammatory bowel disease characterized by recurrent local inflammation (Dmochowska & Wardill, 2018). We propose that ^{99m}Tc -conjugated Fucoïdan could be used as a non-invasive technique to treat several in-

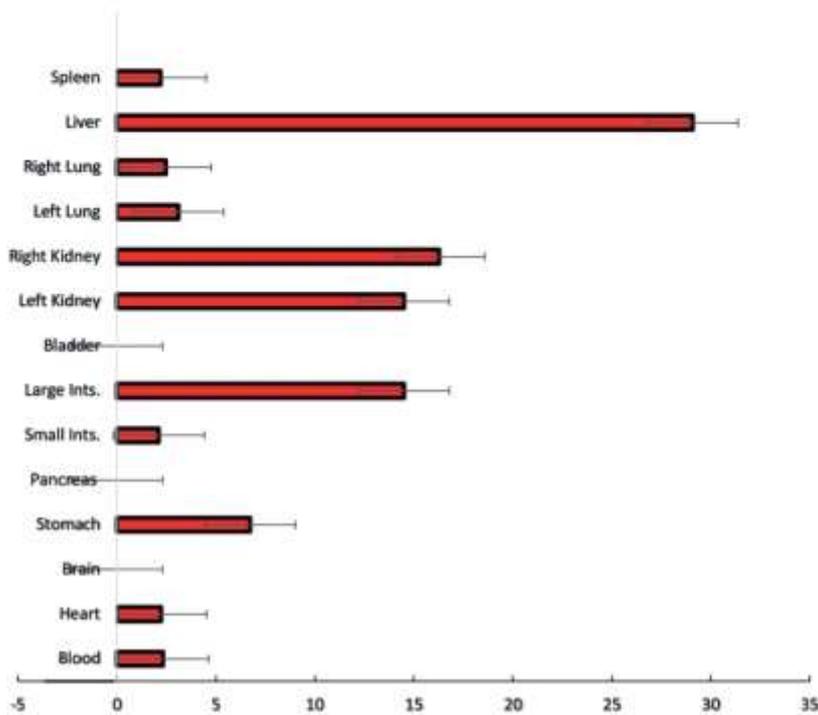


Fig. 1. Biodistribution of ^{99m}Tc -Fucoidan in healthy animals. Animals were injected with intravenous injection of ^{99m}Tc Fucoidan (3.7 MBq/0.2 mL). Blood and several organs were removed and weighed. Tissue radioactive uptake was measured using a gamma counter, and the results were expressed as a percentage of the injected dose per gram of tissue.

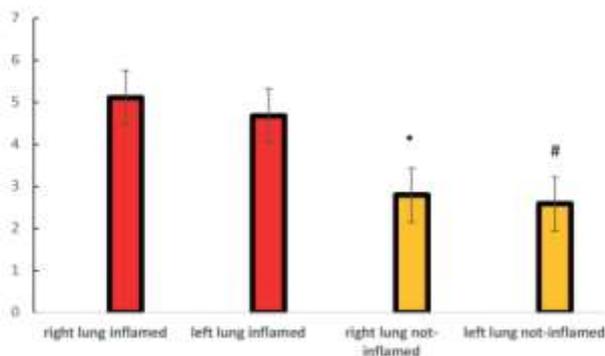


Fig. 2. Lung uptake of ^{99m}Tc Fucoidan showing the higher uptake in inflamed lungs. Lung inflammation was induced by oropharyngeal aspiration of LPS (25 μg /25 μL), and ^{99m}Tc Fucoidan (3.7 MBq/0.2 mL) was instilled. 2 h post-installation, both lungs (right and left) were removed, weighed and the radioactive tissue uptake was measured using a gamma counter. Results were expressed as the percentage of injected dose per gram of tissue. * $p < 0,01$ when compared to right lung inflamed; # $p < 0,01$ when compared to left lung inflamed.

flammatory pathologies, which would be more comfortable for the patient during the treatment period.

Non-invasive imaging techniques such as magnetic resonance imaging (MRI), single-photon emission computed tomography (SPECT), and positron emission tomography (PET) is widely used for assessing disease activity and monitoring response to treatment. The Radionuclide-based SPECT and PET images have advantages over other modalities because they provide molecular function information, high sensitivity, and high contrast (Lee, Ehlerding, & Cai, 2019; MacRitchie et al. 2020). The development of SPECT and PET imaging for chronic inflammatory diseases has three main targets that can be classified into different categories: (1) cell adhesion molecules; (2) surface markers on immune cells; and (3) cytokines or enzymes (Lee et al., 2019).

Saboural et al. (2014) labeled Fucoidan with ^{99m}Tc for developing a molecular imaging agent to diagnose acute coronary syndrome in

rats with transient myocardial ischemia. In an experimental model of autoimmune myocarditis, ^{99m}Tc -labeled Fucoidan was used to access the inflammation site early. SPECT/CT with ^{99m}Tc -labelled Fucoidan accurately diagnosed the inflammatory process in the early stages of autoimmune myocarditis. This study showed the great potential of ^{99m}Tc -labeled Fucoidan in monitoring the evolution of this disease and the effectiveness of therapy (Vigne et al., 2020).

These works corroborate the results obtained in this study regarding the use of this sulfated polysaccharide as an imaging agent. We demonstrated a great uptake of ^{99m}Tc -labeled Fucoidan in inflamed lungs (Σ 9.79) compared to the uptake in healthy lungs (Σ 5.38). This difference could be related to the affinity of Fucoidan to bind specific targets in the inflammatory site. The results obtained clearly show a lower migration of leukocytes to the area of inflammation, both articular and pulmonary.

Another mechanism that may explain the anti-inflammatory action is the ability of Fucoidan to modulate the immune response through the inhibition of pro-inflammatory signaling pathways, such as mitogen-activated protein kinases (MAPK) and nuclear factor- κB (NF- κB) (Tsay et al., 2021; Wang et al., 2019; Pradhan et al. 2019; Manikandan et al., 2020). It was shown that Fucoidan inhibits LPS-induced inflammation via blocking NF- κB and MAPK pathways

Fucoidan is presumed to bind to specific glycoprotein receptors on the surface of macrophages, dendritic cells, and other leukocytes such as TLR4 receptors; CD14; CR3; SR1. This can result in the downregulation of genes related to this pathway, inhibiting the expression of pro-inflammatory cytokines and other processes regulated by them, such as NF- κB (Lin et al., 2018; Lin et al., 2020). For example, Fucoidan can inhibit tumor cell migration and lymphocytes recruitment by suppressing CCL22 in M2 macrophages via NF- κB -dependent transcription. Data from this study showed that oral administration of Fucoidan did not significantly inhibit zymosan-induced edema formation.

Many authors have evaluated the anti-inflammatory activity of Fucoidan in different experimental models, applying it via gavage or adding it to the animals' feed, as shown in Table 2 below.

In these studies, Fucoidan was administered orally for a certain period, which may have contributed to the positive results described in them. On the other hand, the anti-inflammatory action reported in this

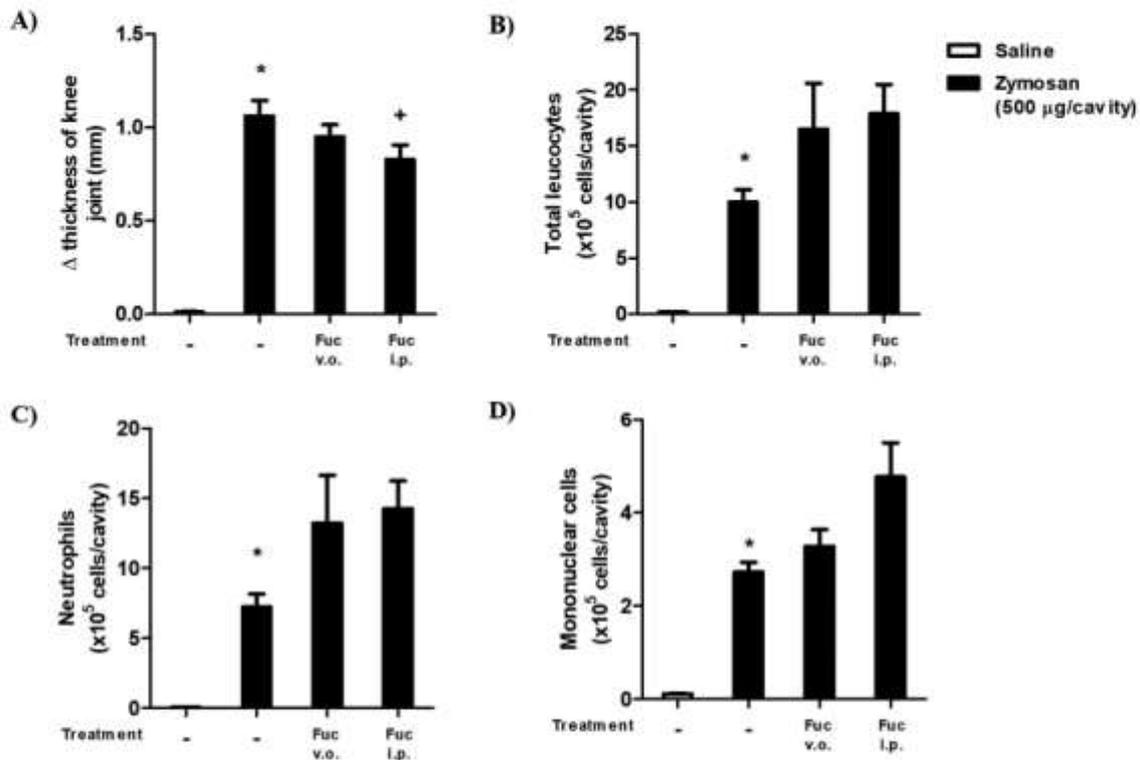


Fig. 3. Fucoidan effect on edema and leukocyte migration during zymosan-induced arthritis. (A) Knee joint thickness was measured with a digital caliper before and 24 h after zymosan stimulation. Mice were pretreated with fucoidan (Fuc) (100 mg/kg) orally or intraperitoneally 1 h before stimulation, and after 24 h of zymosan, i.a. injection (500 µg/25 µL/cavity), knee synovial cells were recovered and analyzed in (B) total leukocyte, (C) neutrophils and (D) mononuclear cells migration. Control animals received sterile saline, i.a. injection (25 µL/cavity). Data were presented as mean ± SEM (n = 6). Statistically significant ($P \leq 0.05$) are indicated between stimulated and non-stimulated groups (*) and between treated and non-treated groups (+).

Table 2
Anti-inflammatory activity of orally administered Fucoidan.

Disease	Treatment with fucoidan	Outcomes	Mechanisms	Reference
Radiation Pneumonitis	200 mg/kg/day oral gavage for 14 days	Attenuated induced fibrosis; decreased leukocyte accumulation	Changed the expression Patterns of inflammatory cytokines	Yu et al., 2018
Formalin induced paw-edema	50 mg/kg/day oral gavage for 7 days	Anti-nociceptive effect and decreased the size of paw swelling edema	Retained p65/nf-κb transcription factor showing downregulation of expression of pro-inflammatory mediators	Manikandan et al., 2020
Thioacetamide-induced Liver injury	20 mg/kg/day by oral gavage for 42 days	Hepatoprotective effect suppression of the inflammatory responses and acting as an antioxidant	Hepatic antioxidative enzymes; and a lower alt, ast, tnf-α, il-1β, and c-reactive protein	Tsai et al., 2021
Surgically induced endometriosis	50–150 mg/kg/day by oral gavage for 42 days.	anti-inflammatory effects; reduced the volume and weight of endometriotic lesions	Inhibited the viability and migration; decreased inflammatory cytokines and VEGF	Chang et al., 2020

study, in which the anti-inflammatory action of orally administered Fucoidan was not expressive, can be justified by the low frequency of administration of this polysaccharide right before the induction of edema with zymosan, or it could be that the model used not ideal, as the zymosan model produces an acute inflammatory response and substances that mainly interfere with innate immunity tend to be more successful.

Finally, based on the evidence available, the Fucoidan mechanism is widely known (Table 3). They can mimic the P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1), exhibiting a high affinity for P-selectin over expressed by activated platelets consequently blocking P-selectin (Bachelet et al., 2009). P-selectin is a cell surface adhesion molecule which mediates leukocyte-endothelial cell adhesion (Cheng et al.,

2020). P-selectin is stored in membranes of a granules of platelets and Weibel-Palade bodies of endothelial cells. When mediators such as thrombin or histamine activate these cells, the granules fuse with the plasma membrane and P-selectin is rapidly redistributed to the cell surface. P-selectin interacts reversibly with PSGL-1, a trans-membrane homodimeric mucin on leukocytes. These interactions mediate leukocyte rolling on activated platelets and endothelial cells. So, P-selectin initiates leukocyte recruitment during inflammation (Panicker et al., 2017). Due to the activation of the inflammatory process in the lung by LPS or in the joint by zymosan, there is probably an overexpression of P-selectin, which justifies accumulation of 99mTc-Fucoidan in the inflammatory site. Thus, a functional radiolabeled compound as with ligands for tar-

Table 3
Studies on the mechanism of action of Fucoïdan.

System	Indication	Fucoïdan functions	Method	Results	Reference
Nano drug delivery system (NDDS) (MnO ₂ /uPA@pep-Fuco)	Thrombolytic therapy	Surface modification to improve poor water dispersibility and low biocompatibility of MnO ₂ NPs	Thrombin-responsive peptide (GGLVPRGFGG, pep) as the bridge to connect MnO ₂ NPs and Fucoïdan	NDDS specifically accumulate at platelet-rich thrombus because of the ligand-receptor interaction between Fuco and P-selectin.	Zhang et al., 2021
Nanoparticle-based drug delivery systems	Thrombosis	Fu can strongly bind to activated platelet-rich thrombi through P-selectin-based ligand-receptor interactions	To ensure targeted delivery of Uk and ICG to a thrombus site, we used Fu as an activated platelet-specific ligand to modify the Uk/ICG@Si-AuNR nanocomposite	P-selectin specific Si-AuNR nanocomposite can efficiently and safely deliver ICG and Uk to thrombi with photothermal/ enzymatic thrombolytic effects and NIR II fluorescence imaging function (ICG) for thrombosis imaging and therapy	Chang et al., 2021
P-selectin-specific complex nanoparticles (CNPs)	in vitro MR imaging of inflammatory endothelial cells model	Lower molecular weight fucoïdan (LMWF) inhibited P-selectin binding, and modulated P-selectin and provided with other biological functions including promotion of revascularization and endothelial protective activities	Combine LMWF (LMWF8775, thermolysin-hydrolyzed protamine peptide (cell penetrating peptide, TPP1880) and Gd-DTPA in a nanosystem for in vitro MR imaging of inflammatory endothelial cells model	The nanoplatform integrating multiple functionalities such as P-selectin targeting, cell penetrating, and MR imaging in the CNPs can selectively deliver Gd-DTPA to PMA-stimulated, activated HUVECs	Cheng et al., 2020
Fucoïdan-functionalized dextran submicroparticles (SPs)	in vitro amidolytic and fibrinolytic activities	Fucoïdan emerged as an affordable, high-quality targeting ligand to P-selectin that was prior validated by the group on various polysaccharide-based nano- & microsystems for molecular diagnostics and targeted therapy	Fabricated novel fucoïdan-functionalized dextran submicroparticles (SPs) by a green chemistry method using fully biodegradable and biocompatible compounds, all of them approved by the FDA.	Fucoïdan functionalized SPs have a high and specific affinity to P-selectin and accumulate on activated platelet aggregates and bind to the thrombi in vivo and proved superior in vivo thrombolytic efficacy in a mouse stroke thrombin model	Zenych et al. 2021
Biospecific polysaccharide-based submicronic particles (SPs)	Evaluate the cytotoxicity, contrast properties and targeting capacity of the obtained objects	Able to bind to human activated platelets for atherothrombosis imaging by MRI	SPs were synthesized by co-crosslinking of fucoïdan and former dextran macrocomplexes within 110 the droplets of a water-in-oil emulsion	Particles exhibited good colloidal stability and were cytocompatible with human endothelial cells and exhibited good MR contrast properties	Forero Ramirez et al., 2020

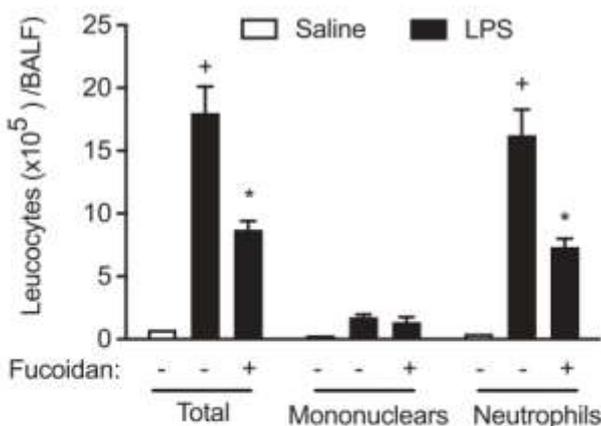


Fig. 4. Effect of treatment with Fucoïdan (100 mg/kg) on LPS-induced leucocyte changes (total and differential cell counts) in the BALF. The bronchoalveolar lavage fluid from C57BL/6 mice was collected 24 h after LPS (25 µg) stimulation. Values are mean ± SEM from at least six animals. **P* < 0.05 as compared with saline-stimulated mice. **P* < 0.05 as compared with LPS-stimulated mice.

getting P-selectin can be used to deliver imaging and therapeutic agents for treatments of the diseases associated with increased expression of P-selectin.

Conclusion

In this study, we demonstrated for the first time that Fucoïdan could act as an imaging agent in inflammatory models. There is already a phase 1 clinical trial reporting the first human evaluation of ^{99m}Tc-labeled Fucoïdan SPECT for P-selectin imaging, demonstrating a good biodistribution and safety profile (Zheng et al., 2019). To date, two clinical trials are ongoing. These trials are focused on the biodistribution and tolerance of Fucoïdan. Healthy volunteers are involved in trials involving the biodistribution, safety, and dosimetry of a labeled Fucoïdan (ClinicalTrials.gov, Identifier: NCT03422055). In another trial, patients with stage III-IV non-small cell lung cancer (NSCLC) are being studied (in a placebo-controlled trial), in which Fucoïdan is added to their chemotherapy treatment to determine the impact it would have. Present in your quality of life (ClinicalTrials.gov, Identifier: NCT03130829). The results of these studies (clinical trials) will play an important role in obtaining information about ADME and Fucoïdan toxicity in humans. Although Fucoïdan extracts have not been approved for biomedical pur-

poses, research on the bioactivity of this compound has increased exponentially in recent years, with a focus on its application as drug delivery agents, biomaterials, and therapeutic agents.

Declaration of Competing Interest

No potential conflicts of interest relevant to this article exist.

Acknowledgement

Dr. Ralph Santos-Oliveira would like to thank the financial support from Carlos Chagas Filho Foundation for Research Support of Rio de Janeiro State (FAPERJ) (E-26/201.946/2020, E-26/200.815/2021 and 26/010.000981/2019) and CNPq (301069/2018-2).

References

- Abdulkhaleq, L. A., Assi, M. A., Abdullah, R., Zamri-Saad, M., Taufiq-Yap, H., & Hezme, M. N. M. (2018). The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. *Veterinary World*, *11*, 627–635. [10.14202/vetworld.2018.627-635](https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.627-635).
- Ale, M. T., Mikkelsen, J. D., & Meyer, S. (2011). 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*, *9*, 2106–2130. [10.3390/md9102106](https://doi.org/10.3390/md9102106).
- Apostolova, E., Lukova, P., Baldzheva, A., Katsarov, P., Nikolova, M., Iliev, I., et al. (2020). Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of fucoidan: A review. *Polymers*, *12*, 2338. [10.3390/polym12102338](https://doi.org/10.3390/polym12102338).
- Asanka-Sanjeeva, K. K., Jayawardena, K. T., Kim, H. S., Kim, S. Y., Shanura, L. P., Wang, L., et al. (2019). Fucoidan isolated from *Padina commersonii* inhibit LPS-induced Inflammation in macrophages blocking TLR/NF- κ B signal pathway. *Carbohydrate Polymers*, *15*, 224 Article 115195. [10.1016/j.carbpol.2019.115195](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115195).
- Carvalho, A. C. S., Sousa, R. B., Franco, A. X., Costa, J. V. C., Neves, L. M., Ribeiro, R. A., et al. (2014). Protective effects of Fucoidan, a P- and L-selectin inhibitor, in murine acute pancreatitis. *Pancreas*, *43*, 82–87. [10.1097/MPA.0b013e3182a63b9d](https://doi.org/10.1097/MPA.0b013e3182a63b9d).
- Chang, L. C., Chiang, Y. F., Chen, H. Y., Huang, Y. J., Liu, A. C., & Hsia, S. M. (2020). The potential effect of Fucoidan on inhibiting epithelial-to-mesenchymal transition, proliferation, and increase in apoptosis for endometriosis treatment: In vivo and in vitro study. *Biomedicine*, *8*, 1–15. [10.3390/biomed8110528](https://doi.org/10.3390/biomed8110528).
- Chang, L. H., Chuang, E. Y., Cheng, T. M., Lin, C., Shih, C. M., Wu, A. T., et al. (2021). Thrombus-specific theranostic nanocomposite for codelivery of thrombolytic drug, algae-derived anticoagulant and NIR fluorescent contrast agent. *Acta Biomaterialia*, *134*, 686–701 Oct 15. [10.1016/j.actbio.2021.07.072](https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.07.072).
- Cheng, T. M., Li, R., Kao, Y. J., Hsu, C. H., Chu, H. L., Lu, K. Y., et al. (2020). Synthesis and characterization of Gd-DTPA/fucoidan/peptide complex nanoparticle and in vitro magnetic resonance imaging of inflamed endothelial cells. *Materials Science & Engineering: C, Materials for Biological Applications*, *114*, Article 111064 Sep. [10.1016/j.msec.2020.111064](https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111064).
- Chigoho, D. M., Bridoux, J., & Hernot, S. (2021). Reducing the renal retention of low-to moderate-molecular-weight radiopharmaceuticals. *Current Opinion in Chemical Biology*, *63*, 219–228. [10.1016/j.cbpa.2021.06.008](https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2021.06.008).
- Correa, L. B., Pádua, T. A., Seito, L. N., Costa, T. E., Silva, M. A., Candéa, A. L., et al. (2016). Anti-inflammatory effect of methyl gallate on experimental arthritis: Inhibition of neutrophil recruitment, production of inflammatory mediators, and activation of macrophages. *Journal of Natural Products*, *79*, 1554–1566. [10.1021/acs.jnatprod.5b01115](https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01115).
- Costa, B., Ilem-Özdemir, D., & Santos-Oliveira, R. (2019). Technetium-99 m metastable radiochemistry for pharmaceutical applications: Old chemistry for new products. *Journal of Coordination Chemistry*, *72*, 1759–1784. [10.1080/00958972.2019.1632638](https://doi.org/10.1080/00958972.2019.1632638).
- Dmochowska, N., & Wardill, H. R. (2018). Advances in imaging specific mediators of inflammatory bowel disease. 1–13 doi:10.3390/ijms19082471
- Feehan, K. T., & Gilroy, D. W. (2019). Is resolution the end of inflammation? *Trends in Molecular Medicine*, *25*, 198–214 Epub 2019 Feb 19. [10.1016/j.molmed.2019.01.006](https://doi.org/10.1016/j.molmed.2019.01.006).
- Fletcher, H. R., Biller, R., Ross, A. B., & Adams, J. M. M. (2017). The seasonal variation of Fucoidan within three species of brown macroalgae. *Algal Research*, *22*, 79–86.
- Forero Ramirez, L. M., Gobin, E., Aid-Launais, R., Journe, C., Moraes, F. C., Pictou, L., et al. (2020). Gd(DOTA)-grafted submicron polysaccharide-based particles functionalized with fucoidan as potential MR contrast agent able to target human activated platelets. *Carbohydrate Polymers*, *245*, Article 116457. [10.1016/j.carbpol.2020.116457](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116457).
- Hoekstra, L. T., Graaf, W., de Nibour, G. A. A., Heger, M., Bemmink, R. J., Strieger, B., et al. (2013). Physiological and biochemical basis of clinical liver function tests. *Ann Surg* *257*, 27–36. doi:10.1097/SLA.0b013e31825d5d47.
- Lambie, H., Cook, A. M., Scarsbrook, A. F., Lodge, J. P. A., Robinson, P. J., & Chowdhury, F. U. (2011). Tc 99 m - hepatobiliary iminodiacetic acid (HIDA) scintigraphy in clinical practice. *Clinical Radiology*, *66*, 1094–1105. [10.1016/j.crad.2011.07.045](https://doi.org/10.1016/j.crad.2011.07.045).
- Lee, H. J., Ehlerding, E. B., & Cai, W. (2019). Antibody-based tracers for PET/SPECT imaging of chronic inflammatory diseases. *ChemBiochem: A European Journal of Chemical Biology*, *20*, 422–436. [10.1002/cbic.201800429](https://doi.org/10.1002/cbic.201800429).
- Lin, Y., Qi, X., Liu, H., Xue, K., Xu, S., & Tian, Z. (2020). The anti-cancer effects of Fucoidan: A review of both in vivo and in vitro investigations. *Cancer Cell International*, *20*, 1–14. [10.1186/s12935-020-01233-8](https://doi.org/10.1186/s12935-020-01233-8).
- Luthuli, S., Wu, S., Cheng, Y., Zheng, X., Wu, M., & Tong, H. (2019). Therapeutic effects of Fucoidan: A review on recent studies. *Mar Drugs*, *17*(9), 487. [10.3390/md17090487](https://doi.org/10.3390/md17090487).
- Makarenkova, I. D., Logunov, D. Y., Tukhvatulin, A. I., Semenova, I. B., Zvyagintseva, T. N., Gorbach, V. I., et al. (2012). Sulfated polysaccharides of brown seaweeds are ligands of toll-like receptors. *Biochemistry Moscow Supplement Series*, *6*, 75–80. [10.1134/S1990750812010118](https://doi.org/10.1134/S1990750812010118).
- Manikandan, R., Parimalanandhini, D., Mahalakshmi, K., Beulaja, M., Arumugam, M., Janarthanan, S., et al. (2020). Studies on isolation, characterization of Fucoidan from brown algae *Turbinaria decurrens* and evaluation of its in vivo and in vitro anti-inflammatory activities. *International Journal of Biological Macromolecules*, *160*, 1263–1276. [10.1016/j.ijbiomac.2020.05.152](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.05.152).
- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, *454*, 428–435. [10.1038/nature07201](https://doi.org/10.1038/nature07201).
- Panicker, S. R., Mehta-D'souza, P., Zhang, N., Klopocki, A. G., Shao, B., & McEver, R. P. (2017). Circulating soluble P-selectin must dimerize to promote inflammation and coagulation in mice. *Blood*, *130*(2), 181–191 Jul 13. [10.1182/blood-2017-02-770479](https://doi.org/10.1182/blood-2017-02-770479).
- Phull, A. R., Majid, M., Haq, I., Khan, M. R., & Kim, S. J. (2017). In vitro and in vivo evaluation of anti-arthritis, antioxidant efficacy of Fucoidan from *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar. *International Journal of Biological Macromolecules*, *97*, 468–480. [10.1016/j.ijbiomac.2017.01.051](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.051).
- Saboural, P., Chaubet, F., Rozzet, F., Al-Shoukr, F., Azzouza, R. B., Bouchemal, N., et al. (2014). Purification of a low molecular weight fucoidan for SPECT molecular imaging of myocardial infarction. *Marine Drugs*, *12*, 4851–4867. [10.3390/md12094851](https://doi.org/10.3390/md12094851).
- Sumaya, A. S., & Kurup, G. M. (2021). In vitro anti-inflammatory potential of marine macromolecules cross-linked bio-composite scaffold on LPS stimulated RAW 264.7 macrophage cells for cartilage tissue engineering applications. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, *32*, 1040–1056. [10.1080/09205063.2021.1899590](https://doi.org/10.1080/09205063.2021.1899590).
- Tsai, M. Y., Yang, W. C., Lin, C. F., Wang, C. M., Liu, H. Y., Lin, C. S., et al. (2021). The ameliorative effects of Fucoidan in thioacetamide-induced liver injury in mice. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *26*. [10.3390/molecules26071937](https://doi.org/10.3390/molecules26071937).
- Vigne, J., Cognet, T., Guedj, K., Morvan, M., Merceron, O., Louedec, L., et al. (2020). Early detection of localized immunity in experimental autoimmune myocarditis using ^{99m}Tc[Fucoidan] SPECT. *Molecular Imaging Biology*, *22*, 643–652. [10.1007/s11307-019-01420-8](https://doi.org/10.1007/s11307-019-01420-8).
- Wang, J., Geng, L., Yue, Y., & Zhang, Q. (2019). *Use of fucoidan to treat renal diseases: A review of 15 years of clinic studies*. Vol. 163 (1 ed.). Amsterdam, Netherlands: Elsevier Inc.
- Wu, N., Li, Z., Wang, J., Geng, J., Yue, Y., Deng, Z., et al. (2021). Low molecular weight fucoidan attenuating pulmonary fibrosis by relieving inflammatory reaction and progression of epithelial-mesenchymal transition. *Carbohydrate Polymers*, *273*, Article 118567. [10.1016/j.carbpol.2021.118567](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118567).
- Y, Yao, & Yim, E. K. F. (2021). Fucoidan for cardiovascular application and the factors mediating its activities. *Carbohydrate Polymers*, *270*, Article 118347. [10.1016/j.carbpol.2021.118347](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118347).
- Yu, H. H., Chengchuan, E. K. O., Chang, C. L., Yuan, K. S. P., Wu, A. T. H., Shao, Y. S., et al. (2018). Fucoidan inhibits radiation-induced pneumonitis and lung fibrosis by reducing inflammatory cytokine expression in lung tissues. *Marine Drugs* *2018*, *16*, 1–14. [10.3390/md16100392](https://doi.org/10.3390/md16100392).
- Zhang, H., Qu, H., He, Q., Gao, L., Zhang, H., Wang, Y., et al. (2021). Thrombus-targeted nanoparticles for thrombin-triggered thrombolysis and local inflammatory microenvironment regulation. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, *339*, 195–207 Nov 10. [10.1016/j.jconrel.2021.06.043](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.06.043).
- Zheng, K. H., Kuiser, Y., Poel, E., Verberne, H., Aerts, J., Rouzet, F., et al. (2019). ^{99m}Tc-Fucoidan as diagnostic agent for P-selectin imaging: first-in-human evaluation (Phase I). *Atherosclerosis*, *287* Article e143. [10.1016/j.atherosclerosis.2019.06.425](https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2019.06.425).

ANEXO D – Comprovação de aceite do artigo científico

Dear Dr Costa,

Thank you for publishing your article in Food Hydrocolloids for Health . Prof. Dr. Santos-Oliveira completed the Rights and Access Form for your article *Using Pure Fucoidan and Radiolabeled Fucoidan (99mTc-Fucoidan) as a New Agent for Inflammation Diagnosis and Therapy* on December 20, 2021.

The Order Summary is attached to this email. A copy of the Order Summary is also sent to all co-authors for whom we have contact details.

Your article is free for everyone to read online at <https://doi.org/10.1016/j.fhfh.2021.100049>

If you have any questions, please do not hesitate to contact us. To help us assist you, please quote our article reference FHHH_100049 in all correspondence.

Now that your article has been accepted, you will want to maximize the impact of your work. Elsevier facilitates and encourages authors to share their article responsibly. To learn about the many ways in which you can share your article whilst respecting copyright, visit: www.elsevier.com/sharing-articles.

Kind regards,
Elsevier Researcher Support