

ANA PAULA RESSETTI ABUD

**ATIVIDADE BIOLÓGICA DE DIVERSOS CARBOIDRATOS
SOBRE MACRÓFAGOS “in vitro”**

Monografia de conclusão de curso realizada durante o período de agosto de 2001 a abril de 2002, no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná. Autora: Ana Paula Ressetti Abud. Orientador: Professor Dr. Marcello Iacomini.

Curitiba 2002

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por estar sempre presente e por me dar força e confiança durante todos os momentos da minha vida!

Aos meus pais Brasília e Angela por estarem sempre presente na minha vida, me ajudando a crescer e me fazendo, acima de tudo uma pessoa feliz! Agradeço por todo amor e compreensão, sem eles, com certeza não seria o que sou hoje! Agradeço ao meu irmão Neto, por todo carinho, amor e amizade. Obrigada por tudo, amo vocês!

Ao meu namorado Rodrigo, por estar sempre presente, nos meus bons e maus momentos e por me fazer feliz! Agradeço por todo amor, apoio e compreensão, amo você!

Ao professor Marcello, por seus ensinamentos e lições, orientação e amizade.

Ao Departamento de Bioquímica, por me conceder o espaço para o desenvolvimento deste trabalho e ao CNPq pelo apoio financeiro durante a minha iniciação científica.

Agradeço aos camundongos, pois sem eles este trabalho não seria possível de ser realizado e aos funcionários do biotério, por toda ajuda e atenção.

À Patrícia, por me ensinar a trabalhar com atividade biológica, me acompanhar nos experimentos, e me ajudar a compreender as dificuldades deste trabalho sem desistir, agradeço também pela sua amizade e dedicação.

À Juliana e a Fabíola por terem me trazido ao departamento de Bioquímica e pela grande amizade que cultivamos até hoje!

Aos meus colegas de laboratório e do departamento, por toda a amizade, companheirismo e intercâmbio de idéias.

Ao laboratório de Oxidações Biológicas, por ceder material e equipamentos necessários para o desenvolvimento deste trabalho .

À Mariana, por todas as idéias, e ajuda durante meus experimentos.

Às minhas grandes e verdadeiras amigas que fiz durante a faculdade, Carolina, Fernanda, Luciana e Mariana pela amizade sincera, compreensão e companheirismo. É muito bom saber que tenho amigas como vocês, com quem posso dividir todas as minhas alegrias e tristezas. Amigas, espero que nossa

amizade continue para sempre! Agradeço também aos meus grandes amigos Ricardo, Rodrigo e João Vicente, que estiveram sempre presente durante a faculdade e espero que continuem durante muito tempo da minha vida!

Enfim, agradeço à todos, que de uma maneira ou de outra contribuíram para que este trabalho fosse realizado, Muito Obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	vi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Sistema Imunológico.....	1
1.1.1 Resposta Imunológica.....	2
1.1.2 Células do Sistema Imunológico.....	3
1.2 Macrófagos.....	4
1.2.1 Produção de Metabólitos de Oxigênio.....	5
1.2.2 Produção de Metabólitos de Nitrogênio.....	6
1.3 Carboidratos.....	7
1.3.1 Oligossacarídeos e Polímeros de Baixa Massa Molecular.....	7
1.3.2 Polissacarídeos.....	8
2. OBJETIVOS	10
3. METODOLOGIA	10
3.1 Polímeros Utilizados.....	10
3.2 Ensaio de Atividade Celular.....	12
3.2.1 Ensaio para Ativação de Macrófagos.....	12
3.2.2 Ensaio de Viabilidade Celular (MTT).....	13
3.2.3 Ensaio para dosagem de Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂) produzido por Macrófagos Ativados.....	14
3.2.4 Ensaio para dosagem de Óxido Nítrico (NO) produzido por Macrófagos Ativados.....	15
3.2.5 Medida da quantidade de Proteína.....	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	17
4.1 Viabilidade Celular.....	17
4.2 Resultado da produção de H ₂ O ₂ por Macrófagos “in vitro”.....	19
4.3 Resultado da produção de NO por Macrófagos “in vitro”.....	29
5. CONCLUSÕES	35
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

LISTA DE GRÁFICOS E TABELAS

GRÁFICO 1: Viabilidade Celular.....	17
GRÁFICO 2: Produção de peróxido de hidrogênio por <i>C. ibitipocae</i> nativa.....	27
GRÁFICO 3: Produção de peróxido de hidrogênio por <i>C. ibitipocae</i> sulfatada.....	27
GRÁFICO 4: Produção de peróxido de hidrogênio por <i>P. niruri</i> 5%.....	28
GRÁFICO 5: Produção de óxido nítrico produzido pelo polissacarídeo nativo de <i>C. ibitipocae</i>	29
GRÁFICO 6: Produção de óxido nítrico produzido pelo polissacarídeo de <i>C. ibitipocae</i> sulfatado quimicamente.....	30
GRÁFICO 7: Produção de óxido nítrico produzido pelo polissacarídeo nativo de <i>C. furcata</i>	31
GRÁFICO 8: Produção de óxido nítrico produzido pela fração oligossacarídica obtida de <i>P. niruri</i> 5%.....	32
TABELA 1: Resultados dos experimentos de viabilidade celular em porcentagem.....	18
TABELA 2: Produção de H ₂ O ₂ por macrófagos tratados com galactoglucomanana nativa de <i>Cladonia ibitipocae</i> (CI) nas concentrações de 50, 100 e 500µg/mL	20
TABELA 3: Produção de H ₂ O ₂ por macrófagos tratados com galactoglucomanana sulfatada de <i>Cladonia ibitipocae</i> (CIS) nas concentrações de 10 e 100µg/mL	20
TABELA 4: Produção de H ₂ O ₂ por macrófagos tratados com a fração etanólica 5% extraída de <i>Phyllanthus niruri</i> - (PN 5%) na concentração de 500µg/mL.....	22
TABELA 5: Produção de H ₂ O ₂ por macrófagos tratados com a fração alcalina 2% extraída de <i>Agaricus blazei</i> (AB 2%) na concentração de 500µg/mL.....	23
TABELA 6: Produção de H ₂ O ₂ por macrófagos tratados com o sobrenadante etanólico extraído de <i>Spondias cytherea</i> (SC) nas concentrações de 10 e 100µg/mL	24
TABELA 7: Produção de H ₂ O ₂ por macrófagos tratados com o polissacarídeo do exudato vegetal de <i>Anadenanthera colubrina</i> (AC) na concentração de 100µg/mL	25

TABELA 8: Produção de H ₂ O ₂ por macrófagos tratados com o polissacarídeo degradado do exudato vegetal de <i>Livistona chinensis</i> (LC DGD) nas concentrações de 10, 50 e 100µg/mL	26
TABELA 9: Tabela comparativa dos resultados obtidos.....	34

RESUMO

Estudos recentes têm demonstrado que polissacarídeos isolados de plantas, fungos liquenizados e frutos podem apresentar algum tipo de atividade biológica, como por exemplo, atividade bactericida (COHN, 1978), antiviral (DAMONTE *et al.*, 1994), anticoagulante (NISHINO *et al.*, 1991) e antitumoral (MA *et al.*, 1991). Também tem sido estudada a atividade biológica de oligossacarídeos, como exemplo a heparina, o qual apresentam atividade anticoagulante e antitrombótica (PANGRAZZI *et al.*, 1985). Neste trabalho foram utilizados vários polímeros de origens diferentes e com características químicas diversificadas para tornar possível a verificação da diferença de estrutura na atividade biológica. Os experimentos foram realizados com objetivo de verificar a viabilidade celular e a produção de metabólitos pelos macrófagos, os quais indicam a ativação celular. Os polímeros utilizados foram a galactoglucomanana nativa e sulfatada de *Cladonia ibitipocae*, a fração etanólica 5% extraída de *Phyllanthus niruri*, a fração alcalina 2% extraída de *Agaricus blazei*, o sobrenadante etanólico obtido de *Spondias cytharea*, a arabinogalactana extraída do exudato vegetal de *Anadenanthera colubrina* e a arabinoxilana ácida obtida da degradação do exsudato vegetal de *Livistona chinensis*. Para os experimentos biológicos, as células foram obtidas por lavagem da cavidade peritoneal de camundongos *Mus musculus* e então foram centrifugadas, contadas e plaqueadas. Após o plaqueamento as células foram incubadas por 2 horas em atmosfera de CO₂ 5% para que ocorresse a adesão. Após este período, os poços foram lavados com PBS morno para que as células não aderidas fossem retiradas e então foram adicionadas as soluções com as drogas. Para o experimento de produção do H₂O₂, durante a incubação das células juntamente com as drogas, foram retiradas alíquotas nos tempos 0, 30, 90 e 150 minutos para que fosse possível a quantificação do H₂O₂ formado. O resultado obtido foi diferente em cada material utilizado, sendo que em alguns materiais observou-se um aumento da produção deste metabólito proporcional às concentrações das drogas utilizadas e ao tempo de incubação (*C. ibitipocae* nativa e sulfatada e *P. niruri* 5%), já em outros materiais utilizados observou-se uma diminuição desta produção com o passar do tempo de experimento (*A. blazei* 2% e *S. cytharea*). Alguns dos materiais utilizados demonstraram uma inibição da produção deste metabólito causada pelo polímero (*C. ibitipocae* nativa, *A. colubrina* e *L. chinensis* degradada). Para os experimentos para a medida da produção de NO, foram utilizados os polímeros que apresentaram estimulação dos macrófagos para a produção de H₂O₂, e mais o polissacarídeo da galactoglucomana nativa de *Cladonia furcata*. O polissacarídeo nativo de *C. ibitipocae* não apresentou aumento da produção de NO em nenhuma das concentrações utilizadas, já o material sulfatado apresentou estimulação na concentração de 200 µg/mL. O material nativo de *C. furcata* apresentou uma alta estimulação na concentração de 10 µg/mL, sendo que nas maiores concentrações utilizadas essa estimulação não foi mais demonstrada. Este dado parece indicar uma inibição da produção de NO pelo polissacarídeo quando este é utilizado em altas concentrações. O oligossacarídeo de *P. niruri* 5%, como o material de *C. ibitipocae* nativa não apresentou aumento da produção de NO em nenhuma das concentrações utilizadas. A principal conclusão retirada deste trabalho foi que os polímeros que mais estimularam os macrófagos, tanto para a produção de H₂O₂ como de NO sem causar inibição desta atividade foram o polissacarídeo sulfatado de *C. ibitipocae* e o oligossacarídeo de *P. niruri* 5%.

1. INTRODUÇÃO

Muitos polissacarídeos têm demonstrado atividade biológica, desde que Bradner *et al.* em 1958 apresentaram alguns experimentos descrevendo a atividade antitumoral de estruturas polissacarídicas da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*. Posteriormente, inúmeros polissacarídeos de várias fontes têm se mostrado biologicamente ativos, exibindo vários tipos de atividades biológicas, entre elas atividade bactericida (COHN, 1978), antiviral (DAMONTE *et al.*, 1994), anticoagulante (NISHINO *et al.*, 1991) e antitumoral (MA *et al.*, 1991). Esta atividade pode ser demonstrada após a administração destes materiais em culturas de células como, por exemplo, macrófagos e linfócitos. Esta incubação com as células pode torná-las ativadas e esta ativação pode ser evidenciada pela produção de metabólitos característicos, por exemplo, intermediários reativos de oxigênio (ROI) e nitrogênio (RNI). Estes metabólitos quando produzidos, são os responsáveis principalmente pelas atividades bactericida e antitumoral de macrófagos (ROITT *et al.*, 1999). Como estas atividades fazem parte do sistema responsável pela manutenção da integridade dos organismos, o sistema imunológico, faz-se necessário um relato geral deste sistema, para tornar possível o melhor entendimento destes processos.

1.1 Sistema Imunológico

Os organismos vivos são expostos a uma grande quantidade de agentes externos, chamados antígenos, os quais podem lhes causar danos. O sistema imunológico auxilia no combate a estes agentes, fazendo com que essas agressões não causem danos permanentes. Então, a função primária do sistema imunológico é eliminar os agentes infecciosos e minimizar o dano que estes possam causar ao organismo (ROITT *et al.*, 1999).

1.1.1 Resposta Imunológica

Para que ocorra uma resposta imunológica, é necessário, primeiramente, o reconhecimento do patógeno, para que depois se inicie uma reação para erradicá-lo. Cada patógeno exige um tipo de resposta imunológica específica, sendo que as mais importantes são neutralização, fagocitose e reações citotóxicas (ROITT *et al.*, 1999).

O processo de neutralização é um mecanismo simples, no qual os anticorpos podem combater os patógenos simplesmente por se ligarem a estes agentes. Por exemplo, um anticorpo ligado à camada protéica de um certo vírus impede a ligação e a fixação deste às células hospedeiras (ROITT *et al.*, 1999).

A fagocitose consiste no englobamento do material estranho através dos pseudópodos que fagócitos, como macrófagos e neutrófilos, lançam para apreender o agente agressor, que então fica endocitado em um vacúolo no citoplasma, este vacúolo é chamado de fagossomo. Uma vez no interior do fagossomo, os invasores sofrem a ação de vários constituintes destas células para que ocorra a inativação do antígeno. Por fim os lisossomos, os quais ficaram internalizados no fagossomo, liberam enzimas digestivas no antígeno as quais o digerem (ROITT *et al.*, 1999).

As reações citotóxicas são sistemas efetores dirigidos contra a célula como um todo, geralmente quando estas são muito grandes para sofrerem fagocitose. O reconhecimento da célula alvo se dá por meio de anticorpos específicos, ligados à superfície celular, ou através de células T e seus receptores específicos. Nestas reações, ao contrário do que acontece na fagocitose, as células alvo serão lisadas em suas membranas externas. Algumas células citotóxicas podem ainda emitir certos sinais para as células-alvo que, então, inicia um programa de autodestruição, conhecido como apoptose (ROITT *et al.*, 1999).

1.1.2 Células do Sistema Imunológico

As respostas imunes são mediadas por uma variedade de células e por moléculas solúveis que estas células secretam (ROITT *et al.*, 1999). A seguir estão listadas as principais células e moléculas envolvidas nas reações imunológicas.

a) Fagócitos: Internalizam e degradam antígenos e microorganismos patogênicos. Este grupo é composto pelos macrófagos (importante na apresentação dos antígenos ao linfócito T) e pelos neutrófilos, que constituem a maioria dos leucócitos sanguíneos, os quais migram para o sangue em resposta a certos estímulos (ROITT *et al.*, 1999).

b) Linfócitos: Responsáveis pelo reconhecimento específico dos antígenos e pelo desencadeamento das respostas imunes adaptativas. Este grupo é constituído de dois tipos de células, os linfócitos B e os linfócitos T.

b1) Linfócitos B: São aqueles responsáveis pela produção dos anticorpos (imunoglobulinas).

b2) Linfócitos T: Este grupo de células é constituído de várias subpopulações com funções variadas. Uma das subpopulações interage com as células B auxiliando-as na divisão e diferenciação celular e na produção de anticorpos; outra interage com os fagócitos mononucleares auxiliando-os na destruição de patógenos intracelulares, sendo esta atividade conhecida como citotóxica. Desta forma estas células são chamadas então de linfócitos T citotóxicos.

Para que ocorra uma resposta imune faz-se necessário a comunicação entre as células constituintes deste sistema e esta emissão de sinais se torna possível pela existência de moléculas peptídicas ou protéicas chamadas citoquinas, que determinam as interações entre as células. Dentre as citoquinas, as mais importantes são os interferons (INF) e as interleucinas (ROITT *et al.*, 1999).

1.2 Macrófagos

Os macrófagos estão envolvidos em todas as fases das respostas imunes. Como já foi discutido, inicialmente eles atuam como um mecanismo protetor rápido capaz de responder antes que ocorra a amplificação da resposta, mediada pela célula T. Posteriormente os macrófagos podem tomar parte na iniciação da ativação das células T através do processamento e da apresentação de antígenos (ROITT *et al.*, 1999).

Finalmente eles são importantes como células inflamatórias, tumoricidas e microbicidas na fase efetora ou citotóxica da resposta celular, após a ativação mediada pelas citocinas liberadas pelas células T. Estas citocinas correspondem a uma resposta das células T ao antígeno (ROITT *et al.*, 1999). Isso demonstrou que a ativação dos macrófagos envolve um estímulo antígeno-específico por um mecanismo que levará a uma atividade microbicida aumentada. Esta ação citotóxica pode ser verificada se houver uma estimulação externa, como foi constatada quando a estes foram aplicadas soluções de caseinato ou tioglicolato (KARNOVSKI *et al.*; 1978). Existem vários polissacarídeos que apresentam ação estimulatória comprovada, como por exemplo a dextrana, uma α -D-glucana unida por ligações 1→6, que quando aplicada às culturas de macrófagos, ativam estas células tornando-as capazes de inativar células tumorais (ARTURSSON *et al.*, 1987).

O macrófago é considerado ativado quando apresenta um aumento na sua atividade fagocítica e microbicida, situação causada pelo contato com agentes estranhos como bactérias, vírus e parasitas (KARNOVSKY *et al.*, 1978; COHN, 1978; NORTH *et al.*; 1978) ou com citocinas produzidas pelos linfócitos T citotóxicos (ROITT *et al.*; 1999). As principais características observadas pelo macrófago ativado são: uma grande atividade respiratória (aumento do "burst" respiratório), aumento na sua taxa de migração e aumento na taxa de metabolização da glucose (KARNOVSKI *et al.*; 1978). A ativação dos macrófagos é um fenômeno complexo e as razões para esta complexidade são as seguintes: macrófagos ativados podem apresentar inúmeras funções efetoras diferentes como, por exemplo, indução da inflamação e na reorganização e reparo tecidual e ação citotóxica ocasionada pela produção de metabólitos, o que leva a uma atividade microbicida e tumoricida (MIZUNO *et.*

al., 2000). A função ativada do macrófago pode depender não só dele e sim de uma mistura de citocinas e estímulos inflamatórios aos quais o macrófago é exposto.

Os macrófagos quando ativados produzem alguns metabólitos característicos os quais também são responsáveis pela ação efetora (citotóxica) do sistema imunológico. Dentre estes compostos pode-se citar os compostos derivados de oxigênio como o ânion superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e os derivados de nitrogênio como o óxido nítrico (NO) (OKASAKI *et al.*, 1995; DING *et al.*, 1988).

Existem sugestões indicando que a ativação dos macrófagos ocorre em etapas e exige estímulos seqüenciais que incluem citocinas, endotoxinas e vários mediadores e reguladores da inflamação. Nos estudos laboratoriais “in vitro”, mais de um sinal se faz necessário para induzir uma função particular. Por exemplo, os macrófagos de camundongos precisam ser estimulados por $INF\gamma$, o qual apresenta ação ativadora sobre a enzima óxido nítrico sintase (ZAMUNER *et al.*; 2001), e pela endotoxina LPS (lipopolissacarídeos de membrana bacteriana) a fim de produzirem níveis mais elevados de óxido nítrico (MONCADA *et al.*, 1994), e por acetato de miristato de forbol (PMA), para que produzam níveis mais elevados de peróxido de hidrogênio (COSTA ROSA *et al.*, 1995).

1.2.1 Produção de Metabólitos de Oxigênio

A geração de metabólitos de oxigênio deve-se à rápida ativação do complexo da enzima NADPH oxidase que oxida a coenzima NADPH e os elétrons resultantes desta oxidação reduzem o oxigênio a ânions superóxidos: Este complexo enzimático é composto de várias subunidades e sua reação é complexa. A membrana dos fagócitos em repouso contém um citocromo fagócito-específico, o citocromo b558. Este citocromo é composto de duas cadeias, de tamanhos diferentes, as quais são codificadas por genes em cromossomos diferentes. Quando ocorre a fagocitose, várias proteínas do citosol tornam-se fosforiladas e dirigem-se para a membrana se ligando então ao citocromo b558. O complexo formado age como uma enzima, catalizando a

reação de oxidação da coenzima NADPH e, portanto ativando a produção de radicais de oxigênio (ROITT *et al.*; 1999).



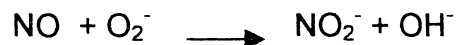
Estes ânions superóxido, em seguida são convertidos em peróxido de hidrogênio, pela ação da enzima superóxido dismutase (PICK & KEISARI, 1980), podendo ocorrer também dismutação espontânea (ROBBINS *et al.*, 1996).



1.2.2 Produção de Metabólitos de Nitrogênio

O óxido nítrico é gerado a partir do aminoácido L-arginina pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), sendo este mecanismo dependente da coenzima NADPH (MONCADA *et al.*, 1994).

A NOS macrófagica é induzida quando os macrófagos são ativados por citocinas, por exemplo, interferon γ . O óxido nítrico dos macrófagos, que atua como um radical livre, é citotóxico para determinados microorganismos e células tumorais. Além disso reage com o ânion superóxido formando o poderoso oxidante dióxido de nitrogênio (nitrito) e o radical fortemente reativo OH^- (ROBBINS *et al.*, 1996).



Quanto maior a produção de ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico maior será atividade microbicida e antitumoral do macrófago (ADACHI *et al.*, 1992; ROBBINS *et al.*, 1996; RUSSO *et al.*, 1989).

1.3 Carboidratos

Os carboidratos são as moléculas mais abundantes na face da Terra. A fotossíntese é responsável por converter mais de 100 milhões de toneladas de CO₂ e H₂O em celulose e outros produtos vegetais. Certos carboidratos, como a sacarose e o amido são a base da nutrição humana na maior parte do mundo e a oxidação de carboidratos é a principal via metabólica liberadora de energia em muitas células não fotossintéticas (LEHNINGER *et al.*, 1995).

Polímeros insolúveis de carboidratos apresentam função estrutural e de proteção nas paredes das células bacterianas e de vegetais e nos tecidos conjuntivos de animais (LEHNINGER *et al.*, 1995).

Os carboidratos são poliidroxialdeídos ou poliidroxicetonas, ou substâncias que liberam esses compostos por hidrólise. Existem, segundo o seu tamanho, três classes principais de carboidratos: monossacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos (LEHNINGER *et al.*, 1995).

Aqui, serão descritos os oligossacarídeos e polissacarídeos, os quais, juntamente com os macrófagos, foram os objetos de estudo deste trabalho.

1.3.1 Oligossacarídeos e Polímeros de Baixa Massa Molecular

Oligossacarídeos são polímeros de baixa massa molecular, compostos por poucas unidades monossacarídicas unidas entre si por uma ligação O-glicosídica. Um polímero de baixa massa molecular, que tem sido de grande interesse científico, é a heparina. As suas propriedades biológicas que mais despertam interesse são as relacionadas com a facilitação da circulação sanguínea bem como atividade anticoagulante e antitrombótica (PANGRAZZI *et al.*, 1985).

Outra informação interessante relacionada a este polímero é a sua propriedade de atenuar a ação de certos vírus, entre eles o da imunodeficiência adquirida (HIV) (STONE *et al.*, 1998). Este é um exemplo de polímeros de baixa massa molecular com propriedades terapêuticas. Dados como estes que levam ao grande interesse atual pela atividade biológica de oligossacarídeos e polímeros de baixa massa molecular.

1.3.2 Polissacarídeos

A maioria dos carboidratos encontrados na natureza ocorrem como polissacarídeos, polímeros de alta massa molecular. Os polissacarídeos diferem entre si na identidade de suas unidades monossacarídicas e no tipo de ligação que as une, no comprimento de suas cadeias e no grau de ramificação das mesmas (LEHNINGER *et al.*, 1995).

Entre esses polissacarídeos podem-se destacar os extraídos de plantas, fungos e fungos liquenizados. Como exemplo podem ser citados, polissacarídeos extraídos de plantas, como uma β -galactomanana extraída da *Aloe vera* (babosa), que apresenta atividade antiinflamatória e ativação de células do sistema imunológico, como macrófagos e linfócitos (DAVIS *et al.*, 1994), polissacarídeos extraídos de fungos como por exemplo a β -glucana (1 \rightarrow 4), (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6) extraída do fungo *Coriolus versicolor* (cogumelo cauda de peru) que apresenta atividade imunológica e antitumoral (COLLINS *et al.*, 1997) e a α -glucana (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4), extraída do fungo liquenizado *Ramalina celastri* que apresenta atividade estimulante de macrófagos, tanto "in vivo" como "in vitro" (STUELP-CAMPELO *et al.*, 2002).

Os polímeros que atuam no organismo compõem uma classe de drogas conhecidas como agentes modificadores da resposta biológica (SCHULTZ *et al.*, 1977; KIHU *et al.*, 1992; WILLIAMS *et al.*, 1992; BOHN & BeMILLER, 1995). Existe a possibilidade de que algumas β -glucanas apresentem receptores específicos nas células de defesa do organismo humano (ADACHI *et al.*, 1992) o que explicaria sua grande atividade biológica, e é o que leva ao grande interesse no estudo deste polissacarídeo.

Os mecanismos de ação dessas moléculas não são totalmente conhecidos. O que se sabe é que o mecanismo de ação responsável pela atividade antineoplásica sugere a hipótese de polissacarídeos estarem influenciando imunologicamente o hospedeiro, o que não elimina a possibilidade de uma ação direta do polissacarídeo sobre a célula tumoral (WHISTLER *et al.*, 1976; MA *et al.*, 1991; BOHN & BeMILLER, 1995).

O provável modo de imunopotencialização ocasionado por estas substâncias envolve a ativação de macrófagos citotóxicos, de células T "helper"

e de células "natural killer", a promoção de diferenciação de células T, resposta proliferativa de células mononucleares periféricas, liberação estimulada de citocinas, tais como interferons e interleucinas, e indução da atividade fagocítica de neutrófilos. Já foi demonstrado também que β -glucanas estimulam diretamente a geração de metabólitos intermediários de oxigênio e nitrogênio (TOKURA *et al.*, 1987; MONCADA *et al.*, 1994; BOHN & BeMILLER, 1995).

Nos casos de células tumorais, as quais proliferam tão rapidamente que macrófagos não ativados não conseguem destruí-las, a produção de macrófagos estimulados (ou ativados) poderia deter o crescimento do tumor. Por outro lado, tem sido demonstrado que algumas glucanas podem resgatar os estados de imunossupressão, o que sugere um potencial uso coadjuvante no tratamento quimioterápico. Assim, o desenvolvimento de agentes capazes de estimular o sistema imune e a proliferação e atividade de granulócitos e macrófagos deve ser enfatizada (WILLIAMS *et al.*, 1992; BOHN & BeMILLER 1995).

Alguns polissacarídeos, quando modificados quimicamente, podem apresentar sua atividade estimulatória aumentada ou diminuída. Por exemplo, quando são retirados radicais metil ou adicionados radicais sulfato, a atividade biológica das glucanas é modificada (TOKURA *et al.*, 1987).

O presente trabalho concentrou-se principalmente na resposta imunológica de reações citotóxicas originadas por diferentes carboidratos.

2. OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi avaliar atividade biológica de diversos carboidratos, entre eles frações oligossacarídicas e polissacarídeos, em macrófagos de camundongo “in vitro”, bem como avaliar a viabilidade destas células após o tratamento com estes polímeros.

3. METODOLOGIA

3.1 Polímeros utilizados

Foram utilizados vários polímeros com diferentes estruturas químicas, isso para que fosse possível verificar se estas estruturas apresentavam atividade biológica diferenciada. Estes polímeros quimicamente diversificados foram extraídos e purificados de produtos naturais (plantas, fungos liquenizados e frutos) neste laboratório como objeto de estudo de várias teses de mestrado e doutorado, constituindo um vasto material para o estudo de atividade biológica.

Os materiais utilizados neste estudo foram:

1. Extrato bruto de *Agaricus blazei* (cogumelo do Sol), obtido após extração com KOH 2%. Foi utilizada esta fração 2% devido ao maior rendimento obtido. Após análise da composição monossacarídica deste material verificou-se a predominância de glucose, seguida de fucose, arabinose e manose na proporção molar de 81,3:12,4:4,7:1,6, respectivamente.
2. Galactoglucomanana nativa e sulfatada quimicamente de *Cladonia ibitipocae*. A caracterização química do material nativo revelou uma galactoglucomanana, com proporções molares de 35:2:60 (WORANOVICZ, *et al.*, 1999). A dosagem dos grupos sulfato do material modificado quimicamente foi realizada segundo método descrito por O' Neill (1955), fornecendo um grau de substituição (D.S.) de 1,29, indicando que a sulfatação foi bem eficiente, ou seja, a molécula usada nos experimentos biológicos aqui citados apresenta uma grande quantidade de radicais sulfato inseridos artificialmente (MARTINICHEN *et al.*; 2000).

3. Galactoglucomanana nativa extraída do fungo liquenizado *Cladonia furcata*. A análise química deste polissacarídeo o caracterizou como sendo uma galactoglucomanana apresentando as proporções molares de 42:3:55 (WORANOVICZ, 1999).
4. Fração oligossacarídica extraída da planta *Phyllanthus niruri* (quebra-pedra). Primeiramente esta planta foi submetida a uma extração com MeOH:H₂O (4:1), e a partir deste extrato bruto foram feitas várias colunas cromatográficas, utilizando como eluente uma mistura água:etanol nas seguintes proporções: 5%, 10%, 15%, 20%, 25% e 50%. A fração escolhida para o trabalho foi a fração etanólica 5% devido ao seu maior rendimento. Analisando sua composição monossacarídica, após hidrólise, foi verificada a presença de inositol, glucose, arabinose, treitol, galactose, xilose, manose, ramnose e eritritol na proporção molar de 41:25:17:10:2:1.5:2:1:0.5, respectivamente (SERRATO *et al.*, 2000).
5. Sobrenadante etanólico obtido da polpa da fruta *Spondias cytherea* (Cajá). Este material primeiramente foi liofilizado e pesado, obtendo-se 35,96 g. Foram feitas várias extrações seqüenciais (Clorofórmio – Metanol (2:1); acetona; etanólica; aquosa e KOH 2%). A fração aquosa foi submetida a uma precipitação etanólica (3 volumes de etanol) e o sobrenadante desta fração é que foi utilizado nos experimentos biológicos. Este material é constituído basicamente de oligossacarídeos e a análise da sua composição monossacarídica demonstrou a presença de glucose, arabinose e inositol na proporção molar de 97:1,5:1,5, respectivamente (SERRATO *et al.*; 2001).
6. Arabinogalactana do exsudato vegetal de *Anadenanthera colubrina* (Angico Branco). Ao analisar sua composição monossacarídica verificou-se a presença de arabinose, galactose, ácido glucurônico e ramnose na proporção molar de 64:20:10:6, respectivamente (DELGOBO *et. al.*, 1998).
7. Arabinoxilana obtida do exsudato vegetal de *Livistona chinensis* (Palmeira leque-chinês), após degradação controlada de Smith (GOLDSTEIN *et al.*, 1965). Este procedimento permitiu obter uma molécula mais simples que a original, que é uma heteroxilana ácida ramificada. O polissacarídeo degradado

apresentou uma composição monossacarídica de xilose, arabinose e ácido urônico na proporção molar de 91:5:4, respectivamente, sendo caracterizado então como uma arabinoxilana ácida (MENESTRINA *et al.*, 1996).

3.2 Ensaio de Atividade Celular

3.2.1 Ensaio para Ativação de Macrófagos

Os polímeros anteriormente citados foram testados quanto as suas capacidades em promover uma ativação de macrófagos, a qual foi avaliada pela quantificação da produção de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico por estas células, quando estimuladas "in vitro".

Animais: Os animais utilizados para a obtenção dos macrófagos foram camundongos da espécie *Mus musculus*, albinos suíços, fêmeas, com idade entre 7-10 semanas, os quais foram fornecidos pelo Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

Células: A cavidade peritoneal dos camundongos foi lavada com aproximadamente 5 mL de HBSS (solução salina balanceada de Hank), nos experimentos de produção de H₂O₂ e 5 mL de PBS (solução salina tamponada), nos experimentos de viabilidade celular e produção de NO. As células obtidas foram centrifugadas durante 4 minutos a 3200 rpm, o sobrenadante foi descartado e o precipitado (células) foi ressuspenso em 4 mL de HBSS ou PBS (dependendo do experimento). Foi efetuada então a contagem das células em câmara de Neubauer. A concentração foi ajustada de acordo com o experimento e ao tipo de placa de cultivo utilizada. As células foram incubadas por um período de 2 horas em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C para aderência dos macrófagos e, após este período, a placa com as células aderidas foi lavada 3 vezes com PBS morno (37°C) para remoção das células não aderidas.

3.2.2 Ensaio de Viabilidade Celular (MTT)

Este experimento é usualmente realizado antes de qualquer outro experimento biológico para verificar se as drogas que se pretende utilizar são estimulatórias ou agressivas às células.

Este método é baseado na conversão do sal tetrazólio (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl] 2,5 diphenyl-tetrazoliumbromide) (MTT) em cristais de formazan, produzidos pelas enzimas mitocondriais de células viáveis (MOSMANN *et al.*, 1983).

O MTT foi dissolvido em PBS até a concentração de 5 mg/mL para que então pudesse ser aplicado à cultura de células.

Para este experimento, foram utilizadas placas de 96 poços e as células foram coletadas e ajustadas a uma concentração de 5×10^5 células/mL. As células foram então incubadas como descrito acima. Nas células aderidas foram adicionadas as soluções com moléculas testes e meio de cultura (meio mínimo essencial de Eagle - MEM), cujas concentrações foram iguais ou superiores às utilizadas nos experimentos para a produção de H_2O_2 e NO. Os poços controle continham apenas células e meio de cultura. Após adição das soluções, as células foram novamente incubadas, desta vez por 24 horas. Após este tempo, as células foram lavadas com PBS morno (37°C) e então foi adicionado 10 μ L de MTT e 90 μ L de meio MEM. As células foram colocadas novamente em estufa por 3 horas para que pudesse acontecer a reação de transformação do MTT em cristais de formazan. Quanto maior a quantidade de cristais produzidos mais viáveis estariam as células. Após o período de 3 horas o MTT foi retirado e a cada poço foi adicionado 200 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO), o qual é utilizado para solubilizar os cristais formados e assim tornar possível a leitura espectrofotométrica. Com adição do DMSO, o sobrenadante da maioria dos poços com células tornou-se roxo o que indica a viabilidade celular, pois a maior intensidade da cor indica maior quantidade de formazan formado. A medida foi realizada em leitor de microplaca Biorad, a 550nm.

3.2.3 Ensaio para dosagem de Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) produzido por Macrófagos Ativados

A produção de H₂O₂ por macrófagos tratados foi quantificada pelo método baseado na oxidação do vermelho de fenol pelo H₂O₂, dependente de peroxidase horseradish (PICK & KEISARI, 1980). Neste experimento foram utilizadas placas de cultura com 12 poços e a concentração das células foi ajustada para 3x10⁶ células/mL. O vermelho de fenol foi dissolvido em HBSS e ajustado à concentração de 194µg/mL e a peroxidase foi dissolvida em PBS e ajustada para uma concentração da qual fosse possível retirar uma quantidade que contivesse 15 unidades/mL de enzima. Essas soluções foram adicionadas à cultura de macrófagos (controle negativo). Na maioria dos poços da placa, juntamente com essas soluções foram adicionadas soluções dos polímeros em concentrações determinadas. Os poços com os polímeros foram testados em duas situações, com ou sem acetato de miristato de forbol (PMA) na concentração de 1 µg/mL. Esta substância apresenta ação potencializadora da produção de peróxido de hidrogênio, já que macrófagos “in vitro” precisam de algum tipo de ativador para se mostrarem ativados (BÖGWALD *et al.*, 1982). Nos tempos pré-estabelecidos (0; 30; 90; 150 min) foram retiradas alíquotas de 1 mL de cada poço da placa de cultura para que se pudesse quantificar a produção de H₂O₂ ocasionada por cada polímero.

A cada alíquota retirada foi adicionado 10µL de solução de NaOH 1M para interromper a reação. Então a oxidação do vermelho de fenol foi quantificada em espectrofotômetro por leitura a 610 nm. O resultado foi expresso em nmoles de H₂O₂ produzido. mL⁻¹. mg⁻¹ de proteína (TOKURA *et al.*, 1987).

3.2.4 Ensaio para dosagem de Óxido Nítrico (NO) produzido por Macrófagos Ativados

Óxido nítrico (NO) é um efetor molecular produzido por macrófagos ou outra célula que esteja imunologicamente estimulada. O NO é sintetizado a partir do aminoácido L-arginina pela ação da enzima NO sintase.

Para a medida do NO formado, o método é baseado na rápida transformação do óxido nítrico (NO) em nitrito. Por este método quantifica-se o NO, dosando o nitrito utilizando o reagente de Griess, que é composto por duas soluções as quais interagem com o nitrito formado, reduzindo-o, formando assim um composto possível de mensurar (MONCADA *et al.*, 1991).

As células foram coletadas assepticamente e a concentração foi ajustada para $4-5 \times 10^5$ células/poço e plaqueadas em placas de 96 poços, como já descrito. Foram adicionadas às células as soluções dos polímeros preparadas em meio de cultura (MEM). Em outra série de poços, juntamente com as soluções dos polímeros, foram adicionados lipopolissacarídeos (LPS) e interferon γ ($INF\gamma$) os quais promovem a ativação do macrófago e a formação do NO (MONCADA *et al.*, 1991). A concentração de LPS e $INF\gamma$ foi ajustada para 25ng/mL e 26U/mL, respectivamente. Os poços controle continham apenas células e meio de cultura (controle negativo) e LPS mais $INF\gamma$ (controle positivo). Nestes experimentos foram feitas triplicatas das situações.

As células foram então incubadas por 24 horas. Após o tempo de incubação foi adicionado a 100 μ L do sobrenadante de cada poço a mesma quantidade do reagente de Griess. Este reagente é constituído de duas soluções: a primeira continha naftiletilenodiamino a 0,1% em ácido fosfórico 5% e a segunda, sulfonamina p-aminobenzeno a 1% também em ácido fosfórico 5%. Estas duas soluções foram misturadas na proporção de 1:1 imediatamente antes do uso. Após adição do reagente, esperou-se 10 minutos, para que ocorresse a reação. Depois deste período, o sobrenadante das células apresentou-se lilás, o que indica a reação do reagente de Griess com o nitrito resultante do óxido nítrico. A produção de nitrito foi quantificada em leitor de microplaca Biorad, a 550nm e então foi calculada a concentração de NO utilizando-se uma curva padrão de nitrito de sódio.

3.2.5 Medida da quantidade de Proteína

Após os experimento de produção de H_2O_2 e NO, as células foram lisadas com uma solução de Triton X-100 e a dosagem de proteína de cada poço foi feita pelo método descrito por Bradford (1976). Com isso foi possível relacionar a produção de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico induzida por cada polímero com a quantidade de células presentes em cada teste, homogeneizando os resultados em função da quantidade de proteína de cada poço.

O reativo de Bradford utilizado para a dosagem de proteínas é constituído de uma solução contendo 0,04g de Coomassie Brilliant Blue G-250, 20 mL de etanol, 40 mL de ácido fosfórico 85% e água destilada suficiente para completar 100 mL. Essa é uma solução estoque a qual deverá ser diluída 1 : 4 com água para que possa ser utilizada (BRADFORD, 1976). Como padrão foi utilizada albumina de soro bovino. Este método baseia-se no princípio da formação de um complexo pela ligação do corante (Coomassie Blue) à proteína. Para a dosagem de proteína do experimento de produção do H_2O_2 foi retirada uma alíquota de 100 μ L de cada poço e adicionado 1mL do corante e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 595nm. Para a dosagem do experimento do NO, foi retirada uma alíquota de 10 μ L de cada poço e adicionado 200 μ L do corante. A leitura foi realizada em leitor de microplaca Biorad a 595 nm. A sensibilidade deste método é de 1 a 100 μ g de proteína.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Viabilidade Celular

A metabolização do MTT é uma propriedade de células viáveis e/ou ativadas e consiste na transformação deste composto pelas mitocôndrias viáveis e/ou ativadas das células. A quantidade de cristais de formazam formada é diretamente proporcional ao número de células viáveis e esta quantidade permite distinguir se as células estão mortas, debilitadas, apenas viáveis ou ativadas (MOSMANN *et al.*, 1983). Permite também verificar se algo que foi adicionado ao meio, por exemplo polissacarídeo, pode influenciar na viabilidade celular (SLADOWSKI *et al.*; 1992).

Abaixo será apresentado o gráfico e a tabela com os resultados dos experimentos de viabilidade celular.

Gráfico 1: Comparação da viabilidade celular de células tratadas e células controle

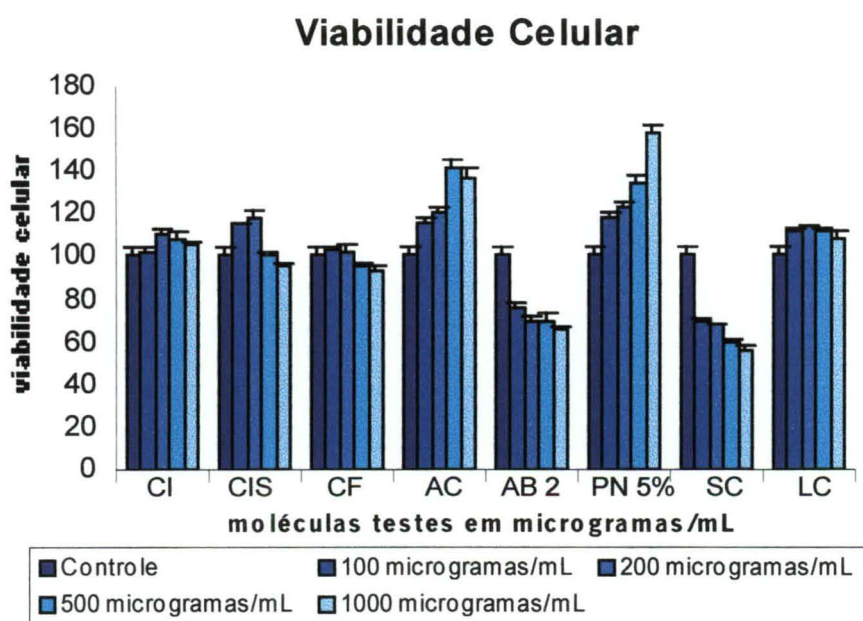


Tabela 1: Resultados dos experimentos de viabilidade celular em porcentagem.

<i>Moléculas Testes</i>	<i>Viabilidade Celular</i>
Controle* ^{&}	100%
CI*	118%±3,87
CIS*	100%±1,67
CF*	96%±1,41
PN 5%*	141%±3,82
AB 2%*	69%±3,74
AC*	134%±3,93
SC*	59%±1,87
LC*	112%±1,71

CI: *C. ibitipocae* nativa; CIS: *C. ibitipocae* sulfatada; CF: *C. furcata*; PN 5%: *P. niruri* 5%; AB 2%: *A. blazei* 2%; AC: *A. colubrina*; SC: *S. cytherea*; LC: *L. chinensis*.

* média e desvio padrão de 3 experimentos independentes; & células controle, sem adição de testes; $p < 0,005$

Os resultados analisados na tabela são os obtidos na concentração de 500µg/mL, que foi a maior concentração utilizada nos experimentos de atividade biológica.

Analisando o gráfico acima, pode-se verificar que algumas moléculas parecem não modificar o metabolismo celular, outras modificam este metabolismo aparentemente ativando ou debilitando as células. A primeira molécula testada foi o polissacarídeo de *C. ibitipocae* nativo (CI) e sulfatado quimicamente (CIS). Seus resultados não apresentam diferença significativa em relação ao controle, isso quer dizer que esta molécula estando nativa ou sulfatada quimicamente não interfere na viabilidade celular. O próximo material utilizado foi o polissacarídeo nativo de *C. furcata* (CF). Os resultados desta molécula são parecidos com os da anterior, com isso, pode-se dizer que os polissacarídeos obtidos dos fungos liquenizados do gênero *Cladonia*, utilizados neste trabalho não alteram a viabilidade celular. Já o polissacarídeo de *A. colubrina* (AC) e a fração oligossacarídica de *P. niruri* (PN 5%) parecem influenciar as células positivamente, causando um estímulo das enzimas mitocondriais, pois os resultados obtidos foram bem maiores que o controle. Mas o polissacarídeo de *A. blazei* (AB 2%) e a fração oligossacarídica de *S. cytherea* (SC) parecem debilitar o metabolismo celular, pois apresentaram

resultados bem menores que o controle. O resultado obtido por *A. blazei* pode ser explicado por esse material ser um extrato bruto, não purificado, podendo apresentar certas estruturas não detectadas na análise química, que podem estar causando agressão celular. A última molécula testada foi o polissacarídeo de *L. chinensis* (LC). Este material apresentou o mesmo perfil das cladonias, com isso pode-se dizer que ele não influencia na viabilidade celular. Como as moléculas obtidas de *Anadenanthera colubrina* e *Phyllanthus niruri* parecem ativar as células, faz-se necessário a realização de testes para medida de metabólitos os quais indicam a ativação do macrófago, por exemplo metabólitos de oxigênio e nitrogênio.

4.2 Resultado da produção de H₂O₂ por Macrófagos “in vitro”

A determinação da produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos foi avaliada em 4 situações diferentes.

- somente as células (controle);
- células + PMA (controle positivo);
- células + polímeros;
- células + polímeros + PMA.

As tabelas a seguir mostrarão os resultados de produção de H₂O₂. Os dados discutidos são os obtidos pelas células que foram estimuladas com PMA, no tempo máximo de 150 minutos, uma vez que os valores obtidos para as células não tratadas por este agente e os obtidos nos tempos menores não mostraram diferenças significativas das células controle.

Os resultados da produção de peróxido de hidrogênio estão representados em nmoles de peróxido.mL⁻¹.mg⁻¹ de proteína.

Tabela 2: Produção de H₂O₂ por macrófagos tratados com galactoglucomanana nativa de *Cladonia ibitipocae* (CI) nas concentrações de 50, 100 e 500µg/mL.

Condição	Controle*	Controle*	CI 50*	CI 50*	CI 100*	CI 100*	CI 500*	CI 500*
Tempo (min)		PMA		PMA		PMA		PMA
0	0	0	0	0	0	0	0	0
30	2,64±3,63	20,74±3,03	0	26,56±3,19	0	16,12±3,52	0	0
90	5,22±6,99	65,03±7,64	0	78,81±5,88	0	70,05±6,72	0	4,79±1,79
150	8,63±7,45	79,79±5,81	14,17±0	135,16±4,2	5,2±0	105,66±6,00	0	19,98±2,69

CI 50: *C. ibitipocae* nativa em 50µg/mL; CI 100: *C. ibitipocae* nativa em 100µg/mL; CI 500: *C. ibitipocae* nativa em 500µg/mL

* média e desvio padrão de 3 experimentos independentes $p < 0,005$

Tabela 3: Produção de H₂O₂ por macrófagos tratados com galactoglucomanana sulfatada de *Cladonia ibitipocae* (CIS) nas concentrações de 10 e 100µg/mL.

Condição	Controle*	Controle*	CIS*	CIS PMA*	CIS*	CIS PMA*
Tempo (min)		PMA	10µg/ml	10µg/ml	100µg/ml	100µg/ml
0	0	4,46 ± 6,60	2,08 ± 3,60	1,64 ± 2,84	0,47 ± 0,82	1,49 ± 2,59
30	0	20,25 ± 5,82	1,3 ± 2,25	21,94 ± 5,00	1,07 ± 1,85	35,96 ± 5,84
90	0	47,18 ± 7,85	16,87 ± 6,9	75,58 ± 4,8	6,7 ± 1,24	79,29 ± 4,85
150	2,10 ± 1,7	64,92 ± 3,39	18,84 ± 4,7	93,55 ± 6,4	8,15 ± 3,8	116,42 ± 3,78

CIS 10: *C. ibitipocae* sulfatada em 10µg/mL; CIS 100: *C. ibitipocae* sulfatada em 100µg/mL

* média e desvio padrão de 3 experimentos independentes $p < 0,005$

As duas tabelas acima demonstram que tanto a galactoglucomanana nativa como a sulfatada quimicamente de *Cladonia ibitipocae* (tabelas 2 e 3 respectivamente) estimulam a produção de H_2O_2 pelos macrófagos. Os resultados obtidos pelo polissacarídeo nativo apresentaram um aumento na produção de H_2O_2 com o passar do tempo de experimento, sendo que até as células controle (sem o ativador PMA) apresentaram um certo estímulo. A concentração utilizada que apresentou maior resultado foi a de 50 $\mu\text{g/mL}$, cerca de 70% maior que os valores obtidos com o controle. Na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ a produção foi reduzida, mas ainda se apresentou 32% maior que o resultado apresentado pelo controle. Foi testada ainda a concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$, mas aqui o resultado apresentou-se 75% menor que o do grupo controle. Este dado provavelmente indica um impedimento da ligação do ativador PMA ao seu sítio de ligação no complexo enzimático da NADPH oxidase, causado pelo polissacarídeo em alta concentração. Isto indica uma inibição da produção de H_2O_2 pelo macrófago, causada por este polímero (ADACHI *et al.*; 1992). Chegou-se a essa conclusão já que este material não apresentou agressão celular nos experimentos de viabilidade celular. O polissacarídeo sulfatado também apresentou um aumento na produção de cerca de 44%, quando testado em uma concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ e um aumento de 80% na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. Com este dado pode-se dizer que este material promove a ligação do PMA ao complexo enzimático, não diminuindo seu poder estimulatório em concentrações mais elevadas. Deste material já esperava-se uma estimulação já que materiais sulfatados são imunopotencializadores comprovados (TOKURA *et al.*, 1987).

Tabela 4: Produção de H₂O₂ por macrófagos tratados com a fração etanólica 5% extraída de *Phyllanthus niruri* - (PN 5%) na concentração de 500µg/mL.

Condição	Controle*	Controle*	PN 5%*	PN 5%*
Tempo (min)		PMA		PMA
0	0	4,46 ± 2,60	0	1,51 ± 2,61
30	0	20,25 ± 4,82	0	55,25 ± 9,91
90	0	47,18 ± 5,85	0	150,09 ± 11,85
150	2,10 ± 1,70	64,92 ± 3,39	0	222,76 ± 8,43

PN 5%: *P. niruri* em 500µg/mL

* média e desvio padrão de 3 experimentos independentes $p < 0,005$

A fração oligossacarídica de *Phyllanthus niruri* apresenta o mesmo perfil ativador obtido pelo material de *Cladonia ibitipocae* sulfatado, mas não apresenta perfil inibitório como o material de *Cladonia ibitipocae* nativo. Ao final de 150 minutos, este polímero mostra um estímulo na produção de H₂O₂ cerca de 245% maior que o resultado das células controle, demonstrando que esta estrutura, aparentemente, parece ser mais efetiva que o polissacarídeo de *C. ibitipocae* sulfatado. Mas o que deve ser levado em consideração é a concentração de *P. niruri* 5% utilizada, 500µg/mL. Se forem comparados os resultados e as concentrações utilizadas, o que pode ser dito é que o material com maior poder estimulatório é o de *C. ibitipocae* sulfatado que apresentou 80% de estimulação, na concentração de 100µg/mL.

Tabela 5: Produção de H₂O₂ por macrófagos tratados com a fração alcalina 2% extraída de *Agaricus blazei* (AB 2%) na concentração de 500µg/mL.

Condição Tempo (min)	Controle*	Controle*	AB 2%*	AB 2%*
		PMA		PMA
0	0	4,46 ± 2,60	0	0
30	0	20,25 ± 4,82	0	10,30 ± 3,22
90	0	47,18 ± 5,85	1,47 ± 3,11	31,07 ± 4,69
150	2,10 ± 1,70	64,92 ± 3,39	1,88 ± 4,38	40,39 ± 6,29

AB 2%: *A. blazei* em 500µg/mL

* média e desvio padrão de 3 experimentos independentes $p < 0,005$

O polissacarídeo de *Agaricus blazei* não apresentou o mesmo padrão mostrado pelos outros dois polímeros já apresentados. A análise dos resultados obtidos das células com este polissacarídeo demonstrou cerca de 38% de diminuição da produção de H₂O₂ quando comparados aos resultados das células controle positivo. Estes resultados indicam uma agressão do material às células, dado comprovado pelos experimentos de viabilidade celular.

Tabela 6: Produção de H_2O_2 por macrófagos tratados com o sobrenadante etanólico extraído de *Spondias cytherea* (SC) nas concentrações de 10 e 100 μ g/mL.

Condição Tempo (min)	Controle*	Controle* PMA	SC* 10 μ g/ml	SC PMA* 10 μ g/ml	SC* 100 μ g/ml	SC PMA* 100 μ g/ml
0	0	0,5 \pm 0,71	0	0	0	0
30	1,74 \pm 1,66	16,9 \pm 4,27	3,4 \pm 3,45	10,75 \pm 0,55	0	2,76 \pm 2,82
90	3,88 \pm 3,88	50,5 \pm 5,83	2,88 \pm 3,3	37,98 \pm 6,9	0	29,07 \pm 3,76
150	18,24 \pm 4,31	64,37 \pm 4,79	11,26 \pm 2,32	47,76 \pm 5,2	0	45,0 \pm 1,71

SC 10: *S. cytherea* em 10 μ g/mL; SC 100: *C. cytherea* em 100 μ g/mL

* média e desvio padrão de 3 experimentos independentes $p < 0,005$

Na tabela acima encontram-se os resultados do sobrenadante etanólico extraído de *Spondias cytherea*. Este material apresenta um padrão parecido com o de *A. blazei*, ou seja com o passar do tempo de experimento, os valores de produção de peróxido das células com o polímero, apresentam-se menores que os das células controle positivo, cerca de 28%. Os dois materiais são agressivos às células, como verificado nos experimentos de viabilidade celular.

Tabela 7: Produção de H_2O_2 por macrófagos tratados com o polissacarídeo do exsudato vegetal de *Anadenanthera colubrina* (AC) na concentração de $100\mu\text{g/mL}$.

Condição	Controle*	Controle*	AC	AC
Tempo (min)		PMA	$100\mu\text{g/ml}^*$	$100\mu\text{g/ml}^*$ PMA
0	0	0	0	0
30	0	$17,74 \pm 4,74$	0	$6,18 \pm 2,18$
90	$8,61 \pm 3,04$	$60,49 \pm 5,41$	$10,2 \pm 2,3$	$60,52 \pm 5,77$
150	$10,44 \pm 2,26$	$92,53 \pm 5,68$	$10,9 \pm 3,1$	$61,84 \pm 4,85$

AC 100: *A. colubrina* em $100\mu\text{g/mL}$

* média e desvio padrão de 3 experimentos independentes $p < 0,005$

Os resultados da tabela acima são os obtidos pelo polissacarídeo de *Anadenanthera colubrina*. Este polissacarídeo apresenta um caráter parecido como o de *C. ibitipocae* nativa, ou seja, o material parece impedir a ligação do PMA ao seu sítio de ligação no complexo enzimático da NADPH oxidase impedindo assim a produção do metabólito (ADACHI *et al.*; 1992). Estes resultados demonstram cerca de 32% de inibição das células com o polissacarídeo, quando comparadas às células controle. Este dado foi possível de verificar, já que os experimentos de viabilidade celular não indicaram agressão.

Tabela 8: Produção de H₂O₂ por macrófagos tratados com o polissacarídeo degradado do exsudato vegetal de *Livistona chinensis* (LC DGD) nas concentrações de 10, 50 e 100µg/mL.

Condição	Controle*	Controle* PMA	LC DGD* 10	LC DGD* PMA 10	LC DGD* 50	LC DGD* PMA 50	LC DGD* 100	LC DGD* PMA 100
Tempo (min)								
0	0	0,24±0,33	0,34 ± 0,27	0,35± 0,49	0	0	0	0
30	2,01 ± 0,6	16,07±2,67	1,16 ± 0,87	3,36± 3,92	0	7,32±1,37	0	6,84± 2,41
90	4,33 ± 1,45	61,09±3,48	5,03 ± 3,79	37,85±4,75	0	55,35±5,21	0	52,94± 6,79
150	5,6 ± 1,63	82,11±2,16	9,43 ± 2,39	79,05±5,44	0	70,64±6,42	0	60,6± 4,55

LC DGD 10: *L. chinensis* degradada em 10µg/mL; LC DGD 50: *L. chinensis* degradada em 50µg/mL; LC DGD 100: *L. chinensis* degradada em 100µg/mL

* média e desvio padrão de 3 experimentos independentes

$p < 0,005$

O último material utilizado para estes testes foi o polissacarídeo degradado de *Livistona chinensis*. Este material apresenta um perfil parecido com o polissacarídeo de *A. colubrina* e *C. ibitipocae* nativa ou seja, apresenta inibição da produção de peróxido de hidrogênio pelo macrófago. O resultado apresentou cerca de 15% de inibição pelo polissacarídeo na concentração de 50µg/mL e 25% na concentração de 100µg/mL.

Abaixo estão representados os gráficos dos polímeros que mais estimularam a produção de peróxido de hidrogênio. Estes gráficos tornam possível a melhor visualização desta estimulação.

Gráfico 2: Produção de peróxido de hidrogênio por *C. ibitipocae* nativa

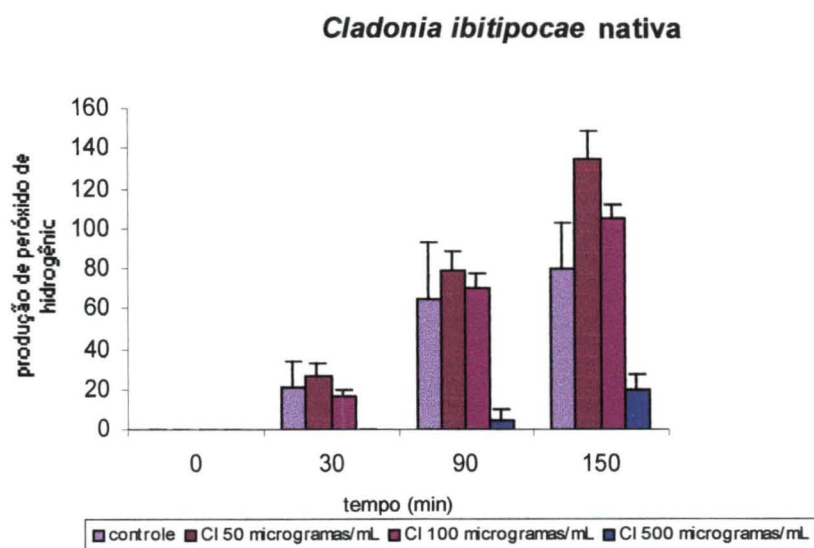


Gráfico 3: Produção de peróxido de hidrogênio por *C. ibitipocae* sulfatada

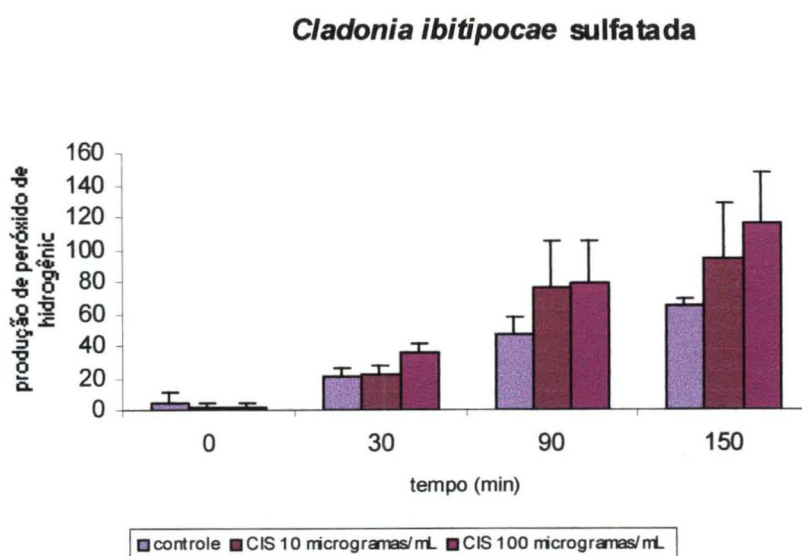
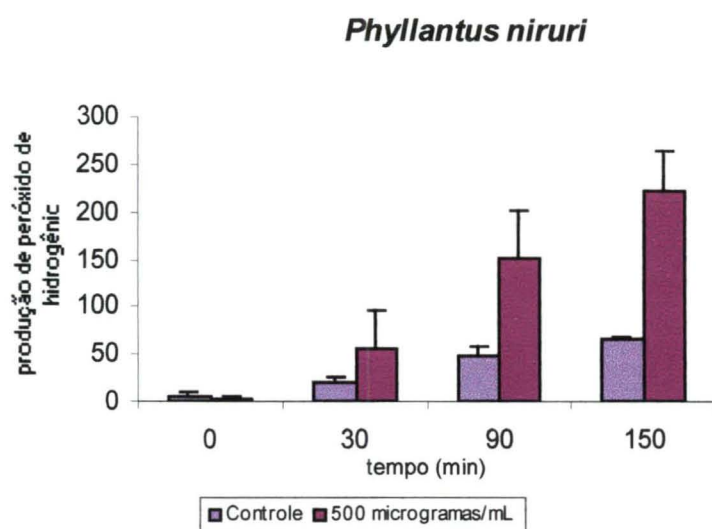


Gráfico 4: Produção de peróxido de hidrogênio por *P. niruri*.

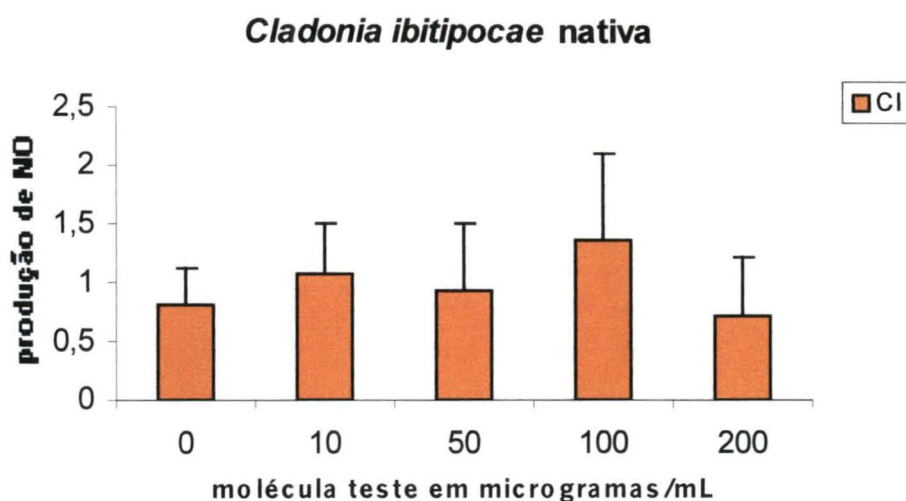
A análise geral dos resultados obtidos demonstrou que os macrófagos que não receberam tratamento com polissacarídeos (controle) produziram apenas valores basais de H_2O_2 (máximo de 20 nmoles de peróxido), sendo esses valores bastante aumentados quando essas células são estimuladas por PMA (controle PMA) (entre 60 a 100 nmoles de peróxido) que é um ativador alostérico do complexo enzimático da NADPH oxidase, ativando assim a formação do ânion superóxido e consequentemente a do peróxido de hidrogênio (COSTA ROSA *et al.*, 1995).

Analisando os resultados da produção de H_2O_2 por macrófagos tratados com as moléculas utilizadas neste trabalho, observaram-se respostas variadas: algumas delas estimularam o “burst” respiratório, tornando a célula ativada, outras inibiram tal resposta.

4.3 Resultado da produção de NO por Macrófagos “in vitro”

Os gráficos abaixo mostram os resultados obtidos com os experimentos para a produção de óxido nítrico. Estes resultados estão em μmoles de nitrito/mL.mg de proteína. Nestes gráficos estão apenas os resultados da produção de NO sem os ativadores LPS e $\text{INF}\gamma$, já que as duas situações (com e sem ativadores alostéricos) não apresentaram diferença significativa.

Gráfico 5: Produção de óxido nítrico pelo polissacarídeo nativo obtido de *C. ibitipocae* (CI).

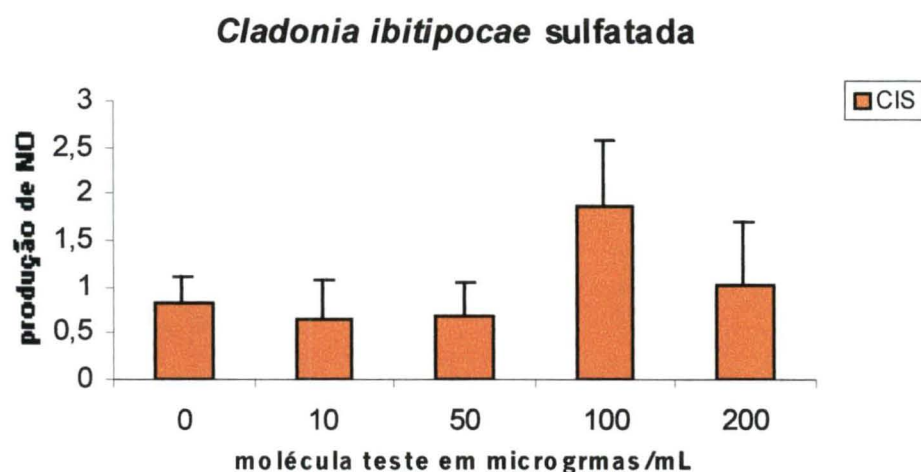


$p < 0,005$

estes dados correspondem a média e desvio padrão de dois experimentos independentes em triplicata

O gráfico 5 demonstra que o polissacarídeo utilizado não estimulou a produção de NO pelos macrófagos. Analisando o gráfico, observa-se que não houve diferença significativa entre as células controle (concentração zero) e as tratadas com o polímero. As células apresentaram apenas níveis basais de produção de NO.

Gráfico 6: Produção de óxido nítrico pelo polissacarídeo obtido de *C. ibitipocae* sulfatado quimicamente (CIS)

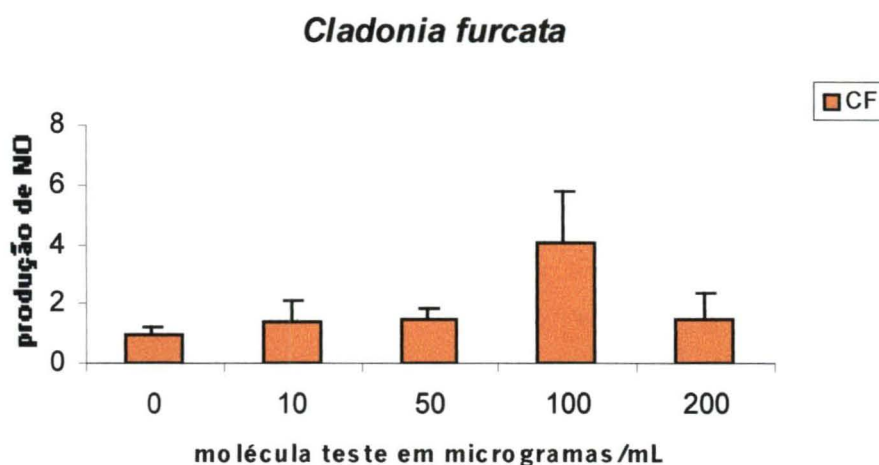


$p < 0,005$

estes dados correspondem a média e desvio padrão de dois experimentos independentes em triplicata

O gráfico 6 apresenta os resultados do polissacarídeo de *C. ibitipocae* sulfatado quimicamente. Este material apresentou um pequeno aumento na produção de NO na concentração de 100 μ g/mL, mas este resultado não apresenta diferença significativa da produção apresentada pelas células controle.

Gráfico 7: Produção de óxido nítrico pelo polissacarídeo nativo obtido de *C. furcata* (CF).

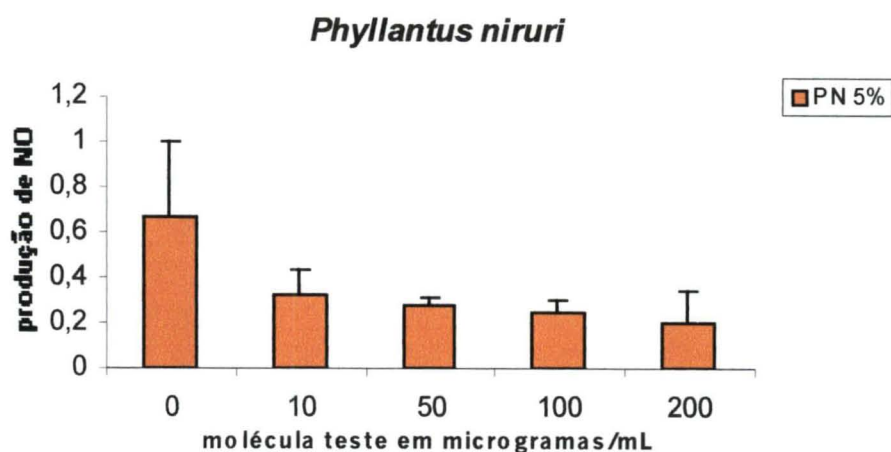


$p < 0,005$

estes dados correspondem a média e desvio padrão de dois experimentos independentes em triplicata

O gráfico 7 apresenta os resultados do polissacarídeo nativo obtido de *C. furcata*. Este material também apresentou um pequeno aumento na produção de NO na concentração de 100µg/mL, mas, como o material de *C. ibitipocae* sulfatada, este resultado não apresenta-se significativamente diferente do apresentado pelas células controle.

Gráfico 8: Produção de óxido nítrico pela fração oligossacarídica obtida de *P. niruri* (PN 5%)



$p < 0,005$

estes dados correspondem a média e desvio padrão de dois experimentos em triplicata

O gráfico 8 apresenta os resultados da fração oligossacarídica obtida de *P. niruri* 5%. Este material, como o de *C. ibitipocae* nativa, não demonstrou estimulação nem inibição da ativação celular, apresentando apenas valores basais de NO produzido pelo macrófagos. Estes dados indicam que esta fração oligossacarídica não apresenta poder estimulatório para a produção de NO pelos macrófagos.

Estes são resultados preliminares, já que foram realizados apenas dois experimentos, em triplicata, para a medida de óxido nítrico.

A análise destes dados demonstra que estes polímeros não apresentam atividade para a produção de óxido nítrico, ou seja, não ativam nem inibem a produção deste metabólito, mas como estes dados são resultados preliminares, estas conclusões não são definitivas. Os polímeros de *C. ibitipocae* nativa e *P. niruri* 5%, não apresentaram estimulação celular para a produção de NO mesmo apresentando produção de H_2O_2 elevada. Este dado pode ser explicado já que estes dois metabólitos apresentam vias de produção distintas, uma podendo estar estimulada e outra inativada dependendo das condições. Já que o ânion superóxido participa das vias de produção destes dois metabólitos, nos experimentos para a produção de NO pode estar ocorrendo

um desvio para a via metabólica do H_2O_2 , não sendo evidenciada a produção do óxido nítrico (DING *et al.*, 1988). Estes resultados demonstram que as vias de regulação para a produção destas duas classes de compostos são reguladas independentemente. O que se pode dizer dos resultados destes experimentos, é que existem inúmeras vias de ativação do macrófago, e que, se por acaso um intermediário não estiver sendo produzido, isto não indica que a célula não esteja ativada.

A tabela a seguir mostrará comparativamente os resultados obtidos com os experimentos para produção de peróxido de hidrogênio e de óxido nítrico em relação a estrutura dos polímeros utilizados.

Tabela 9: Tabela comparativa dos resultados obtidos

<i>Polímeros Utilizados</i>	<i>Características do Polímero</i>	<i>Experimento H₂O₂</i>	<i>Experimento NO</i>
<i>C. ibitipocae</i> nativa	galactoglucomanana	ativação e inibição	*
<i>C. ibitipocae</i> sulfatada	galactoglucomanana sulfatada quimicamente	ativação	*
<i>C. furcata</i>	galactoglucomanana	-----	*
<i>A. blazei</i> 2%	Extrato bruto predominância de glucose	agressão	-----
<i>P. niruri</i> 5%	Fração contendo diversos oligossacarídeos	ativação	*
<i>S. cytherea</i>	Fração oligossacarídica com predominância de glucose	agressão	-----
<i>A. colubrina</i>	Arabinogalactana ácida	inibição	-----
<i>L. chinensis</i> degradada	Arabinoxilana ácida	inibição	-----

(*) Nenhum resultado obtido (—) Experimento não realizado

Esta tabela demonstra que diferentes polímeros apresentam atividades biológicas diferentes. Este dado indica que qualquer característica do polímero, pode levá-lo a apresentar uma atividade biológica distinta, e para se entender qual característica estará influenciando estes dados, tem que se conhecer o polímero com detalhes e realizar diversos testes biológicos, após diversas

modificações químicas destes polímeros para conseguir entender o que realmente está influenciando a atividade biológica apresentada por ele.

5. CONCLUSÕES

- ⇒ Os experimentos de viabilidade celular demonstraram que a maior parte dos polímeros testados não são nocivos às células, constituindo então material viável para os experimentos de medida da ativação de macrófagos;
- ⇒ O polissacarídeo de *A. blazei* 2% e a fração oligossacarídica de *S. cytherea* apresentaram um certo grau de agressividade celular, apresentando uma diminuição nesta taxa de viabilidade de cerca de 34 e 44% respectivamente;
- ⇒ Os polímeros de *A. colubrina* e *P. niruri* 5%. parecem ativar o metabolismo celular em cerca de 36 e 18% respectivamente;
- ⇒ Nos experimentos de medida da produção de H_2O_2 , os polímeros que mais se destacaram foram os polissacarídeos de *C. ibitipocae* nativa e sulfatada quimicamente e a fração oligossacarídica de *P. Niruri* 5%;
- ⇒ O polissacarídeo de *C. ibitipocae* nativa apresentou uma estimulação celular de cerca de 70% na concentração de $50\mu\text{g/mL}$, mas com o aumento da concentração utilizada demonstrou uma diminuição desta estimulação, chegando a causar um decréscimo da produção de H_2O_2 de cerca de 75% se comparada ao controle;
- ⇒ O polissacarídeo sulfatado de *C. ibitipocae* parece não apresentar este perfil inibitório, já que a estimulação celular causada por este polímero aumenta com o aumento da concentração utilizada;
- ⇒ A fração oligossacarídica de *P. niruri* 5% apresentou cerca de 245% de aumento da produção de H_2O_2 por suas células, se comparadas com as células controle, aparentemente não causando inibição da atividade celular;
- ⇒ O polissacarídeo de *A. blazei* 2% e a fração oligossacarídica de *S. cytherea* demonstraram uma diminuição da produção de H_2O_2 , já que estes dois materiais agredem as células causando morte celular, dado demonstrado pelos experimentos de viabilidade celular;

- ⇒ O material de *A. colubrina*, apresentou uma diminuição da produção de H_2O_2 , mesmo tendo apresentado um alto resultado no experimento de viabilidade celular. Com isso conclui-se que este material apresenta o mesmo perfil que o polissacarídeo de *C. ibitipocae* nativa ou seja, caracter inibitório;
- ⇒ O material de *L. chinensis*, apresentou um perfil parecido com o de *A. colubrina*, não é considerado agressivo e sim inibitório para a ativação celular, sendo que esse caráter inibitório aumenta com o aumento da concentração de polissacarídeo utilizada;
- ⇒ Os experimentos de produção de óxido nítrico demonstraram que nenhum dos polímeros utilizados (polissacarídeo nativo; e sulfatado quimicamente de *C. ibitipocae*; polissacarídeo nativo de *C. furcata*; e a fração oligossacarídica de *P. niruri* 5%) apresentou ativação celular para a produção do metabólito óxido nítrico, ou seja, nenhum deles apresentou aumento desta produção se comparados seus resultados com os das células controle;
- ⇒ Deste trabalho pode-se tirar a seguinte conclusão: os polímeros que mais demonstraram estimulação, sem causar inibição ou agressão celular foram o polissacarídeo sulfatado de *C. ibitipocae* e a fração oligossacarídica de *P. niruri* 5%.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADACHI, Y.; OHNO.; YODAMAE, T. Inhibitory effect of β -Glucans on zymosan-mediated hydrogen peroxide production by murine peritoneal macrophages *in vitro*. **Biol. Pharm. Bull.**, vol.16, n.05, p.462-467,1992.
- ARTURSSON, P.; EDMAN, P.; ERICSSON, J. L. E. Macrophage stimulation with some structurally related polysaccharides. **Scand. J. Immunol.** vol. 25, p. 245-254, 1987.
- BÖGWALD, J.; JOHNSON. E.; SELJELID, R. The cytotoxic effect of mouse macrophages stimulated *in vitro* by a β -1,3-D-glucan from yeast cell walls. **Scand. J. Immunol.**, vol. 15, p. 297-304, 1982.
- BOHN, J. A.; BeMILLER, J. N. (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. **Carbohydr. Polymers**, vol.28, p.3-14, 1995.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, **Anal. Biochem.**, vol.72, p.248-254,1976.
- BRADNER, W.T.; CLARKE, D.A.; STOCK, C.C. Stimulation of host defense against experimental cancer. I. Zymosan and Sarcoma 180 in mice. **Cancer Res.**, 18, 347-351, 1958.
- COHN, Z.A. The activation of mononuclear phagocytes: Fact, fancy, and future. **The journal of Immunology.**, vol. 121, p. 813-816, 1978.
- COLLINS, R. A. Polysaccharides charopeptide from *Coriolos versicolor* has potential for use against human immunodeficiency virus type 1 infection. **Life Science**, vol. 60: PL 383-7.
- COSTA ROSA, L.F.B.P.; CURI, R.; MURPHY. C.; NEWSHOLME.P. Effect of adrenaline and phorbol myristate acetate or bacterial lipopolysaccharide on stimulation of pathways of macrophages glucose, glutamine and O₂ metabolism. **Biochem.J**, vol.3, p.709-714, 1995.
- DAMONDE, E.B.; NEYTS, J.; PUJOL, C.A; SNOECK, R.; ANDREI, G.; IKEDA, S.; WITVROUW, M.; REYMEN, D.; HAINES, H.; MATULEWICZ, M.C.; CERESO, A.S.; COTO,C.E.; De CLERCQ, E. Antiviral activity of a sulfated

- polysaccharide from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*. **Biochem. Pharmacol.**, vol.47, p. 2187-2192, 1994.
- DAVIS, R. H. Anti – inflammatory and wound healing activity of a growth substance in Aloe vera. **Journal of the American Podiatric Medicam Association.** , vol. 84, n° 2, p. 77-81, 1994.
- DELGOBO, C. L.; GORIN, P. A . J.; JONES. C.; IACOMINI, M. Gum heteropolysaccharide and free reducing monosaccharides and oligosaccharides of *Anadenanthera colubrina*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 47, p. 1-8, 1998.
- DING, A. H.; NATHAN, C.F.; STUEHR, D.J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. **The journal of Immunology.**, vol. 141, p. 2407-2412, 1988.
- GOLDSTEIN, I.J.; HAY, G. W.; LEWIS, B.A .; SMITH, F.. Controled degradation of polysaccharides by periodate oxidation, reduction and hydrolysis. **Meth. Carbohydr. Chem.**, New York, v. 5, p. 361-369, 1965.
- KARNOVSKY, M. L.; LAZDINS, J. K.; Biochemical criteria for activated macrophages. **The journal of Immunology.**, vol. 121, p. 809-813, 1978.
- KIHO, T.; SHIOSE, Y.; NAGAI, K.; UKAI, S. Polysaccharides in fungi. XXX. Antitumor and immunomodulating activities of two polysaccharides from the fruiting bodies of *Armillariella tabescens*. **Chem. Pharm. Bull.**, vol.40, n.8, p.2110-2114, 1992.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D.L.; COX,M.M. **Princípios de Bioquímica**. 2ª Edição, Editora Sarvier. 1995.
- MA, Y.; MIZUNO, T.; ITO, H. Antitumor activity of some polysaccharides isolated from a chinese mushroom, “Huangmo” , the fruiting body of *Hohenbuehelia serotina*. **Agric. Biol. Chem.**, vol.55, n.11, p.2701-2710,1991.
- MARTINICHEN, J. C.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Anticoagulant activities of the sulfated galactoglucomannans from the lichen *Cladonia ibitipocae* and *Cladonia connexa*. In: **Anais da XXIXª Reunião anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq)**, L – 25, p. 112, 2000.
- MENESTRINA, J.M.; SASSAKI, G.L.; TORRI, G.; IACOMINI, M.; GORIN, P.A .J. Partial structural characterization of the heteropolysaccharide from *Livistona chinensis* gum. In: **Anais da XXVª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq)**, L – 56, p.116, 1996.

MIZUNO, M.; SHIOMI, Y.; MINATO, K.; KAWAKAMI, S.; ASHIDA, H.; TSUCHIDA, H. Fucogalactan isolated from *Sarcodon aspratus* elicits released of tumor necrosis factor- α and nitric oxide from murine macrophages. **Immunopharmacology**. vol. 46, p. 113-121, 2000.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E. A. Nitric Oxide: Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. **Pharmacological Reviews.**, vol 43, p.109-134, 1994.

MOSMANN, T.J. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxic assays. **J. Immunol. Methods** 65:55 . 1983.

NISHINO, T.; AIZU, Y.; NAGUMO, T. The relationship between the molecular weight and the anticoagulant activity of two types of fucan sulfates from the brown seaweed *Ecklonia kurome*. **Agric. Biol. Chem.**, Tokio, v.55, n^o 3, p. 791-796, 1991.

NORTH, R. J. The concept of the activated macrophages. **The journal of Immunology**. vol. 121, p. 806-809, 1978.

OKASAKI, M.; CHIBA, N.; ADACHI, Y.; OHNO, N.; YADOMAE, T. Signal transduction pathway on β -glucans-triggered hydrogen peroxide production by murine macrophages *in vitro*. **Biol. Pharm. Bull.** vol. 19, n^o 1, p. 18 – 23, 1995.

O'NEILL, A. N. Sulphated derivatives of laminarin. **Can. J. Chem.**, Ottawa.33, p.1097-1101, 1955.

PANGRAZZI, J.; ABBADINI, M.; ZAMETTA, M.; NAGGI, A.; TORRI, G.; CASU, B.; DONATI, MB. Antithrombotic and bleeding effects of a low molecular weight heparin fraction. **Biochem Pharmacol** 1985 Sep 15; 34 (18): 3305 – 8.

PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. **Journal of Immunol. Methods**. Vol.38, p.161-170, 1980.

ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S.; KUMAR, V. **Patologia estrutural e funcional**. 5^a Edição. Editora Guanabara Koogan, 1996.

ROITT, I.M.; BROSTOFF, J.; MALE, D.K. **Imunologia**. 5^a Edição. Editora Manole, 1999.

RUSSO, M.; TEIXEIRA, H.C.; MARCONDES, M.C.G.; BARBUTO, J.A.M. Superoxide – independent hydrogen released by activated macrophages. **Brazilian J. Med. Biol. Res.** vol. 223, p. 1271-1273.

SCHULTZ, R. M.; PAPAMATHEAKIS, J.D.; LUETZELER, J.; CHIRIGOS, M. A. Association of macrophage activation with antitumor activity by synthetic and biological agents. **Cancer Res.**, vol.37, p.3338-3343,1977.

SERRATO, R. V.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Investigation of low molecular weight carbohydrates of *Phyllanthus amarus*. In: **Anais da XXIX^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq)**, L – 79, p.121, 2000.

SERRATO, R. V.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. General studies on low molecular weight compounds and polysaccharides obtained from *Spondias cytherea* fruit pulp. In: **Anais da XXX^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq)**, M – 13, p.136, 2001.

SLADOWSKI, D.; STEER, S. J.; CLOTHIER R. H.; BALLS, M. A improved MTT assay. **Journal of Immunol. Methods.** vol.157, p.203-207,1993.

STONE, AL.; MELTON, DJ.; LEWIS, MS. Structure - function relations of heparin-mimetic sulfated xylan oligosaccharides: inhibition of human immunodeficiency virus-1 infectivity in vitro. **Glycoconj. J.** 1998 Jul; 15 (7): 697-712.

STUELP-CAMPELO, P. M.; OLIVEIRA, M. B. M.; LEÃO, A. M. A.C.; CARBONERO, E. R.; GORIN, P. A. J.; IACOMONI, M. Effect of a soluble α -D-glucan from the lichenized fungi *Ramalina celastri* on macrophage activity. **International Immunopharmacology.** in press.

TOKURA, S.; NISHI, N.; AZUMA, I. Immunological aspects of chitin derivatives. In: YALPANI, M. **Industrial polysaccharides: genetic engineering, structure/property relations and applications.** Elsevier Science Publishers B. V., Netherlands, vol.3, p.347-362,1987.

WHISTLER, R. L., BUSHWAY, A. A.; SINGH, P. P. Noncitotoxic, antitumor polysaccharides. **Adv. Carbohyd. Chem.**, vol.32, p.235-275, 1976.

WILLIAMS, D.L.; PRETUS, H.A.; McNAMEE, R.B.; JONES, E.L.; ENSLEY, H. E.; BROWDER, I. W. Development of a water-soluble, sulfated (1 \rightarrow 3)- β -D-

glucan biological response modifier derived from *Saccharomyces cerevisiae*. **Carbohydr. Res.**, vol. 235, p. 247-257, 1992.

WORANOVICZ, S. M. Estudo comparativo de polissacarídeos e oligossacarídeos de líquens do gênero *Cladonia*. Curitiba, 1999. (Tese de Doutorado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas – Universidade Federal do Paraná.

WORANOVICZ, S. M.; PINTO, B. M.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Novel structures in galactoglucomannans of the lichens *Cladonia substellata* and *Cladonia ibitipocae*: significance and chemotypes. **Phytochemistry**. vol. 51, p. 395-402, 1999.

ZAMUNER, S. R., GUTIÉRREZ, J. M., MUSCARÁ, M. N., TEIXEIRA, S. A., TEIXEIRA, C. F. P. *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms trigger microbicidal functions of peritoneal leukocytes *in vivo*. **Toxicon.**, vol. 39, p. 1505-1513, 2001.