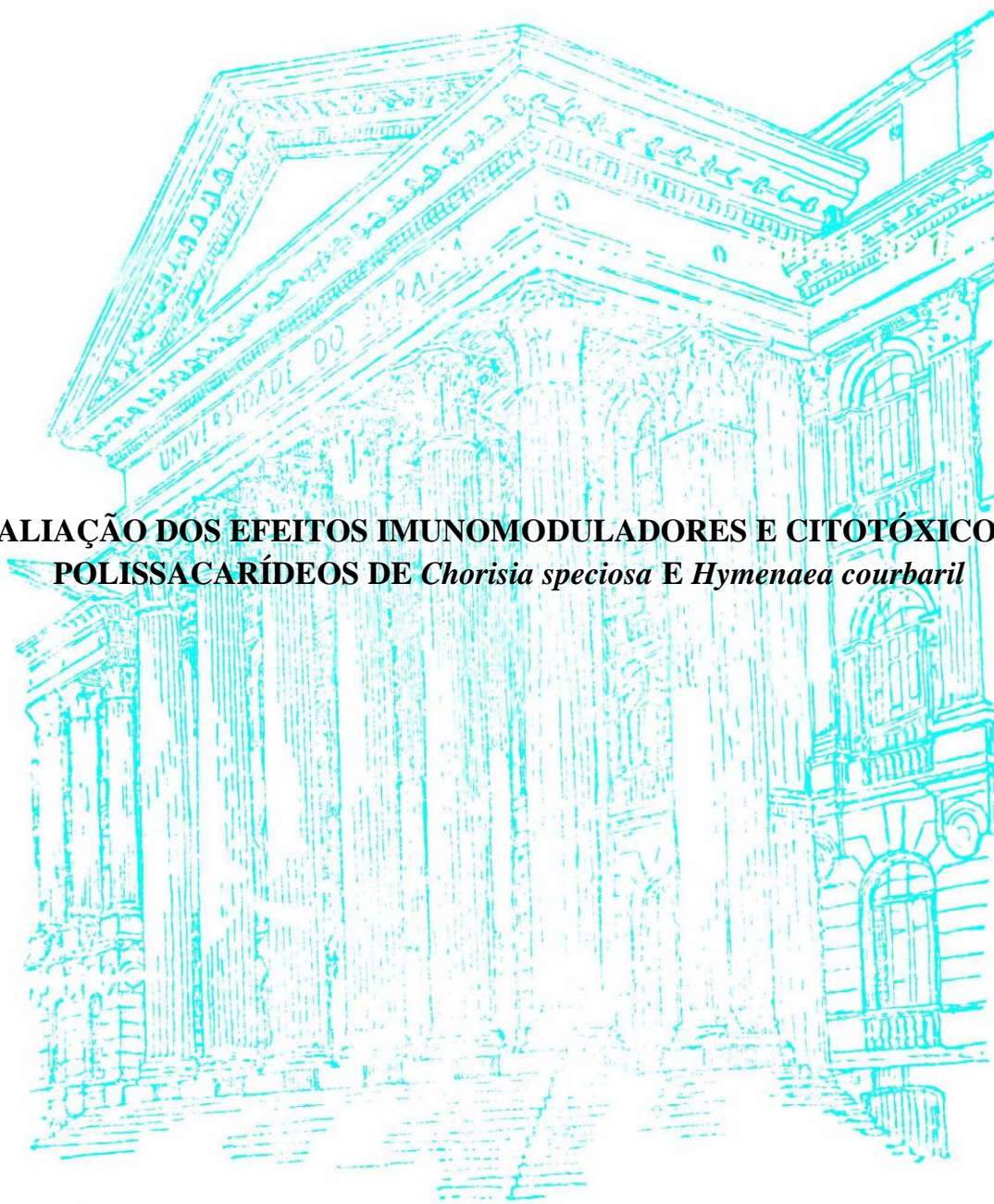


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JULIANA DA COSTA SILVEIRA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS IMUNOMODULADORES E CITOTÓXICOS DE
POLISSACARÍDEOS DE *Chorisia speciosa* E *Hymenaea courbaril***



**CURITIBA
2010**

JULIANA DA COSTA SILVEIRA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS IMUNOMODULADORES E CITOTÓXICOS DE
POLISSACARÍDEOS DE *Chorisia speciosa* E *Hymenaea courbaril***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Ciências - Bioquímica.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Guilhermina R. Noletto
Co-orientadora: Prof^ª Dr^ª Sílvia Maria S. C. Cadena

**CURITIBA
2010**

À minha mãe que esteve sempre ao
meu lado do começo ao fim.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelas oportunidades oferecidas e por todas as pessoas especiais que cruzaram meu caminho.

À minha mãe que sempre me deu motivação, incentivo e apoio. À minha família que sempre me trouxe muita alegria.

À Prof^a Guilhermina, pela orientação e pela paciência.

À Prof^a Silvia, pela co-orientação, carinho e amizade.

Aos professores do departamento pela atenção dedicada: Prof^a Carmen, Prof^a Gláucia, Prof^a Scheila, Prof^a Maria Eliane, Prof. David, Prof. Emanuel e Prof. Miguel.

À Dr^a Mariana Moretão e Dr. Marco Kriger que gentilmente cederam a linhagem celular RAW 264.7. Assim como a Prof^a Carmem Lúcia Petkowicz e Marianna Maia Rosário pelos polissacarídeos.

À Monica, minha querida amiga. Passamos por tanta coisas juntas. Não teria sido nada fácil sem você ao meu lado. Obrigada por tudo.

Aos meus queridos amigos Thiago, Nicole, Gustavo e Luciana, por todas as risadas, companheirismo e idas a cantina.

Aos colegas do laboratório pela convivência, risadas, sempre à disposição pra me socorrer. À Beth, Andréia, Eduardo, Regina, Paulo, Gláucio, Amanda, Tati, Caro, Hudson, Jú-IC, Jú-Scheila, Patty-IC e especialmente ao Alex e a Nana.

Ao meu namorado Gabriel pelo amor, carinho, paciência e suporte.

Aos meus grandes amigos Marcos, Patty, Renan, Douglas, Eduardo, James, Murilo, Michelle e Fabinho.

À Espedita que me ajudou a encontrar o caminho quando me encontrava perdida.

Ao RU, o momento mais feliz do dia.

Ao curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica.

Ao CNPq, Fundação Araucária, CAPES e PRONEX-Carboidratos, pelo suporte financeiro.

“A adversidade desperta em nós capacidades que, em circunstâncias favoráveis, teriam ficado adormecidas.”
(Horácio)

RESUMO

Polissacarídeos isolados de diferentes fontes têm demonstrado apresentar propriedades imunomoduladoras e antitumorais, atuando, portanto, como moduladores da resposta biológica. O objetivo deste trabalho foi avaliar potenciais propriedades imunomoduladoras e citotóxicas da ramnogalactanana ácida obtida do exsudato do fruto de *Chorisia speciosa* (Paineira) (PEP) e de uma xiloglucana de reserva extraída da semente de *Hymenaea courbaril* (Jatobá) (XGJ), utilizando três modelos experimentais *in vitro*: macrófagos RAW 264.7, macrófagos peritoneais de camundongos e células HeLa. Foram realizados experimentos de viabilidade celular, proliferação celular e morfologia nas células RAW 264.7 e HeLa. A atividade fagocítica foi avaliada em RAW 264.7 e a produção de óxido nítrico em macrófagos peritoneais de camundongos. Para o polissacarídeo XGJ foi avaliado sua interferência em alguns parâmetros do metabolismo oxidativo de células HeLa. Em 48 h de incubação, PEP foi capaz de promover o crescimento de macrófagos RAW 264.7 em ~17% na concentração de 2,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e ~21% na concentração de 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, em relação ao controle. Também aumentou a capacidade fagocítica de macrófagos RAW 264.7 em até 112% na concentração de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e induziu um aumento na produção de óxido nítrico de 308% a 363% (concentrações de 2,5 a 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) em macrófagos peritoneais de camundongos. A XGJ promoveu um aumento na proliferação de células HeLa de maneira dose dependente, variando de ~65% a ~156% em relação ao controle, durante 24 h e de ~19% a 38% em relação ao controle, para o tempo de 48 h (concentrações de 25 a 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Aumentou a capacidade fagocítica de macrófagos RAW 264.7 em até 106% na concentração de 200 (concentrações de 25 a 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Nesta concentração XGJ também diminuiu a velocidade de consumo de O_2 de células HeLa em ~47% e a produção de piruvato em ~20% nos tempos 0 e 30 minutos, assim como aumentou a produção de lactato em ~26% no tempo de 60 minutos. Os resultados sugerem que tanto PEP quanto a XGJ podem ser considerados moduladores de resposta biológica.

Palavras-chave: Polissacarídeos. Macrófagos. Células HeLa. Imunomodulador. Citotóxico.

ABSTRACT

Polysaccharides isolated from different sources have been demonstrated to have immunomodulatory and antitumor properties, acting therefore as modulators of biological response. The objective of this study was to assess potential cytotoxic and immunomodulatory properties of the rhamnogalactanan obtained from the exudate of the fruit of *Chorisia speciosa* (Paineira) (PEP) and of a storage xyloglucan extracted from the seeds of *Hymenaea courbaril* (Jatobá) (XGJ) using three experimental models *in vitro*: macrophages RAW 264.7, peritoneal macrophages of mice and HeLa cells. Experiments were carried out in cell viability, cell proliferation and morphology in RAW 264.7 and HeLa cells. Phagocytic activity was evaluated in macrophages RAW 264.7 and the nitric oxide production in peritoneal macrophages. For the XGJ was evaluated its interference in some parameters of oxidative metabolism of HeLa cells. After 48 h incubation, PEP was able to promote the growth of RAW 264.7 macrophages in ~17% at a concentration of 2.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and ~21% at a concentration of 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, compared to control. It also increased the phagocytic capacity of RAW 264.7 macrophages by up to 112% at concentration of 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and induced an increase in the nitric oxide production from 308% to 363% (concentrations from 2.5 to 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) in peritoneal macrophages of mice. The XGJ promoted an increase in the proliferation of HeLa cells in a dose-dependent behavior, ranging from ~65% ~156% over the control, for 24 h and ~19% to 38% compared to control, to time of 48 h (concentrations from 25 to 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Increased phagocytic capacity of macrophage RAW 264.7 up to 106% at concentration of 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. In this concentration XGJ also decreased the rate of O_2 consumption of HeLa cells at ~47% and the production of pyruvate in ~20% at 0 and 30 minutes, as well as increased lactate production in ~26% in 60 minutes. The results suggest that both PEP and XGJ may be considerate as modulators of biological response.

Key words: Polysaccharides. Macrophages. HeLa cells. Immunomodulatory. Cytotoxic.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	MODELO ESQUEMÁTICO ILUSTRANDO POTENCIAIS VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS NA ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS POR POLISSACARÍDEOS.....	24
FIGURA 2 -	POLISSACARÍDEOS PODEM ATIVAR UMA VARIEDADE DE RESPOSTAS DE MACRÓFAGOS.....	24
FIGURA 3 -	ATIVAÇÃO DO COMPLEXO ENZIMÁTICO NADPH OXIDASE QUE CATALISA REDUÇÃO DO OXIGÊNIO A ÂNION SUPERÓXIDO ($O_2^{\cdot-}$) TENDO COMO DOADOR DE ELÉTRONS O NADPH.....	26
FIGURA 4 -	SÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO.....	27
FIGURA 5 -	FLUXOGRAMA DA ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL.....	33
FIGURA 6 -	EFEITOS DOS POLISSACARÍDEOS SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE MACRÓFAGOS RAW 264.7.....	51
FIGURA 7 -	EFEITOS DE PEP SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS.....	52
FIGURA 8 -	EFEITOS DOS POLISSACARÍDEOS SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE CÉLULAS HELA.....	53
FIGURA 9 -	EFEITOS DOS POLISSACARÍDEOS SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR DE MACRÓFAGOS RAW 264.7.....	55
FIGURA 10 -	EFEITOS DOS POLISSACARÍDEOS SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS HELA.....	58
FIGURA 11 -	EFEITOS DOS POLISSACARÍDEOS SOBRE A ATIVIDADE FAGOCÍTICA DE MACRÓFAGOS RAW 264.7.....	62
FIGURA 12 -	EFEITOS DOS POLISSACARÍDEOS SOBRE A ATIVIDADE FAGOCÍTICA DE MACRÓFAGOS RAW 264.7 – INTERNALIZAÇÃO DAS LEVEDURAS PELOS MACRÓFAGOS.....	64
FIGURA 13 -	EFEITOS DOS POLISSACARÍDEOS SOBRE A MORFOLOGIA DE MACRÓFAGOS RAW 264.7.....	66
FIGURA 14 -	EFEITOS DOS POLISSACARÍDEOS SOBRE A MORFOLOGIA DE CÉLULAS HELA.....	68
FIGURA 15 -	EFEITOS DE PEP SOBRE A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS.....	71
FIGURA 16 -	EFEITOS DA XGJ SOBRE O CONSUMO DE O_2 POR CÉLULAS HELA INTACTAS.....	73
FIGURA 17 -	EFEITOS DA XGJ SOBRE O CONSUMO DE O_2 POR CÉLULAS HELA PERMEABILIZADAS.....	75
FIGURA 18 -	EFEITOS DA XGJ SOBRE A PRODUÇÃO DE LACTATO E PIRUVATO POR CÉLULAS HELA.....	77

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - PORCENTAGEM (%) DE MACRÓFAGOS QUE REALIZARAM A FAGOCITOSE.....	66
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BRM	- Modificadores da Resposta Biológica
CFS	- Fator Estimulador de Colônia
Dig.	- Digitonina
DMEM	- Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium
DMSO	- Dimetilsulfóxido
EDTA	- Ácido etilenodiaminotetracético
FCCP	- Carbonil cianeto p-trifluormetoxifenilhidrazona
fMLP2	- <i>N</i> -formilmetionilleucilfenilalanina
G-CFS	- Fator Estimulador de Colônia de Granulócitos
GM-CFS	- Fator Estimulador de Colônia de Granulócitos e Macrófagos
HBSS	- Solução salina balanceada de Hanks
H ₂ O ₂	- Peróxido de Hidrogênio
HEPES	- N- (2-hidroxietil) piperazina N' (ácido 2-etano sulfônico)
HPSEC-MALLS/RI	- Cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos e índice de refração
IFN- γ	- Interferon gama
IL-1	- Interleucina 1
IL-6	- Interleucina 6
IL-8	- Interleucina 8
IL-12	- Interleucina 12
iNOS	- Óxido Nítrico Sintase Induzível
LPS	- Lipopolissacarídeo

MEM	- Meio essencial mínimo de Eagle
MTT	- Brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio
NED	- N-naftil-etilenodiamina
NF- κ β	- Fator Nuclear Kappa Beta
NK	- Células “Natural Killer”
NO \cdot	- Óxido Nítrico
NOS	- Óxido Nítrico Sintase
O $_2^{\cdot -}$	- Ânion Superóxido
Oligo.	- Oligomicina
OSCP	- “Oligomycin-sensitivity Conferring Protein”
PEP	- Polissacarídeo do exsudato do fruto de <i>Chorisia speciosa</i> (Paineira)
PBS	- Solução Salina Tamponada
PMA	- Forbol 12-miristato, 13-acetato
SFB	- Soro Fetal Bovino
Suc.	- Succinato
TNF- α	- Fator de Necrose Tumoral Alfa
TNF-R1	- receptor para TNF do tipo 1
TNF-R2	- receptor para TNF do tipo 2
XGC	- Xiloglucana de <i>Copaifera langsdorffii</i>
XGJ	- Xiloglucana de <i>Hymenaea courbaril</i> (Jatobá)
XGM	- Xiloglucana de <i>Mucuna sloanei</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 MODIFICADORES DE RESPOSTA BIOLÓGICA (BRMS)	16
2.2 ATIVIDADE BIOLÓGICA DE POLISSACARÍDEOS	17
2.3 ATIVAÇÃO DO SISTEMA IMUNE POR POLISSACARÍDEOS	19
2.4 MACRÓFAGOS	21
2.4.1 “Burst” respiratório	25
2.4.2 Produção de NO [•] e TNF- α	27
2.5 EFEITO ANTITUMORAL DE POLISSACARÍDEOS	29
3. OBJETIVOS	32
4. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL	33
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
5.1 MATERIAIS E REAGENTES	34
5.2 MEIOS E SOLUÇÕES	35
5.2.1 Meio MEM.....	35
5.2.2 Meio DMEM.....	35
5.2.3 Solução Salina Tamponada (PBS)	36
5.2.4 Solução Salina Balanceada de Hanks (HBSS)	36
5.2.5 Solução de Tripsina-EDTA	37
5.3 PROCEDIMENTO DE ESTERILIZAÇÃO DE MATERIAL.....	37
5.4 PROCEDIMENTOS DE CULTIVO E MANUTENÇÃO DE CÉLULAS.....	38
5.4.1 Macrófagos RAW 264.7	38
5.4.2 Macrófagos Peritoneais de Camundongos	39
5.4.3 Células HeLa.....	40
5.5 COLETA E CONTAGEM DE CÉLULAS	41
5.6 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	41
5.6.1 Dosagem de carboidratos totais	41
5.6.2 Determinação da viabilidade celular	42
5.6.3 Determinação da proliferação celular pelo método do cristal violeta.....	42
5.6.4 Microscopia óptica	43
5.6.5 Atividade fagocítica.....	44
5.6.6 Produção de NO [•]	44

5.6.7 Determinação do consumo de oxigênio	45
5.6.8 Determinação de piruvato e lactato	46
5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
6.1 POLISSACARÍDEOS	48
6.1.1 Polissacarídeo do Exsudato do Fruto da Paineira (PEP).....	48
6.1.2 Xiloglucana de Jatobá (XGJ).....	48
6.2. EFEITO DOS POLISSACARÍDEOS SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE MACRÓFAGOS RAW 264.7, MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS E CÉLULAS HELA	49
6.3 EFEITO DOS POLISSACARÍDEOS SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR DE MACRÓFAGOS RAW 264.7 E CÉLULAS HELA.....	54
6.4 EFEITO DOS POLISSACARÍDEOS SOBRE A MORFOLOGIA DE MACRÓFAGOS RAW 264.7 E CÉLULAS HELA	60
6.5 EFEITO DOS POLISSACARÍDEOS SOBRE A ATIVIDADE FAGOCÍTICA DE MACRÓFAGOS RAW 264.7.....	65
6.6 EFEITOS DE PEP SOBRE A PRODUÇÃO DE NO [•] POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGO	70
6.7 EFEITOS DE XGJ SOBRE ALGUNS PARÂMETROS DO METABOLISMO OXIDATIVO DE CÉLULAS HELA	72
CONCLUSÕES.....	79
REFERÊNCIAS.....	80
ANEXO	95

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Modelos *in vitro* para estudo de polissacarídeos com atividades antitumorais avaliam seus efeitos citotóxicos diretamente sobre o tumor, bem como sua capacidade de alterar o metabolismo de células tumorais. Neste sentido, as células HeLa têm sido utilizadas extensivamente (CARNEIRO-LEÃO *et al.*, 1997; STEVAN *et al.*, 2001; STUELP-CAMPELO *et al.*, 2002; MORETÃO, 2004).

Já em relação à atividade imunomoduladora, o uso de macrófagos tem se mostrado um modelo adequado para a realização de experimentos tanto *in vitro* como *in vivo*, uma vez que estas células são amplamente distribuídas nos diferentes tecidos, sendo responsáveis por processos homeostáticos, imunológicos e antiinflamatórios (ABBAS; LITCHTMAN, 2005). Já foram caracterizadas algumas respostas de macrófagos frente a diferentes polissacarídeos, entre estas se destacam alterações na capacidade fagocítica, no “burst” respiratório - o que resultou em alterações na produção de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), alterações na produção de óxido nítrico (NO^{\cdot}), bem como do fator de necrose tumoral alfa ($TNF-\alpha$) (MORETÃO *et al.*, 2003; MORETÃO *et al.*, 2004; SCHEPETKIN; QUINN, 2006; KLIMP *et al.*, 2002).

Em estudos utilizando polissacarídeos ácidos isolados de diferentes fontes verificou-se que foram capazes de promover aumento na produção de óxido nítrico, ânion superóxido, fator de necrose tumoral alfa e interleucina 6, assim como a ativação do fator $NF-\kappa\beta$ (SCHEPETKIN *et al.*, 2009), melhorar atividade antioxidante (YANG *et al.*, 2007) em macrófagos de camundongo e efeito anti-inflamatório em condrócitos humanos (PANICO *et al.*, 2007). Xiloglucanas promoveram aumento da capacidade fagocítica e “burst” respiratório em monócitos humanos (PAULY; FREIS; PAULY, 1999); atividade antiviral contra o vírus da rubéola (MASTROMARINO *et al.*, 1997) e efeitos inibitórios no crescimento de células de células tumorais humanas COLO 201 (KATO *et al.*, 2001).

Estudos anteriores realizados por Carneiro (2000) avaliaram a atividade antifúngica do polissacarídeo obtido do exsudato do fruto da Paineira (*Chorisia speciosa*), no entanto, não foram obtidos resultados que comprovassem tal efeito. Por sua vez, Rosário *et al.* (2008), avaliando os efeitos da xiloglucana de reserva do Jatobá (*Hymenaea courbaril*) sobre macrófagos peritoneais de camundongos, demonstraram o aumento na produção de óxido nítrico e da atividade elicitora de células para a cavidade peritoneal em camundongos em resposta ao polissacarídeo.

Considerando os efeitos já observados em estudos anteriores, no presente estudo, uma ramnogalactanana ácida obtida do exsudato do fruto de *Chorisia speciosa* (Paineira), e uma xiloglucana de reserva extraída da semente de *Hymenaea courbaril* (Jatobá), previamente isoladas e caracterizadas pelo Grupo de Química de Carboidratos Vegetais desta Universidade (CARNEIRO *et al.*, 1999; BUSATO *et al.*, 2001 e 2005; ROSÁRIO, 2006), foram avaliadas em relação as suas potenciais propriedades imunomoduladoras e citotóxicas. Para tanto, foram utilizados três modelos experimentais *in vitro*: macrófagos da linhagem RAW 264.7, macrófagos peritoneais de camundongos e células tumorais de cérvix uterino humano (células HeLa).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MODIFICADORES DE RESPOSTA BIOLÓGICA (BRMS)

Segundo Abbas e Lichtman (2005), modificadores de resposta biológica (BRMs – “Biological Response Modifiers”) são moléculas utilizadas clinicamente como moduladores da inflamação, imunidade e hematopoiese, atuando como ativadores ou supressores da resposta de células do sistema imune como macrófagos e monócitos, neutrófilos, células “Natural Killer” (NK), eosinófilos e linfócitos. Os principais efeitos biológicos promovidos pelos BRMs são atividades antitumoral, antiviral, antifúngica, antiparasitária, antibacteriana e anticoagulante (FENG *et al.*, 2003; POLESHKO *et al.*, 2008; EL-HASAN *et al.*, 2009; VÁZQUEZ-LÓPEZ, 2001; HU *et al.*, 2006; MENDES *et al.*, 2009).

Os BRMs considerados endógenos como interferon, citocinas ou interleucinas (quando produzidos por leucócitos), fatores de crescimento, alguns tipos de fatores estimuladores de colônia (CFS, GM-CSF, G-CSF), além de imunoconjugados com toxinas, imunoconjugados com drogas citotóxicas e imunoconjugados com isótopos reativos são utilizados em diversas terapias (STAHEL; SMITH; MOORE, 2007; SCHILLER *et al.*, 2006; AMATO, 2005; REANG; GUPTA; KOHLI, 2006).

Estudos têm demonstrado que ácidos nucleicos, lipídios, proteínas e polissacarídeos, derivados de bactérias, fungos, algas marrons e plantas fotossintéticas, podem atuar como BRMs exógenos, ligando-se aos mesmos receptores para BRMs endógenos (KWOK *et al.*, 2001; KITAJMA, 2000; PONCE *et al.*, 2003; NI *et al.*, 2004; SAIMA *et al.*, 2000). Tal efeito pode resultar em atividade antitumoral por aumentar a resposta imunológica, ao induzir a produção de mediadores que atuarão como moléculas efetoras contra as células tumorais.

2.2 ATIVIDADE BIOLÓGICA DE POLISSACARÍDEOS

Polissacarídeos com comprovada atividade biológica podem ser obtidos de diferentes fontes como bactérias, fungos e plantas (KWOK *et al.*, 2001; KITAJMA, 2000; SAIMA *et al.*, 2000). Dentre os estudos visando avaliar as atividades biológicas de polissacarídeos, destacam-se aqueles nos quais os polissacarídeos comprovadamente apresentaram efeitos sobre a ativação de células do sistema imune - em especial os macrófagos, sendo considerados como imunomoduladores e, também efeitos antitumorais (ROSENBERG, 1993; BOHN; BeMILLER, 1995). Além destes, há registros de polissacarídeos considerados farmacologicamente ativos por apresentarem atividades antiviral (TALARICO *et al.*, 2004), antibacteriana (XIE *et al.*, 2002), antiparasitária (NATHAN, 1985), leishmanicida (NOLETO *et al.*, 2002; BARROSO *et al.*, 2007), antitussígena (KARDOSOVÁ *et al.*, 2004), reguladora intestinal (SANZ *et al.*, 2005) e anticoagulante (MARTINICHEN-HERRERO *et al.*, 2005).

A estrutura de polissacarídeos considerados BRMs é bastante variada, podendo ser constituída por diferentes monossacarídeos. Além da diversidade monossacarídica podem apresentar grupos fosfato, acetil, carboxílicos, sulfatos, peptídeos e lipídeos. O tipo de ligação glicosídica também varia podendo ser α -, β -, (1 \rightarrow 2), (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4) ou (1 \rightarrow 6) (LEUNG *et al.*, 2004).

As β -glucanas, isoladas de bactérias, fungos e plantas são os polissacarídeos mais estudados quanto às atividades imunológicas e antitumorais. (YAN *et al.*, 1999; WILMETT; GORDON; BROWN, 2001). A β -glucana conhecida como lentinana, derivada de cogumelo e a “schizophyllan” de culturas filtradas do *Schizophyllum commune* têm sido utilizadas em pacientes para imunoterapia tumoral. O mecanismo de ação sugerido envolve a estimulação das células de defesa do hospedeiro, como macrófagos, neutrófilos e células “Natural Killer” (NK), a eliminar células tumorais (YAN, J. *et al.*, 1999). Além dos efeitos antitumorais, as β -glucanas apresentam atividades antibacteriana, antiviral e anticoagulante (BOHN; BeMILLER, 1995).

Alguns estudos sugerem que as β -glucanas podem promover respostas célula-T específicas, desencadeando a secreção de interferon gama (IFN- γ), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8) e interleucina 12 (IL-12) de macrófagos, neutrófilos e células NK (WILLMENT; GORDON; BROWN, 2001).

Para as α -glucanas, embora menos estudadas quando comparadas às β -glucanas, foi verificado que algumas moléculas são capazes de gerar respostas positivas sobre macrófagos, células HeLa e Sarcoma 180 como àquelas estudadas por Carneiro-Leão *et al.* (1997) e Stuelp-Campelo *et al.* (2002).

Polissacarídeos sulfatados, naturalmente ou quimicamente, têm sido descritos como moléculas antivirais, além de serem utilizados na terapêutica ou profilaxia de distúrbios tromboticos (MOURÃO *et al.*, 2001; ALBAN; SCHAUERTE; FRANZ, 2002). Além de polissacarídeos nativos, aqueles obtidos por modificação química e/ou introdução de novos grupos também são estudados como BRMs (MELLINGER *et al.*, 2008; MENDES *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2009). Recentemente, têm sido desenvolvidos estudos da complexação de diferentes polissacarídeos com vanádio, visando obter moléculas com maior efeito biológico (NOLETO *et al.*, 2009, 2004, 2002). Noleto e colaboradores (2002, 2004) caracterizaram a complexação de uma manana de *Saccharomyces cerevisiae* e uma galactomanana do líquen *Ramalina celastri* com o íon vanadilo. Ambos os polissacarídeos não-complexados apresentaram atividade biológica em macrófagos peritoneais de camundongos, aumentando a produção de óxido nítrico em até 55% para a manana e em até 40% para galactomanana, seus complexos, no entanto, não induziram nenhum efeito. Ambas as formas complexada e não complexada da galactomanana apresentaram significativo efeito sobre a forma amastigota de *Leishmania amazonensis*, porém apenas a forma complexada com o íon vanádio inibiu o crescimento da forma promastigota. Noleto *et al.* (2009), avaliando os efeitos do tratamento de duas preparações de galactomananas (GALMAN A e B) extraídas das sementes de *Mimosa scabrella* (bracatinga) e complexadas ao oxovanádium (VO^{2+} / VO^{3+}) sobre células HeLa. Os autores observaram quando complexadas ambas inibiram a proliferação celular em ~60%.

2.3 ATIVAÇÃO DO SISTEMA IMUNE POR POLISSACARÍDEOS

Imunomoduladores podem ser divididos em três classes gerais, baseando-se em sua origem e interação com o sistema imune. A primeira consiste em produtos celulares de mamíferos (tipicamente proteínas) que seletivamente melhoram a atividade de células específicas no sistema linfóide hematopoiético. A segunda em substâncias isoladas e purificadas de microorganismos ou fluidos de culturas microbianas. A terceira classe de imunomoduladores são os BRMs, que têm sido importantes ferramentas para definição de mecanismos da defesa do hospedeiro (TOKUNAKA *et al.*, 2000). Neste contexto, alguns polissacarídeos têm sido descritos como imunomoduladores com atividade específica para células T e células apresentadoras de antígeno, como monócitos e macrófagos (ADAMS *et al.*, 1997; BABINEAU *et al.*, 1994; CLEARY; KELLY; HUSBAND, 1999).

Estudos realizados em camundongos mostraram que o tratamento com β -glucanas de diversas massas molares, foi capaz de induzir ativação celular peritoneal. O tratamento com esses polímeros resultou no aumento de neutrófilos e eosinófilos e na alteração morfológica de macrófagos. Os macrófagos tratados com as glucanas também promoveram aumento na atividade fosfatase e na produção de NO^* (CLEARY; KELLY; HUSBAND, 1999; LI *et al.*, 2006; SATO *et al.*, 2006; DYKEN *et al.*, 2009; YADAV; SCHOREY, 2006; BROWN *et al.*, 2003).

Mananas de *Candida albicans* também exibiram propriedades imunomoduladoras. Os autores demonstraram que a função destas mananas seria a ligação a receptores de manose presente nos macrófagos e a conseqüente ativação do sistema imune do hospedeiro, induzindo a endocitose e a fagocitose, o que por sua vez, desencadearia a produção de citocinas e ativação do sistema complemento (ADEREM; UNDERHILL, 1999).

Macrófagos quando ativados por polissacarídeos podem desencadear diferentes respostas, como aumento na produção de $\text{O}_2^{\cdot-}$ e NO^* , atividade elicitora de células para a cavidade peritoneal e aumento da capacidade fagocítica (MORETÃO *et al.*, 2003; 2004; MELLINGER *et al.*, 2005).

Neste contexto, foi descrito que a glucomanana conhecida pelo nome comercial “zymosan”, obtida a partir da parede celular de leveduras, é capaz de induzir o “burst” respiratório em macrófagos (WILLIAMS *et al.*, 1986; BADWAY; KARNOVSKI, 1980; BERTON; GORDON, 1983)

Estudo realizado por Tokunaka *et al.* (2000) mostraram que a β -D-glucana extraída do fungo *Candida albicans* promoveu diversos efeitos sobre macrófagos, entre estes: aumento da síntese de IL-6; aumento da produção de NO^{\bullet} ; ativação da via alternativa do sistema complemento; e efeito antitumoral no diminuindo o desenvolvimento da ascite causada por tumor. Por sua vez, Jeon *et al.* (1999 e 2001) mostraram que o polissacarídeo péctico angelana, isolado da raiz da Umbelliferae *Angelica gigas*, constituído por arabinose, galactose e ácido urônico, apresentou atividade imunoestimulante ativando seletivamente células B e macrófagos, mas não células T. Este polissacarídeo é considerado um potente mimetizador do efeito de lipopolissacarídeo (LPS) em macrófagos, estimulando a produção de citocinas, espécies reativas de oxigênio/nitrogênio e fator nuclear kappa beta (NF- κ B).

Galactomananas e mananas também são descritas como ativadoras das funções de macrófagos, aumentando a atividade fagocítica e a produção de NO^{\bullet} (RAMESH; YAMAKI; TSUSHIDA, 2002; NOLETO *et al.*, 2002, 2004).

As xiloglucanas são outros polissacarídeos que despertam interesse a respeito de suas atividades biológicas. A xiloglucana isolada de sementes de *Tamarindus indica* promoveu o aumento da capacidade fagocítica em monócitos humanos e ativou o “burst” respiratório (PAULY; FREIS; PAULY, 1999). E as xiloglucanas extraídas de *Copaifera langsdorffii* (XGC), *Hymenaea courbaril* (XGJ) e *Mucuna sloanei* (XGM) apresentaram atividade elicitora de células para a cavidade peritoneal de camundongos, chegando a promover um aumento de ~576% em relação ao controle. XGC e XGJ também estimularam a produção de NO^{\bullet} em macrófagos peritoneais de camundongos (ROSÁRIO *et al.*, 2008).

O polissacarídeo ácido presente na goma de angico branco (*Anadenanthera colubrina*), constituído por arabinose, manose, galactose, ramnose e ácido hexurônico, com a cadeia principal de (1 \rightarrow 3)- β -galactopiranosose altamente ramificada, mostrou

atividade tanto *in vitro* quanto *in vivo*, ativando macrófagos e aumentando tanto sua capacidade fagocítica como a produção de O_2^- (MORETÃO *et al.*, 2003).

2.4 MACRÓFAGOS

Os macrófagos são células fagocitárias que fazem parte do sistema fagocitário mononuclear e são componentes do sistema imunológico natural. Eles se originam na medula óssea, circulam no sangue, amadurecem e tornam-se ativados em vários tecidos. São chamados de monócitos ao deixar a medula óssea e ao entrar no sangue periférico. Nos tecidos, eles amadurecem e tornam-se macrófagos. Eles são residentes no tecido conjuntivo subepitelial (células de Langerhans), no interstício dos órgãos parenquimatosos, no revestimento dos sinusóides vasculares do fígado (células de Kupffer) e do baço, e nos seios linfáticos dos linfonodos (KRISHNATRY; BRAZEAU; FUNG, 2009; BEUTLER, 2004; MA *et al.*, 2003).

Considerando as diferentes localizações, as principais funções dos macrófagos são de fagocitar microorganismos e de produzir citocinas que irão promover o recrutamento e a ativação de outras células inflamatórias. Como células acessórias na imunidade adquirida, os macrófagos exibem o antígeno em uma forma que possam ser reconhecidos pelos linfócitos T e secretam proteínas de membrana, para a ativação de linfócitos T. Na imunidade celular, as células T estimuladas pelo antígeno ativam os macrófagos para destruírem os microorganismos e promovem a fagocitose dessas vias receptoras para anticorpos na superfície dos macrófagos (MARTINEZ; HELMING; GORDON, 2009; ABBAS; LICHTMAN, 2005; BEUTLER, 2004).

Em resposta ao processo de fagocitose os macrófagos apresentam antígenos específicos na sua superfície, os quais são reconhecidos pelos linfócitos T, que produzem linfocinas ativando os linfócitos B a produzirem e liberarem anticorpos específicos aos antígenos apresentados pelos macrófagos. Além de apresentarem antígenos, os macrófagos ativados produzem, secretam e respondem a diversos mediadores inflamatórios, citocinas, além de proteases e fatores de crescimento importantes no reparo de tecidos (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Estas células são classificadas em três grupos funcionais: 1) macrófagos residentes, que são derivados da cavidade peritoneal sem estímulo prévio; 2) macrófagos elicitados, recrutados para a cavidade peritoneal como resposta a um agente inflamatório não-específico, como por exemplo, agentes químicos (tioglicolato de sódio); 3) macrófagos ativados, recrutados para a cavidade por uma infecção como por *Bacillus Calmette Guerin* (BCG), o qual produz um exsudato rico em citocinas (COHN, 1978; CRAWFORD *et al.*, 1987; MACKAY; RUSSELL, 1986; KLIMP *et al.*, 2002).

Uma vez ativados, os macrófagos podem então realizar a fagocitose, um processo de englobamento de partículas grandes dependente do citoesqueleto, mediado por receptores específicos expressos na superfície celular. O fagócito utiliza os receptores de superfície para se ligar a um microorganismo e envolvê-lo, formando uma vesícula chamada fagossomo. Os receptores de superfície também liberam sinais que estimulam a fusão dos fagossomos com os lisossomos e sinais ativadores da atividade antimicrobiana, que desencadeia o “burst” respiratório e a produção de óxido nítrico, com o objetivo de destruir e eliminar os elementos fagocitados, bem como os invasores (BEUTLER, 2004; MARCINKIEWICZ, 1997; HALLIWELL; GUTERIDGE, 1999).

Existem várias classes de receptores de fagócitos que se ligam a microorganismos e medeiam sua internalização. Dentre eles, os receptores de manose, receptores "scavenger", receptores de dectina-1, receptores para opsoninas, receptor CD14, receptor de complemento 3, receptores de lectinas e os receptores “Toll like” (SCHEPETKIN; QUINN, 2006; TAYLOR *et al.*, 2005; MA *et al.*, 2003; MOSSER, 2003). Além do processo de fagocitose, macrófagos podem ser ativados via estes mesmos receptores através da ligação de um ligante que irá promover a ativação de diferentes vias de sinalização intracelular, o que resultará na produção e secreção de diferentes substâncias como citocinas, quimiocinas, entre outras (ref.).

As citocinas e quimiocinas produzidas e secretadas por macrófagos ativados são proteínas de baixo peso molecular, cuja função é realizar a comunicação entre as células do sistema imune, via receptores específicos da superfície celular. Entre as

citocinas secretadas pelos macrófagos destacam-se, o TNF- α , produzido em resposta à ativação do NF- κ B; as interleucinas (IL-1b, IL-1a, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15) que são pró-inflamatórias e imunoreguladoras e secretadas em resposta a ativação de macrófagos por endotoxinas, exotoxinas, enterotoxinas e peptidoglicanas, e por componentes bacterianos solúveis (MARTINEZ; HELMING; GORDON, 2009). Um dos principais agentes indutores da produção de citocinas é o LPS bacteriano, produto de bactérias Gram-negativas, um potente estimulador das respostas imunes inatas que acentua a morte das bactérias (MARTINEZ; HELMING; GORDON, 2009; BEUTLER, 2004; KLIMP *et al.*, 2002).

Na FIGURA 1 estão representados alguns dos receptores mais conhecidos como alvo de ligação por polissacarídeos, assim como as vias de sinalização envolvidas na ativação de macrófagos. Após a ligação com receptor, os polissacarídeos podem alterar a atividade de macrófagos, produzindo respostas tais como aumento da produção de citocinas e quimiocinas, espécies reativas de oxigênio e aumento da proliferação celular (FIGURA 2).

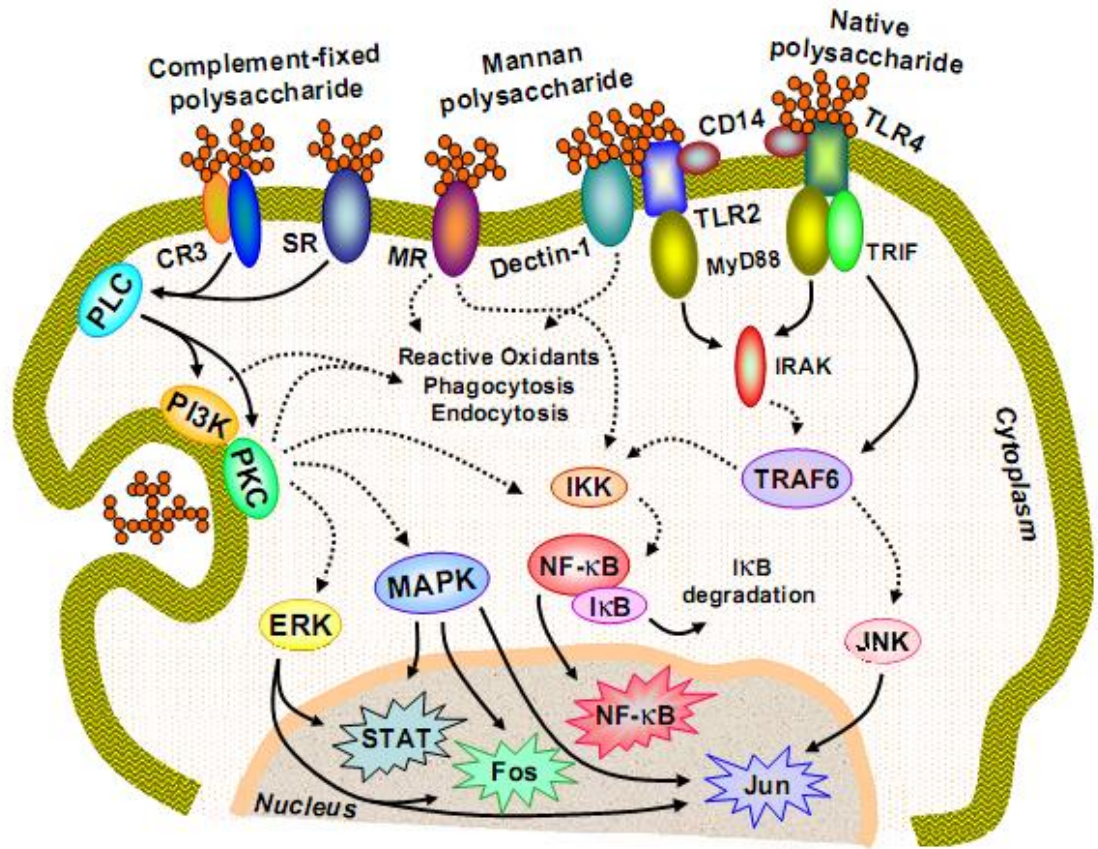


FIGURA 1 – MODELO ESQUEMÁTICO ILUSTRANDO POTENCIAIS VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS NA ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS POR POLISSACARÍDEOS.

FONTE: SCHEPETKIN E QUINN (2006).

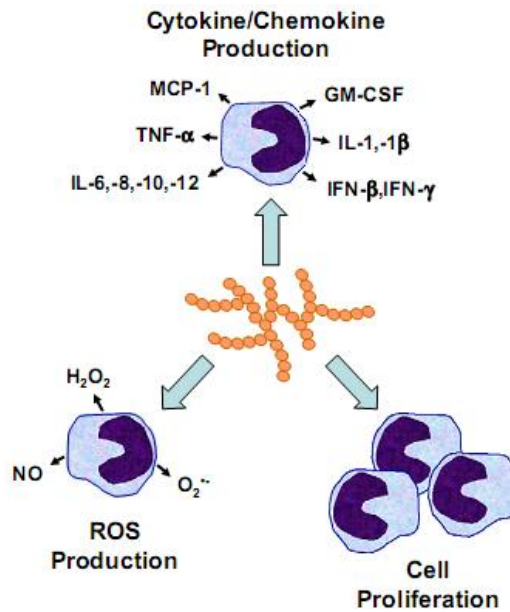
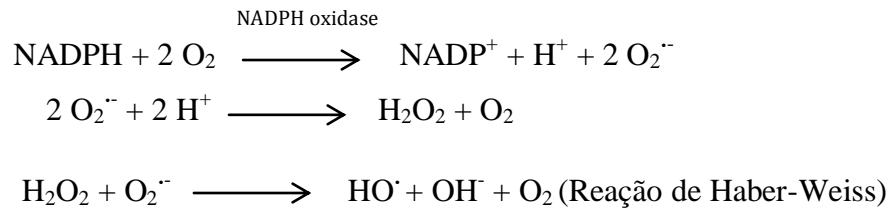


FIGURA 2 – POLISSACARÍDEOS PODEM ATIVAR UMA VARIEDADE DE RESPOSTAS DE MACRÓFAGOS.

FONTE: SCHEPETKIN E QUINN (2006).

2.4.1 “Burst” respiratório

O “burst” respiratório, mecanismo dependente de oxigênio, é o processo pelo qual células fagocíticas (neutrófilos e macrófagos) são capazes de matar microorganismos invasores. Através da ligação de compostos aos receptores da superfície de fagócitos, há um aumento no consumo de oxigênio, resultante da ativação do complexo enzimático NADPH oxidase que catalisa a redução do oxigênio a $O_2^{\cdot -}$, tendo como doador de elétrons o NADPH (FIGURA 3). A seguir, o $O_2^{\cdot -}$ é convertido a H_2O_2 pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD) (KLEBANOFF, 1992; BEUTLER, 2004). As reações catalisadas pela NADPH oxidase e pela SOD são descritas a seguir:



Em macrófagos não ativados, a NADPH-oxidase está inativa e encontra-se na parte citosólica da célula, sendo rapidamente ativada quando os macrófagos são estimulados por agentes apropriados como cadeias peptídicas de microorganismos, como ésteres de forbol (PMA) ou *N*-formilmetionilleucilfenilalanina (fMLP2) (MACMICKING, 2009). Quando a célula está ativada, o complexo NADH-oxidase é transferido para a membrana plasmática, onde se liga ao citocromo b558, o qual possui como grupo prostético a flavoproteína contendo FAD, para assim formar a NADPH oxidase ativa (FIGURA 3). (MA *et al.*, 2003; SEGAL; ABO, 1993; BABIOR, 1992). Outros agentes que podem que podem estimular o complexo NADH-oxidase na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) destacam-se o LPS, IFN- γ e o muramil dipeptídio da parede celular bacteriana, os quais também potencializam a resposta destas células ao estímulo do qual originou o “burst” respiratório

(HALLIWELL ; GUTTERIDGE, 1999; BEUTLER, 2004; MACMICKING, 2009; MARTINEZ; HELMING; GORDON, 2009).

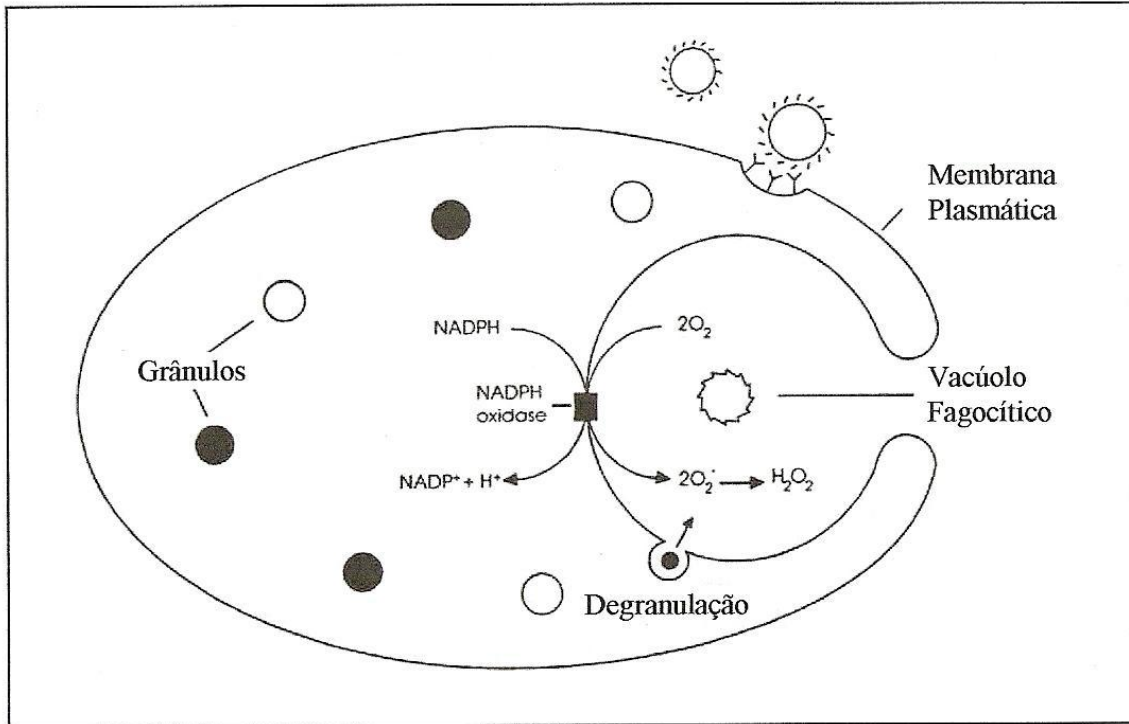


FIGURA 3 - ATIVAÇÃO DO COMPLEXO ENZIMÁTICO NADPH OXIDASE QUE CATALISA REDUÇÃO DO OXIGÊNIO A ÂNION SUPERÓXIDO ($O_2^{\cdot-}$) TENDO COMO DOADOR DE ELÉTRONS O NADPH

FONTE: SEGAL e ABO (1993).

Os produtos obtidos do “burst” respiratório, como o $O_2^{\cdot-}$ e o H_2O_2 , não são por si só oxidantes reativos, mas são substratos para geração de outras espécies reativas de oxigênio mais violentas, como radical hidroxila (via reação de Fenton, catalizada por ferro) ou halogênios reativos (ácido hipocloroso, hipoclorito gerando oxigênio singlete), capazes de destruir os patógenos fagocitados ou presentes no meio extracelular (BEUTLER, 2004).

2.4.2 Produção de NO[•] e TNF- α

O NO[•], um gás altamente permeável a membranas, é produzido por diferentes tipos de células, tais como células endoteliais vasculares, neurônios, células epiteliais do trato respiratório, fibroblastos, hepatócitos e macrófagos (SONG *et al.*, 2002).

A síntese de NO[•] ocorre a partir do átomo de nitrogênio do grupo guanidino do aminoácido L-arginina, em uma reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) e é dependente de oxigênio molecular (KLIMP *et al.*, 2001; MA *et al.*, 2003). Esta enzima possui uma região C-terminal redutase com distintos sítios de ligação para FAD, FMN e NADPH e um domínio N-terminal oxidase, o qual contém grupo heme ligado e um sítio para o cofator tetrahydrobiopterina (MAYER; HEMMENS, 1997). As duas reações sequenciais encontram-se representadas na FIGURA 4.

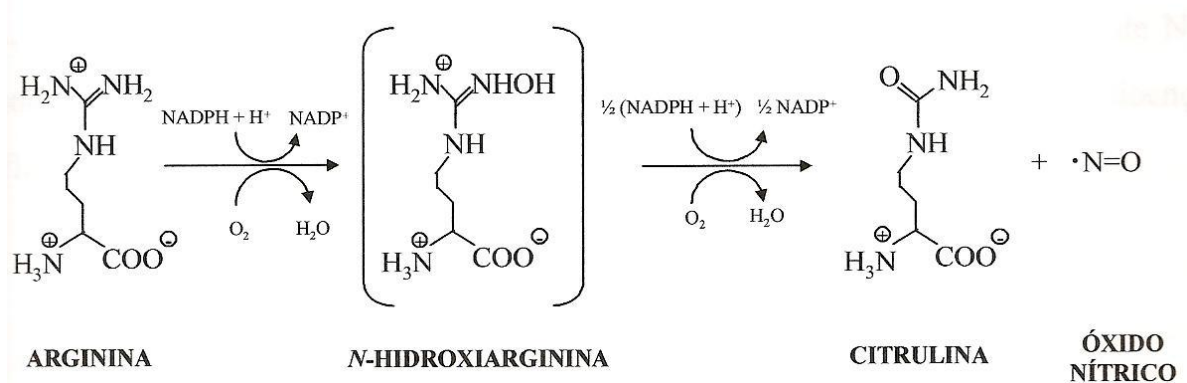


FIGURA 4 - SÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO

FONTE: MAYER E HEMMENS (1997).

A óxido nítrico sintase induzível (iNOS), encontrada nos macrófagos, apresenta uma molécula de calmodulina fortemente ligada, responsável por mantê-la em uma conformação ativa, sendo sua regulação dependente de cálcio. O aumento na transcrição do gene para esta forma da enzima é observado em resposta a estímulos por citocinas, bactérias ou produtos bacterianos (MONCADA *et al.*, 1991; KLIMP *et al.*, 2001; MACMICKING, 2009).

O NO[•] produzido por macrófagos desenvolve um papel importante em processos patológicos, como a defesa antimicrobiana, inflamação e angiogênese (MACMICKING *et al.*, 1997; KRISHNATRY; BRAZEAU; FUNG, 2009).

O efeito citotóxico em microorganismos invasores não é desempenhado pelo NO[•]. Dentro dos fagolisossomos, o NO[•] se combina com O₂⁻ para produzir peroxinitrito, que é altamente reativo e microbicida, tendo seu produto final o nitrito e nitrato (ABBAS; LITCHMAN, 2005; BEUTLER, 2004; KLIMP, 2002).

O TNF- α foi descoberto por CARSWELL e colaboradores (1975) no soro de camundongos infectados com o Bacillus Camette-Guerin (BCG). Eles identificaram o TNF- α como uma proteína do soro derivada de macrófagos ativadas, estimulados por endotoxina, e capazes de causar lise em células tumorais *in vivo* (SOUBA, 1994).

A principal fonte de TNF- α provém de fagócitos mononucleares ativados. Ele é sintetizado como proteína de membrana tipo II não-glicosilada, com uma extremidade aminoterminal intracelular e uma grande extremidade carboxiterminal extracelular. Sua principal função fisiológica é estimular o recrutamento de neutrófilos e monócitos para locais de infecção e ativar essas células para erradicar microorganismos (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

O mecanismo pelo qual o TNF- α é capaz de lisar células tumorais envolve sua ligação a receptores específicos: o receptor do tipo 1 (TNF-R1) e do tipo 2 (TNF-R2) (KLIMP *et al.*, 2002). Quando o TNF se liga ao TNF-R1 ocorre a indução à toxicidade, à atividade antiviral, à proliferação de fibroblastos e indução do NF- κ B, eventos que resultam na ativação das caspases e apoptose (CURTIN *et al.*, 2002). A ligação do TNF- α ao TNF-R2 induz à proliferação de linfócitos T citotóxicos e tímócitos (TARTAGLIA *et al.*, 1993; BEINKE; LEY, 2004).

O TNF- α também participa do aumento da citotoxicidade mediada por monócitos e da atividade citolítica de células NK. Quando produzido em pequenas quantidades, o TNF- α exerce um grande número de atividades biológicas relacionadas ao controle da proliferação e diferenciação celular, regulação da interação das citocinas, interação com outros mediadores da resposta ao estresse, e mediação da resposta aguda à injúria tecidual. Em níveis elevados, leva à progressão para a

caquexia, injúria tecidual, choque irreversível e morte (SOUBA, 1994, MA *et al.*, 2003).

O LPS é o mais importante estimulador da liberação de NO[•] e TNF- α por macrófagos, sendo este considerado como mediador primário dos efeitos sistêmicos da endotoxina (MA *et al.*, 2003; BEINKE; LEY, 2004; BEUTLER, 2004). Outros compostos também podem estimular macrófagos a produzir NO[•] e TNF- α , entre estes, determinados polissacarídeos (ZHA; LUO; JIANG, 2007; AHMADI; RIAZIPOUR, 2007; SON *et al.*, 2007).

2.5 EFEITO ANTITUMORAL DE POLISSACARÍDEOS

O câncer é tratado convencionalmente por radioterapia, cirurgia, quimioterapia, imunoterapia ou pela combinação destes. No entanto, há um crescente interesse no uso da medicina complementar, visando um melhor prognóstico e qualidade de vida dos pacientes. Neste sentido, polissacarídeos imunomoduladores podem melhorar ou restaurar a imunidade do hospedeiro contra a progressão do tumor (LEUNG *et al.*, 2004; KONO *et al.*, 2008; TSUJITANI *et al.*, 2008; DENG *et al.*, 2009).

Vários autores têm tentado estabelecer uma correlação entre a estrutura química de carboidratos e a atividade antitumoral. Entre os fatores que podem influenciar a atividade antitumoral, podem ser citados: **A.** Estrutura da cadeia principal; **B.** Grau de ramificação; **C.** Presença de grupos substituintes; **D.** Massa molar; e, **E.** Conformação (BOHN; BeMILLER, 1995).

O primeiro relato sobre a atividade antitumoral de polissacarídeos é de um estudo realizado por Bradner *et al.*(1958), citado por Bohn e Bemiller (1995) onde o “zymosan”, nas doses de 5 e 10 mg.kg⁻¹ foi eficaz contra o Sarcoma 180. Os autores também observaram que as frações testadas apresentavam baixa toxicidade *in vivo*.

Em 1986, Mizuno *et al.* estabeleceram uma classificação para a atividade antitumoral baseada nos valores de inibição do crescimento tumoral, expressos em

percentual: 0-25%, sem atividade; entre 26 - 50%, regular; 51-75%, efetiva; 76 - 95%, consideravelmente efetiva; e, 96 - 100%, muito efetiva.

Aplicando-se a classificação de Mizuno *et al.* (1986), para as heteroglicanas neutras, como a fração F-III-2b extraída do fungo *Hericium erinaceum* e a fração F-III-1b de *Tricholma giganteum*, a atividade antitumoral é consideravelmente efetiva. A fração F-III-2b constituída de um complexo galacto-xiloglucana com ligações (1→3) e (1→6) continha 20% de proteína. Esta glicana inibiu o crescimento de células tumorais S-180 em 76%, na dose de 10 mg.kg⁻¹. Já a fração F-III-1-b, um complexo proteína-polissacarídeo (1:1,6), cuja porção polissacarídica apresentou unidades de xilose, galactose, manose e glucose (1:1,7:3,3:5,3), inibiu o desenvolvimento do S-180 em 86% na dose de 10 mg.kg⁻¹. (MIZUNO *et al.*, 1995).

Ainda neste contexto, a fração S1-A, extraída das folhas de *Cassia angustifolia* inibiu o crescimento do S-180 em 52%, utilizando-se 5 mg.kg⁻¹. Este polissacarídeo, uma arabinogalactana, apresentava ácido galacturônico e unidades de arabinose ligados (1→3) e (1→5) e substituídos em O-2, unidades de ramnose ligadas (1→2) e substituídas em O-4, além de Gal (1→3) e (1→6) ligadas (MULLER *et al.*, 1989). Uma arabinogalactana ácida contendo Ara, Gal, GalA e Rha (5,5:1,4:1,1:1), extraída de *Angelica acutiloba* aumentou a sobrevivência dos animais portadores de S-180 em 76% (YAMADA *et al.*, 1990).

Efeitos citotóxicos sobre células HeLa também foram descritos para uma α -glucana isolada do líquen *Ramalina celastri*, cuja estrutura principal inclui ligações (1→3) e (1→4) alternadas na proporção 3:1 (CARNEIRO-LEÃO *et al.*, 1997). Quando injetada intraperitonealmente, esta α -glucana promoveu o recrutamento de macrófagos para a cavidade peritoneal de camundongos, ativando-os e aumentando a produção de H₂O₂ e a capacidade fagocítica (STUELP-CAMPELO *et al.*, 2002).

Macrófagos extraídos de animais tratados *in vivo* com uma arabinogalactana isolada da goma da árvore leguminosa nativa *Anadenanthera colubrina* (ARAGAL), foram capazes de inibir o crescimento em ~39% de células do Sarcoma-180, detectada quando os animais foram tratados com 100 mg.kg⁻¹ e uma inibição do crescimento de

66% detectada nos animais portadores de tumor ascítico do S-180 tratados com a mesma dose (MORETÃO *et al.*, 2004).

Kato *et al.* (2001) observaram que xiloglucanas extraídas da parede celular de diversas frutas comerciais e seus oligossacarídeos mostraram efeitos inibitórios no crescimento de células tumorais humanas COLO 201 e constataram que este efeito nas células provavelmente é dependente da cadeia lateral (fucose e/ou galactose) das xiloglucanas.

3. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo geral avaliar os efeitos imunomoduladores e citotóxicos do polissacarídeo isolado do exsudato do fruto da Paineira (PEP) e da xiloglucana de reserva do Jatobá (XGJ) utilizando como modelos celulares macrófagos da linhagem RAW 264.7, macrófagos peritoneais de camundongos e células HeLa. Para tanto foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos. Avaliar:

- A citotoxicidade dos polissacarídeos sobre macrófagos da linhagem RAW 264.7, macrófagos peritoneais de camundongos e células HeLa;
- Os efeitos dos polissacarídeos sobre atividades relacionadas à ativação de macrófagos da linhagem RAW 264.7;
- Os efeitos de PEP sobre atividades relacionadas à ativação de macrófagos peritoneais de camundongos;
- Os efeitos dos polissacarídeos sobre a morfologia dos macrófagos RAW 264.7 e células HeLa;
- Os efeitos da XGJ sobre o metabolismo oxidativo de células HeLa.

4. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

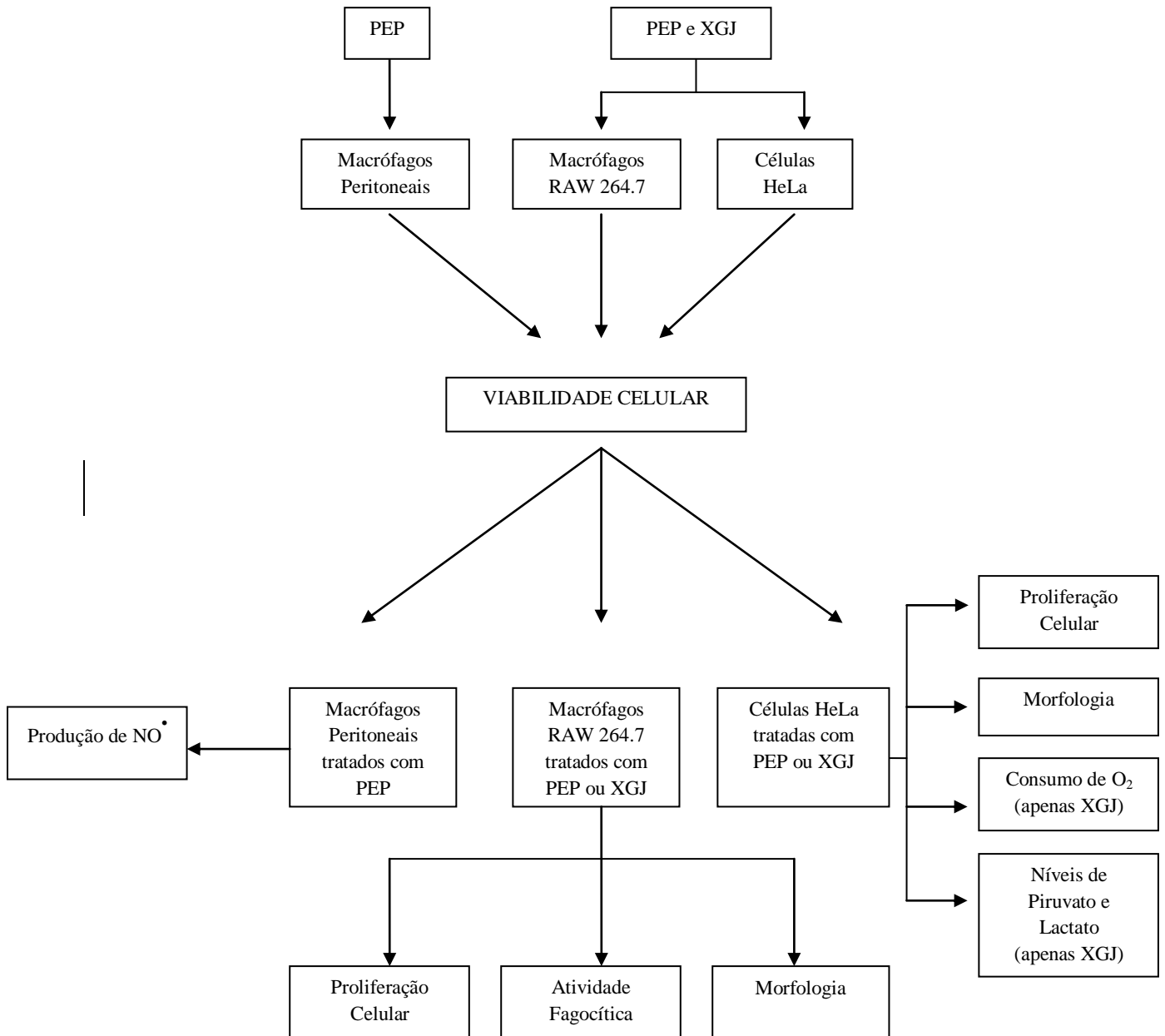


FIGURA 5 - FLUXOGRAMA DA ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

FONTE: o autor (2010).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 MATERIAIS E REAGENTES

- Reagentes adquiridos da Merck do Brasil: Hidróxido de sódio, glucose, fosfato monobásico de potássio, fosfato monobásico de sódio, fosfato dibásico de potássio, fosfato dibásico de sódio, ácido sulfúrico, ácido clorídrico, dimetilsulfoxido (DMSO), cloreto de potássio, formaldeído, acetona, citrato de sódio, entellan, nitrato de sódio, cloreto de cálcio, glicina, hidrazina, tris.
- Reagentes adquiridos da Sigma Chemical Co (St Louis, MO): Brometo de (3-metil[4-,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio (MTT), ácido N-2[-4-hidroxietil piperazina N 2-etano sulfônico (HEPES), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), azul de Trypan, actinomicina D, lactato desidrogenase, NADH, NAD⁺.
- Reagentes adquiridos da Cultilab (Campinas, SP): penicilina, estreptomina, gentamicina, meio Eagle medium (MEM), meio Dulbecco MEM (DMEM).
- Outros reagentes de marcas diversas: Giemsa-May-Grunwald (Laborclin), soro fetal bovino (Gibco).
- Materiais adquiridos da Millipore®: filtros Millex descartáveis de 0,22 µm de poro, membranas de acetato de celulose de 0,22 µm de poro.
- Materiais adquiridos da Corning: placas de cultura estéreis de 96 poços, garrafas de cultura estéreis de 75 e 150 cm³.
- Materiais adquiridos da BD: Seringas de plástico estéreis, agulhas 25 X 8 estérís e seringas de vidro.
- Materiais adquiridos da TPP: placas de cultura estéreis multipoços, garrafas de cultura estéreis e “cell scraper”.

- Outros materiais de marcas diversas: Luvas de látex, tubos de centrífuga, tubos eppendorf, tubos de criopreservação, ponteiras, tubos de vidro para cultivo (laborclin), pipetas de vidro.

Os demais reagentes utilizados nos experimentos eram de alta pureza.

5.2 MEIOS E SOLUÇÕES

5.2.1 Meio MEM

O meio utilizado para o cultivo de células HeLa e de macrófagos peritoneais de camundongos foi o meio essencial mínimo de Eagle (MEM, Cultilab, Campinas, Brasil), reconstituído em água ultrapura (Ultrapurificador Gehaka) e esterilizado por filtração em membrana de acetato-nitrato de celulose com poros de 0,22 μm (Millipore®) sob pressão em aparelho Sartorius. O pH do meio foi ajustado com quantidades adequadas de solução de bicarbonato de sódio 8 mmol.L^{-1} esterilizado em autoclave a 120 °C e 1 atm por 30 minutos. Para o tamponamento do meio em pH 7,4 foi utilizado tampão HEPES 20 mmol.L^{-1} (pH 7,0) esterilizado por filtração em membrana de acetato-nitrato de celulose com poros de 0,22 μm (Millipore®). Também foram adicionados os antibióticos penicilina (100 UI. mL^{-1}), estreptomicina (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e gentamicina (50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). O meio foi suplementado com soro fetal bovino (SFB) estéril (Gibco) – 7,5%, para células HeLa e 5% para macrófagos peritoneais e mantido em geladeira a 4 °C em frascos estéreis.

5.2.2 Meio DMEM

O meio utilizado para o cultivo de macrófagos da linhagem RAW 264.7 foi o meio Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (DMEM, Cultilab, Campinas, Brasil),

reconstituído em água ultrapura (Ultrapurificador Gehaka) e esterilizado por filtração em membrana de acetato-nitrato de celulose com poros de 0,22 μm (Millipore®) sob pressão em aparelho Sartorius. O pH do meio foi ajustado com quantidades adequadas de solução de bicarbonato de sódio 8 mmol.L^{-1} esterilizado em autoclave a 120 °C e 1 atm por 30 minutos. Para o tamponamento do meio em pH 7,4 foi utilizado tampão HEPES 20 mmol.L^{-1} (pH 7,0) esterilizado por filtração em membrana de acetato-nitrato de celulose com poros de 0,22 μm (Millipore®). Também foram adicionados os antibióticos penicilina (100 UI.mL^{-1}), estreptomicina (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e gentamicina (50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). O meio foi suplementado com 5% de SFB estéril (Gibco) – 5% e mantido em geladeira a 4 °C em frascos estéreis.

5.2.3 Solução Salina Tamponada (PBS)

A solução foi preparada na forma de estoque 5 vezes concentrada. Os seguintes componentes foram dissolvidos em água ultrapura (Ultrapurificador Gehaka): NaCl 680 mmol.L^{-1} , KCl 13,4 mmol.L^{-1} , Na_2HPO_4 40,5 mmol.L^{-1} . O pH foi ajustado para 7,4 e o volume completado para 1 litro em balão volumétrico. A solução foi então autoclavada a 120 °C, 1 atm, por 40 minutos. A solução foi armazenada em frasco estéril e mantida sob temperatura ambiente.

5.2.4 Solução Salina Balanceada de Hanks (HBSS)

A solução balanceada de Hanks (HBSS) foi constituída da mistura das soluções A e B, as quais foram preparadas como soluções estoque (concentradas 20 vezes) e armazenadas a 4 °C. A solução A é constituída de 2,73 mmol.L^{-1} de NaCl, 107 mmol.L^{-1} de KCl, 25 mmol.L^{-1} de CaCl_2 , 27 mmol.L^{-1} de $\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$. A solução B é constituída de 8,5 mmol.L^{-1} de Na_2HPO_4 e 111 mmol.L^{-1} de glucose. As duas soluções foram preparadas em água ultrapura (Ultrapurificador Gehaka) e

armazenadas a temperatura ambiente. No momento do uso, as soluções A e B foram misturadas (1:1), diluídas com água ultrapura (Ultrapurificador Gehaka) e o pH ajustado para 7,4. A solução de Hanks foi esterilizada por filtração em membrana de acetato-nitrato de celulose com poros de 0,22 μm (Millipore®) em câmara de fluxo laminar vertical (VECO), armazenada em frascos estéreis e mantida sob temperatura ambiente.

5.2.5 Solução de Tripsina-EDTA

A solução de tripsina-EDTA foi constituída de NaCl 137 mmol.L^{-1} , KCl 5,4 mmol.L^{-1} , glucose 5 mmol.L^{-1} , Na_2HPO_4 0,42 mmol.L^{-1} , KH_2PO_4 0,44 mmol.L^{-1} , NaHCO_3 2,3 mmol.L^{-1} , EDTA 0,53 mmol.L^{-1} , 50 mg % tripsina (1:250) e 2 mg % de vermelho de fenol, sendo o pH ajustado para 7,4 com solução de bicarbonato de sódio 8 mmol.L^{-1} . A solução assim preparada foi esterilizada por filtração em membrana de acetato-nitrato de celulose com poros de 0,22 μm (Millipore®) sob pressão em aparelho Sartorius. Armazenada em frascos estéreis e mantida em geladeira a 4 °C.

5.3 PROCEDIMENTO DE ESTERILIZAÇÃO DE MATERIAL

Todos os materiais de vidro utilizados para os procedimentos de cultivo de células (garrafas de Roux, frascos de vidro para armazenamento de soluções, lamínulas, equipamento para filtração sob pressão, tampas, pipetas de vidro, eppendorfs e ponteiras plásticas de pipetas automáticas) foram esterilizados em autoclave (Fanen) a 120 °C, durante 30 minutos, a 1 atm.

A esterilização de materiais plásticos (garrafas de cultivo celular, placas multipoços, tubos de centrífuga) foi realizada em microondas por 40 minutos em potência de 50%.

5.4 PROCEDIMENTOS DE CULTIVO E MANUTENÇÃO DE CÉLULAS

Neste estudo foram utilizadas as seguintes células: macrófagos da linhagem RAW 264.7, macrófagos peritoneais de camundongos e células HeLa. Essas linhagens celulares tiveram as condições de cultivo adaptadas para o Laboratório de Cultivo Celular do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR. Todos os procedimentos envolvendo o cultivo celular foram realizados em capela de fluxo laminar vertical (VECO).

5.4.1 Macrófagos RAW 264.7

Os macrófagos da linhagem RAW 264.7 são macrófagos murinos transformados pela injeção intraperitoneal do vírus de leucemia Abelson, obtidos da ascite de ratos BALB/c (RASCHKE, 1978; ABELSON, 1970). Estas células possuem receptores para imunoglobulinas e produzem lisozimas (ABCAM, 2009). Também são capazes de responder de forma similar aos macrófagos obtidos diretamente de camundongos, além de serem alvos de ativação por polissacarídeos (RAMAMOORTHY; TIZARD, 1998).

Os macrófagos da linhagem RAW 264.7, foram adquiridos do Banco de Células da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e gentilmente cedidos pela Dr^a Mariana P. Moretão e pelo Dr. Marco Krieger do Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP). As células foram mantidas congeladas em nitrogênio líquido, no Laboratório de Cultivo Celular do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR. Suspensões celulares (10^6 células.mL⁻¹) em meio de armazenamento composto por meio de cultura DMEM 40% (v/v), acrescido de soro fetal bovino 50% (v/v) e DMSO 10% (v/v) foram congeladas inicialmente a -20 °C por no mínimo 2 horas, a seguir a -70 °C por no mínimo 12 horas, e, então, armazenadas em nitrogênio líquido.

Para realização dos experimentos, as células foram descongeladas a 37 °C em banho (Biopar) e adicionadas a garrafas de cultivo, acrescentando meio de crescimento DMEM suplementado com 5% de SFB. Após adesão das células à superfície da garrafa (mínimo de 2 horas), mantidas em estufa de CO₂ (5%), a 37 °C, o meio foi substituído por novo meio DMEM suplementado com 5% de SFB para descartar o meio de congelamento contendo o DMSO e eventuais células mortas. Para os repiques celulares, o meio foi descartado e adicionado novo meio DMEM. Em seguida, as monocamadas confluentes foram descoladas das garrafas de cultivo com auxílio de “cell scraper” (TPP). A suspensão celular foi então distribuída em novas garrafas de cultura estéreis novamente mantidas em estufa de CO₂ (5%), a 37 °C (LÉO *et al.*, 2008). A monocamada de células foi rotineiramente observada em microscópio invertido (OLYMPUS MOD. CK2).

5.4.2 Macrófagos Peritoneais de Camundongos

Os macrófagos peritoneais foram obtidos de camundongos albinos Swiss fêmeas (*Mus musculus*) com aproximadamente dois meses de idade. O estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas - UFPR, sendo aprovado (Certificado nº 393 - Anexo). Os animais foram mantidos no biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, sendo alimentados com ração apropriada e água à vontade e retirados do biotério no momento do uso.

Para realização dos experimentos, as células foram coletadas como descrito no item 5.5 e a seguir, as células foram plaqueadas em placa de cultura estéril com múltiplos poços de acordo com cada experimento e colocadas para aderir durante uma hora a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. Após a aderência as células foram lavadas duas vezes com PBS a 37 °C. Após esta etapa, as condições dos experimentos variaram de forma adequada para cada situação experimental. As monocamadas de células foram rotineiramente observadas em microscópio invertido (OLYMPUS MOD. CK2).

5.4.3 Células HeLa

As células HeLa foram isoladas em 1951, sendo originárias de carcinoma de cérvix uterino humano, de uma paciente chamada Henrietta Lacks. Foi a primeira linhagem celular aneuplóide e de característica epitelial, derivada de tecido humano, a ser mantida continuamente em cultura celular em série (SKLOOT, 2007; WEINBERG, 2008).

As células HeLa tem sido utilizadas extensivamente em estudos a respeito da atividade antitumoral de polissacarídeos (CARNEIRO-LEÃO *et al.*, 1997; STEVAN *et al.*, 2001; STUELP-CAMPELO *et al.*, 2002; MORETÃO, 2004).

Células HeLa provenientes da ATCC (“American Type Cell Collection”) e obtidas do Instituto Adolfo Lutz, SP, foram mantidas congeladas em nitrogênio líquido, no Laboratório de Cultivo Celular do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR. Suspensões celulares (10^6 células.mL⁻¹) em meio de armazenamento composto por meio de cultura MEM 40% (v/v), acrescido de soro fetal bovino 50% (v/v) e DMSO 10% (v/v) foram congeladas inicialmente a -20 °C por no mínimo 2 horas, a seguir a -70 °C por no mínimo 12 horas e, a seguir, armazenadas em nitrogênio líquido.

Para realização dos experimentos, as células foram descongeladas a 37 °C em banho (Biopar) e adicionadas em garrafas de cultivo, acrescentando meio de crescimento MEM suplementado com 7,5% de SFB. Após adesão das células à superfície da garrafa (mínimo de 2 horas), mantidas em estufa de CO₂ (5%), a 37 °C, o meio foi substituído por novo meio MEM suplementado com 7,5% de SFB, eliminando-se o meio de congelamento contendo o DMSO e eventuais células mortas. Para os repiques celulares, o meio foi descartado e as monocamadas confluentes descoladas das garrafas de cultivo por tratamento com a solução de tripsina-EDTA. A suspensão celular assim obtida foi, então, distribuída em novas garrafas de cultura estéreis e novamente cultivadas em estufa de CO₂ (5%), a 37 °C (LÉO *et al.*, 2008). A monocamada de células foi rotineiramente observada em microscópio invertido (OLYMPUS MOD. CK2).

5.5 COLETA E CONTAGEM DE CÉLULAS

As células foram descoladas assepticamente utilizando “cell scraper” (TPP) no caso dos macrófagos da linhagem RAW 264.7 ou solução de tripsina/EDTA para células HeLa, seguindo-se de centrifugação e ressuspensão do “pool” celular em 1 mL de meio de cultura.

Para a obtenção dos macrófagos os camundongos foram eutanasiados por asfixia, com éter etílico em câmara de vidro. Após assepsia com álcool iodado e exposição do peritônio, 10 mL de PBS resfriados a temperatura de 4 °C foram injetados na cavidade peritoneal com auxílio de seringa e agulha estéreis. Em seguida, foi realizada uma massagem vigorosa na região inoculada, as células do exsudato peritoneal foram aspiradas e transferidas para um tubo plástico estéril e mantidas em banho de gelo até a utilização. Posteriormente, as células foram centrifugadas (HITACHI CR21E) a 2500 rpm por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e o “pellet” de células ressuspenso em meio MEM.

A contagem das células foi feita em hemocitômetro de Neubauer, utilizando microscópio óptico (BEL Photonics).

5.6 MÉTODOS ANALÍTICOS

5.6.1 Dosagem de carboidratos totais

A concentração de carboidratos nas soluções foi determinada pelo método fenol-ácido sulfúrico, como descrito por Dubois *et al.* (1956). Este método consiste na formação dos derivados furfural e hidroximetilfurfural a partir das pentoses e hexoses, respectivamente, na presença de ácido sulfúrico, que reagem com o fenol, formando um complexo de cor alaranjada que é determinado a 490 nm.

5.6.2 Determinação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada pelo método do MTT (brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio) de acordo com a metodologia descrita por Reilly *et al.* (1998). Este método baseia-se na redução do MTT por desidrogenases de células viáveis.

Foi realizada a viabilidade celular com os macrófagos RAW 264.7, macrófagos peritoneais de camundongos e células HeLa, na densidade celular de 2.10^5 , 5.10^5 e 1.10^4 células.mL⁻¹, respectivamente. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços e deixadas em estufa para aderirem a 37 °C, em atmosfera de 5% CO₂ por 24 horas. Após aderência foi adicionado os polissacarídeos diluídos em meio de cultura, seguindo-se incubação por 48 horas a 37 °C, em atmosfera de 5% CO₂. Após a incubação, o meio foi retirado e substituído por 180 µL de HBSS + 20 µL de solução de MTT (5 mg.mL⁻¹ em HBSS), para a obtenção de uma concentração final de 0,5 µg.mL⁻¹. As células foram então incubadas por 3 horas a 37 °C, em atmosfera de 5% CO₂. Após esse tempo, o sobrenadante foi retirado e adicionado 150 µg DMSO por poço para dissolver o formazan formado. A leitura da absorbância em 550 nm foi feita em leitor de microplacas Bio-Tek Instruments modelo ELX 800, utilizando o DMSO como branco (REILLY *et al.*, 1998).

5.6.3 Determinação da proliferação celular pelo método do cristal violeta

Os ensaios de proliferação celular foram realizados com macrófagos da linhagem RAW 264.7 e células HeLa na ausência e presença dos polissacarídeos. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços, baseando-se no crescimento, verificado na curva padrão de células, e deixadas em estufa para aderirem por 24 horas a 37 °C, em atmosfera de 5% CO₂. O meio foi, então, substituído por outro sem adição de SFB para que todas as células estacionassem na fase G₀ do ciclo celular. Após 24 h, o meio sem SFB foi trocado por meio contendo SFB e as células mantidas na presença e na ausência dos polissacarídeos. O meio de cultivo suplementado com SFB, sem os

polissacarídeos foi utilizado como controle. A proliferação celular foi quantificada após 24 e 48 horas utilizando o corante cristal violeta (KUENG; SILBER; EPPENBERGER, 1989). Os resultados foram expressos em número de células, que foi determinado por uma curva padrão construída como descrito a seguir. As células foram plaqueadas em densidades crescentes de concentração celular em placas de 96 poços em meio de cultura e deixadas por 24 h em estufa a 37° C, em atmosfera de 5% CO₂ para aderirem. A densidade celular foi quantificada utilizando o corante cristal violeta.

Para realização do ensaio do cristal violeta, o sobrenadante (células não viáveis) foi retirado e as células fixadas com metanol. Em seguida, o metanol foi retirado e acrescentado solução do corante cristal violeta (0,2% em etanol 2%), diluído 5 vezes. Os poços foram lavados com PBS, seguindo-se a adição de citrato de sódio 0,05 mol.L⁻¹ em etanol 50%. A leitura da absorbância utilizando filtro de 540-550 nm foi feita em leitor de microplacas Bio-Tek Instruments modelo ELX 800, utilizando citrato de sódio 0,05 mol.L⁻¹ em etanol 50% como branco.

5.6.4 Microscopia óptica

A microscopia óptica foi realizada em células RAW 264.7 e células HeLa. Monocamadas de células crescidas durante 48 horas em lamínulas de vidro foram incubadas, a 37 °C, em atmosfera com 5% de CO₂, na presença dos polissacarídeos diluídos em meio de cultura durante uma hora. Decorrido o tempo de incubação, o sobrenadante foi descartado e as células crescidas em lamínulas foram lavadas com PBS e fixadas em solução de BOUIN (formaldeído 4% (v/v):ácido pícrico saturado:ácido acético, 4:15:1) por 5 minutos em temperatura ambiente. Após a fixação, as células foram desidratadas em solução etanólica 70% e coradas com GIEMSA (atividade fagocítica) e Hematoxilina/Eosina (morfologia).

5.6.5 Atividade fagocítica

A capacidade fagocítica foi avaliada de acordo com a metodologia descrita por Ramesh; Yamaki; Tsushida (2002) e Buchi *et al.* (1993), utilizando leveduras como partículas fagocíticas. As leveduras, obtidas a partir de fermento biológico, foram preparadas por 3 lavagens consecutivas em PBS estéril, pH 7,4 e mantidas a 4 °C até utilização.

Para o ensaio de fagocitose, os macrófagos RAW 264.7 foram plaqueados na densidade de $2,5 \times 10^5$ células por poço, num volume final de 600 μ L, em placas de cultura de 24 poços contendo lamínulas de vidro estéreis. Após 24 horas, para a adesão das células, os macrófagos foram cultivados em meio de cultivo DMEM suplementado com 5% de SFB e tratados com diferentes concentrações dos polissacarídeos. Após 48 h, o sobrenadante foi descartado e as lamínulas contendo as monocamadas de macrófagos foram lavadas duas vezes com PBS. Em seguida, as lamínulas foram incubadas a 37 °C e atmosfera com 5% CO₂ com leveduras na proporção de 8 leveduras para cada macrófago. Após 1 hora, as lamínulas foram lavadas três vezes com PBS, para retirada das leveduras que não foram fagocitadas, e processadas para microscopia de luz conforme descrito no item 5.6.4. Utilizando objetiva de 1000 vezes de aumento, foram contados o número total de macrófagos, o número de macrófagos que fagocitaram leveduras e o número de leveduras fagocitadas. Os resultados foram expressos de duas maneiras: 1) Leveduras sobre macrófagos totais e 2) Porcentagem de macrófagos que fagocitaram.

5.6.6 Produção de NO[•]

A produção de NO[•] foi medida pela dosagem de seus produtos de degradação, nitrito e nitrato, mais estáveis, utilizando o reagente de Griess. Neste método, o nitrito primeiramente reage com a sulfanilamida em meio ácido para formar um composto intermediário, o sal de diazônio. Em seguida, este sal reage com N-naftil-etilenodiamina (NED) formando um composto azo estável de coloração púrpura,

podendo assim ser quantificado espectrofotometricamente a 550 nm (GREEN *et al.*, 1982).

Macrófagos peritoneais foram plaqueados na densidade 5×10^5 células por poço em placas de 96 poços seguindo-se adesão por 12 h a 37°C, em atmosfera com 5% de CO₂. Após aderência, o meio foi retirado e adicionado meio de cultivo MEM suplementado com 5% de SFB, e diferentes concentrações de PEP. Para o experimento controle as células foram cultivadas apenas com meio de cultivo MEM suplementado com 5% de SFB. Em seguida, as células foram incubadas por mais 48h a 37°C, 5% de CO₂ e após este tempo o sobrenadante foi coletado por centrifugação e submetido a reação com reagente de Griess na proporção 1:1. A reação foi determinada espectrofotometricamente utilizando espectrofotômetro UV-VIS (Shimadzu modelo 2450) em 550 nm, calculando-se a concentração de NO[•] utilizando uma curva padrão de nitrito de sódio.

5.6.7 Determinação do consumo de oxigênio

A velocidade do consumo de oxigênio por células HeLa foi determinada polarograficamente em oxígrafo de Gilson, em câmara fechada, termostaticada e sob agitação constante.

As células HeLa crescidas por 48 h foram coletadas e suspensas em solução PBS, pH 7,4, utilizado também como meio de reação. Para a determinação do consumo de oxigênio o meio foi suplementado com succinato de sódio 10 mmol.L⁻¹ e ADP 0,8 mmol.L⁻¹. A quantidade de células presentes nos experimentos foi fixada em $4 \cdot 10^6$ em volume final de 1,3 mL. A reação foi iniciada com a adição de digitonina na concentração final de 0,005% (m/v). O experimento foi realizado à temperatura de 28 °C e o consumo de oxigênio foi expresso em nmols de oxigênio consumidos por minuto por $4 \cdot 10^6$ células, considerando a solubilidade do oxigênio em água, a 1 atm, nesta temperatura, como sendo de 325 mol.L⁻¹ (ESTABROOK, 1967).

5.6.8 Determinação de piruvato e lactato

Células HeLa crescidas por 48 horas, foram suspensas em solução de PBS, na densidade de 10^6 células.mL⁻¹ e incubadas a 37 °C, sob agitação. Foi então adicionado XGJ na concentração de 200 µg.mL⁻¹ e, imediatamente, α-D-glucose 5 mmols.L⁻¹. Alíquotas coletadas nos tempos de 0, 15, 30 e 60 minutos foram imediatamente centrifugadas a 13000 rpm por 1 minuto em centrífuga Microcentaur – Sanyo. No sobrenadante foram dosados piruvato e L-lactato segundo descrito por Gutmann e Wahlefeld (1974); Czoc e Lamprecht (1974). O piruvato foi dosado em volume final de 1 mL, em meio de reação contendo tampão Tris-HCl 0,1 mol.L⁻¹, pH 7,4, NADH 0,15 mmol.L⁻¹, 0,1 U de lactato desidrogenase e 0,5 mL da amostra. A quantidade de NADH oxidado foi determinada a 340 nm, após 20 minutos de incubação a 37 °C.

O sistema para dosagem do lactato, em volume final de 1 mL, continha tampão glicina 0,1 mol.L⁻¹ - hidrazina 0,4 mol.L⁻¹, pH 9,5, NAD⁺ 1,5 mmol.L⁻¹, e 3 U de lactato desidrogenase e 0,5 mL da amostra. A quantidade de NADH formada foi determinada a 340 nm, após 90 minutos de incubação a 37 °C.

5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram submetidos à análise de variância ANOVA (“two way – single factor”) e teste de Tukey. Todos os resultados foram expressos com média e desvio padrão ($X \pm SD$). Foram considerados estatisticamente significativos os valores comparados ao nível de significância de $p < 0,05$.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diversos estudos têm demonstrado que polissacarídeos isolados de diferentes fontes têm apresentado propriedades imunomoduladoras (MORETÃO *et al.*, 2003; MORETÃO *et al.*, 2004; SCHEPETKIN; QUINN, 2006; KLIMP *et al.*, 2002; MELLINGER *et al.*, 2005) e antitumorais (STUELP-CAMPELO *et al.*, 2002; KATO *et al.*, 2001), atuando, portanto, como moduladores da resposta biológica.

Neste trabalho, os polissacarídeos PEP e XGJ foram avaliados quanto às suas possíveis atividades biológicas *in vitro* em três modelos experimentais: macrófagos da linhagem RAW 264.7, macrófagos peritoneais de camundongos e células HeLa (FIGURA 5).

Em macrófagos da linhagem RAW 264.7 foram avaliados os efeitos dos polissacarídeos em relação à proliferação celular, à atividade fagocítica e à morfologia. Embora, a literatura descreva que esta linhagem seja capaz de responder aos estímulos de forma semelhante aos macrófagos peritoneais de camundongos, testes preliminares realizados com macrófagos RAW 264.7, mostraram que as células cultivadas em nosso laboratório não estavam exibindo algumas dessas propriedades, como a produção de NO[•] e O₂^{•-}. Diante disso, para avaliar o efeito do polissacarídeo PEP sobre a produção de NO[•] foram utilizados macrófagos peritoneais de camundongos. Este ensaio foi realizado somente para o polissacarídeo PEP, uma vez que para a XGJ esta avaliação já está disponível na literatura (ROSÁRIO *et al.*, 2008).

Em células HeLa, o efeito do tratamento dos polissacarídeos foi avaliado em relação à proliferação celular e à morfologia. Ensaio sobre alguns parâmetros do metabolismo oxidativo da célula tumoral, avaliando alterações sobre o consumo de oxigênio e produção de lactato e piruvato foram realizados apenas com XGJ devido a alta viscosidade da solução do PEP, o que inviabilizou sua utilização nos sistemas experimentais utilizados.

6.1 POLISSACARÍDEOS

6.1.1 Polissacarídeo do Exsudato do Fruto da Paineira (PEP)

Este polissacarídeo foi obtido a partir do exsudato do fruto de *Chorisia speciosa* (Paineira), caracterizado como sendo uma ramnogalactanana ácida composto por ramnose, arabinose, xilose, manose, glucose, galactose e ácido glucurônico na razão molar de 14:12:2:5:1:46:20. A cadeia principal da estrutura é composta por unidades de β -D-galactopiranosose em ligação (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 6). Arabinose e ramnose constituem extremidades não redutoras. Análises por HPSEC-MALLS/RI indicaram que a fração apresentava-se homogênea, com valor de M_w de $9,226 \times 10^5$ g.mol⁻¹. O PEP utilizado no presente estudo foi isolado e cedido pela Prof^a Dr^a Carmen Lucia de Oliveira Petkowicz do grupo de Química de Carboidratos Vegetais do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR. A solução do polissacarídeo foi preparada numa concentração de 2 mg.mL⁻¹ dissolvidos em água ultrapura (Ultrapurificador Gehaka) sob agitação por 24 horas a 50 °C. A solução foi esterelizada em autoclave (Fanen) a 120 °C, durante 30 minutos, a 1 atm. Também foi feita a dosagem de carboidratos para determinar a concentração da solução. A solução estéril foi armazenada em frasco de vidro estéril sob temperatura de -20 °C. De acordo com análises de homogeneidade por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos e índice de refração (HPSEC-MALLS/RI) o procedimento de esterilização não alterou a estrutura do polissacarídeo.

6.1.2 Xiloglucana de Jatobá (XGJ)

A xiloglucana de reserva presente nas sementes de *Hymenaea courbaril* foi obtida por extrações aquosas sequenciais a 25 °C dos cotilédones moídos e deslipidificados. A proporção de glucose, xilose e galactose determinada para a fração obtida na primeira extração foi de 3,8:2,4:1,0. Análises por HPSEC MALLS/RI

indicaram que a fração apresentava-se homogênea com valor de M_w $2,0 \cdot 10^5$ g.mol⁻¹ (ROSÁRIO, 2006).

O polissacarídeo foi isolado e caracterizado pela Msc Mariana Maia Taulois do Rosário (ROSÁRIO, 2006) e cedido pela Prof^a Dr^a Carmen Lucia de Oliveira Petkowicz do grupo de Química de Carboidratos Vegetais do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR. Para a utilização a solução de XGJ foi preparada em solução tampão PBS na concentração de 2 mg.mL⁻¹ sob agitação por 24 horas. Foi esterilizada em autoclave (Fanen) a 120 °C, durante 30 minutos, a 1 atm. Também foi feita a dosagem de carboidratos para determinar a concentração da solução. A solução estéril foi armazenada em frasco de vidro estéril sob temperatura de -20 °C. Após o procedimento de esterilização, o polissacarídeo foi submetido a análises de homogeneidade por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos e índice de refração (HPSEC-MALLS/RI). Os resultados mostraram que não houve modificação estrutural decorrente da esterilização.

6.2. EFEITO DOS POLISSACARÍDEOS SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE MACRÓFAGOS RAW 264.7, MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS E CÉLULAS HELA

O experimento de viabilidade celular foi utilizado nesse trabalho com o objetivo de determinar as concentrações limítrofes em que os polissacarídeos não afetariam a viabilidade das células. Foi utilizado o método colorimétrico do MTT, que avalia a capacidade das células metabolicamente ativas em reduzir, por ação da succinato desidrogenase mitocondrial, o brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazolio (MTT), gerando como produto cristais de formazana que são solúveis em DMSO (MOSMANN, 1983). O tratamento foi realizado com diferentes concentrações dos polissacarídeos para estabelecer as doses nas quais se mantivesse um mínimo de 85% de viabilidade em relação ao controle, constituído apenas de meio de cultivo sem os polissacarídeos.

Na FIGURA 6A estão apresentados os efeitos do PEP sobre macrófagos RAW 264.7. Observa-se que o polissacarídeo diminui a viabilidade destas células de maneira dose-dependente, com diferença significativa para as concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em relação aos experimentos controle. Curiosamente, para a concentração de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ observa-se o aumento do número de células viáveis. Embora este efeito seja muito discreto (~12%), pode sugerir, entre outras ações, que o polissacarídeo, nesta concentração, induza a proliferação celular. Esta possibilidade foi também investigada neste estudo e os resultados serão apresentados no item 6.2.

Na FIGURA 6B estão apresentados os efeitos da XGJ sobre macrófagos RAW 264.7. Observa-se que o polissacarídeo foi altamente citotóxico para estas células, diminuindo a viabilidade celular em ~50% já na menor concentração (5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) alcançando ~70% na maior concentração (200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

Em vista destes resultados foram realizados experimentos adicionais, com concentrações menores do polissacarídeo. Observa-se que em baixas concentrações o polissacarídeo compromete a viabilidade destas células de maneira dose-dependente em relação ao experimento controle, com diferença significativa (FIGURA 6C). Rosário *et al.* (2008), avaliando a viabilidade celular da XGJ em macrófagos peritoneais, observou que a XGJ mostra-se citotóxica apenas a partir da concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, diminuindo a viabilidade em ~30%.

A XGJ mostrou-se extremamente citotóxica para macrófagos da linhagem RAW 264.7, mas não para macrófagos peritoneais de camundongos (ROSÁRIO *et al.*, 2008). Esta diferença possivelmente se deve às diferenças de comportamento entre células de linhagem e células de cultura primária.

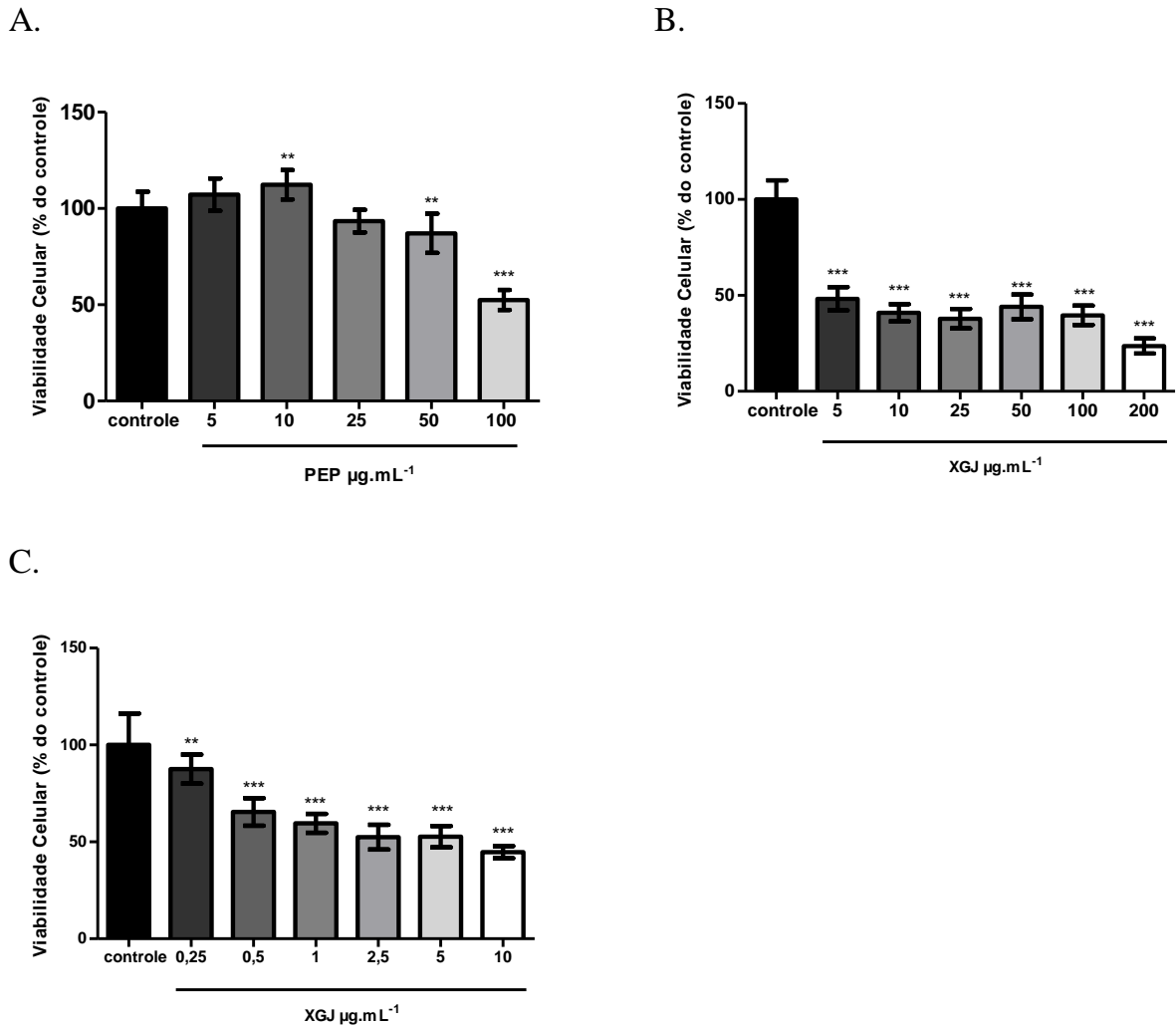


FIGURA 6 - EFEITOS DOS POLISSACARÍDEOS SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE MACRÓFAGOS RAW 264.7

FONTE: o autor (2010).

NOTA: A. Tratamento com PEP. B. Tratamento com XGJ. C. Tratamento com baixas concentrações de XGJ. Macrófagos na densidade de 2.10^5 células por poço, foram incubados por 48 h com os polissacarídeos nas concentrações especificadas nos gráficos. O meio foi removido e o MTT adicionado, seguido de incubação de 3 h. O excesso de MTT foi removido e os cristais de formazan dissolvidos em DMSO, seguindo-se a leitura da absorbância em 550 nm como descrito no item 5.6.2 de Material e Métodos. Os valores representam a média \pm DP de três experimentos independentes, cada um em quadruplicata. **Diferença significativa para o controle; $p < 0,01$. ***Diferença significativa para o controle; $p < 0,001$. Controle (100%) corresponde a viabilidade celular na ausência dos polissacarídeos.

Na FIGURA 7 estão representados os resultados do ensaio de viabilidade celular de macrófagos peritoneais tratados com PEP. Observa-se que PEP não afetou a viabilidade mesmo nas maiores concentrações utilizadas do polissacarídeo, diferente do ensaio realizado com macrófagos RAW 264.7 (FIGURA 6A), demonstrando a maior sensibilidade destes últimos à presença do polissacarídeo.

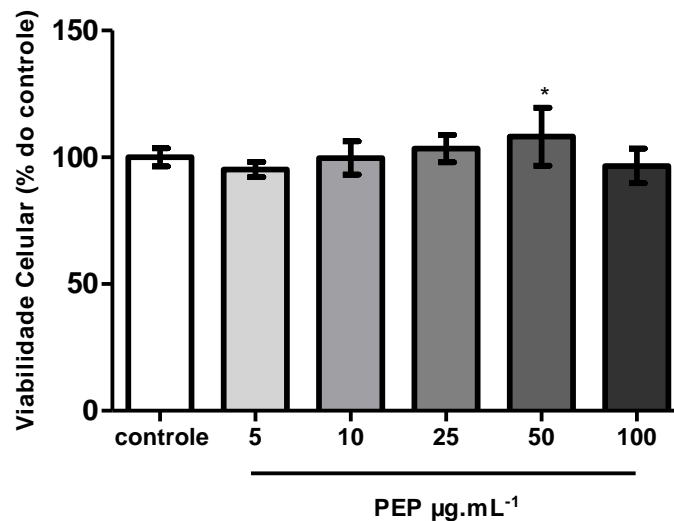


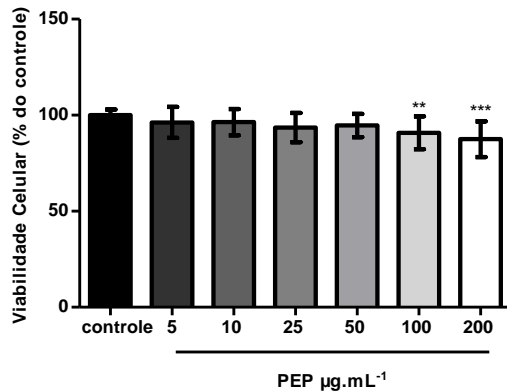
FIGURA 7 - EFEITOS DE PEP SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS

FONTE: o autor (2010).

NOTA: Macrófagos na densidade de 5.10^5 células por poço, foram incubados por 48 h com PEP nas concentrações especificadas no gráfico. O meio foi removido e o MTT adicionado, seguido de incubação de 3 h. O excesso de MTT foi removido e os cristais de formazan, dissolvidos em DMSO, seguindo-se a leitura da absorbância em 550 nm como descrito no item 5.6.2 de Material e Métodos. Os valores representam a média \pm DP de quatro experimentos independentes, cada um em quadruplicata. *Diferença significativa para o controle; $p < 0,05$. Controle (100%) corresponde a viabilidade celular na ausência de PEP.

Em relação aos efeitos do PEP sobre células HeLa, observa-se na figura 8A que o polissacarídeo não afetou a viabilidade até a concentração de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Mesmo em maiores concentrações ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$) o PEP promoveu apenas efeitos discretos, diminuindo a viabilidade celular em apenas $\sim 10\%$ (FIGURA 8A).

A.



B.

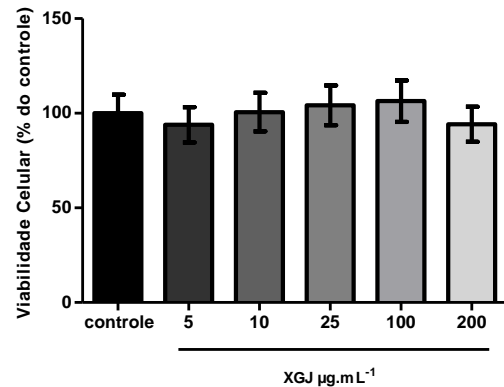


FIGURA 8 - EFEITOS DOS POLISSACARÍDEOS SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE CÉLULAS HELA

FONTE: o autor (2010).

NOTA: A. Tratamento com PEP. B. Tratamento com XGJ. Células HeLa na densidade de 1.10^4 células por poço, foram incubados por 48 h nas concentrações dos polissacarídeos especificadas nos gráficos. O meio foi removido e o MTT adicionado, seguido de incubação de 3 h. O excesso de MTT foi removido e os cristais de formazan dissolvidos em DMSO, seguindo-se a leitura da absorbância em 550 nm, como descrito no item 5.6.2 de Material e Métodos. Os valores representam a média \pm DP de cinco experimentos independentes, cada um em quadruplicata. *** Diferença significativa para o controle; $p < 0,001$. ** Diferença significativa para o controle; $p < 0,01$. Controle (100%) corresponde ao meio na ausência dos polissacarídeos.

A XGJ, por sua vez, não foi tóxica para células HeLa nas concentrações utilizadas (FIGURA 8B). Embora os polissacarídeos não tenham exibido efeitos tóxicos sobre as células HeLa, não se exclui a possibilidade que dos polissacarídeos interferirem em outras funções celulares.

Com base nos resultados obtidos, foram escolhidas as concentrações de $2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de PEP e $0,05 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de XGJ para serem utilizadas nos experimentos subseqüentes com macrófagos RAW 264.7. Já para os experimentos com macrófagos peritoneais de camundongos foram escolhidas as concentrações de $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de PEP. Para

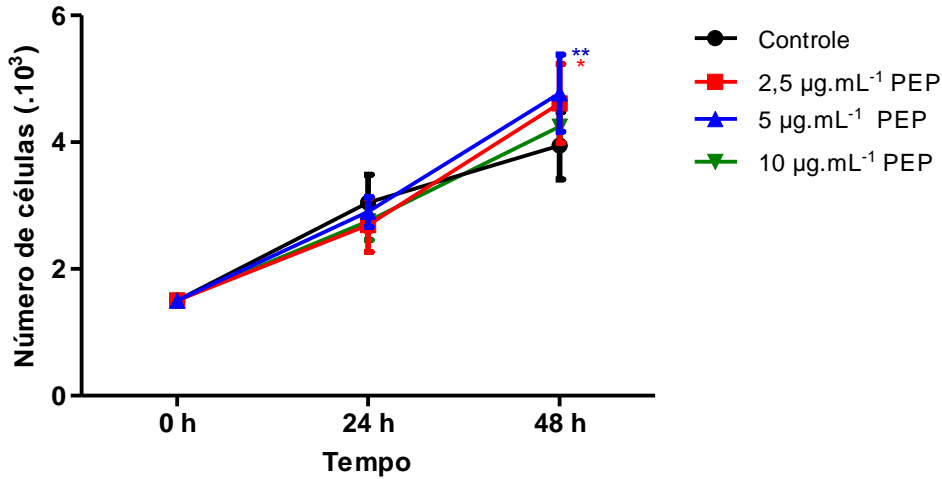
células HeLa, as concentrações escolhidas foram de 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de PEP e XGJ.

6.3 EFEITO DOS POLISSACARÍDEOS SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR DE MACRÓFAGOS RAW 264.7 E CÉLULAS HELA

Para avaliar o efeito dos compostos em estudo sobre a proliferação celular realizou-se experimentos de proliferação celular num período de 48 horas, utilizando-se o método fotométrico com o corante cristal violeta, o qual cora os ácidos nucleicos das células aderidas e fixadas com metanol absoluto (KUENG *et al.*, 1989). Por ser um método fotométrico, inicialmente foi realizada uma curva de calibração relacionando o número de células com a absorbância obtida após a coloração com o cristal violeta, para os dois modelos celulares: RAW 264.7 e células HeLa. Essas curvas foram utilizadas para determinação do número de células nos demais experimentos.

Na FIGURA 9A estão apresentados os resultados da curva de proliferação de macrófagos RAW 264.7 tratados com PEP. Observa-se que no tempo de 48 horas PEP promoveu um aumento no crescimento das células de ~17% na concentração de 2,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e ~21% na concentração de 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, em relação ao controle. Os macrófagos tratados com concentração mais elevada de PEP (10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) tiveram um crescimento semelhante ao controle. Para a XGJ, observa-se uma diminuição no crescimento dos macrófagos no tempo de 24 horas na maior concentração utilizada de XGJ (0,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), quando comparado com o controle e as outras concentrações de XGJ (FIGURA 9 B). No entanto, no tempo de 48 horas, não foi observada essa diferença. As células tratadas com a XGJ na concentração de 0,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ se recuperaram no tempo de 48 horas (FIGURA 9 B). A XGJ não exibiu efeitos significativos sobre a proliferação de macrófagos RAW 264.7.

A.



B.

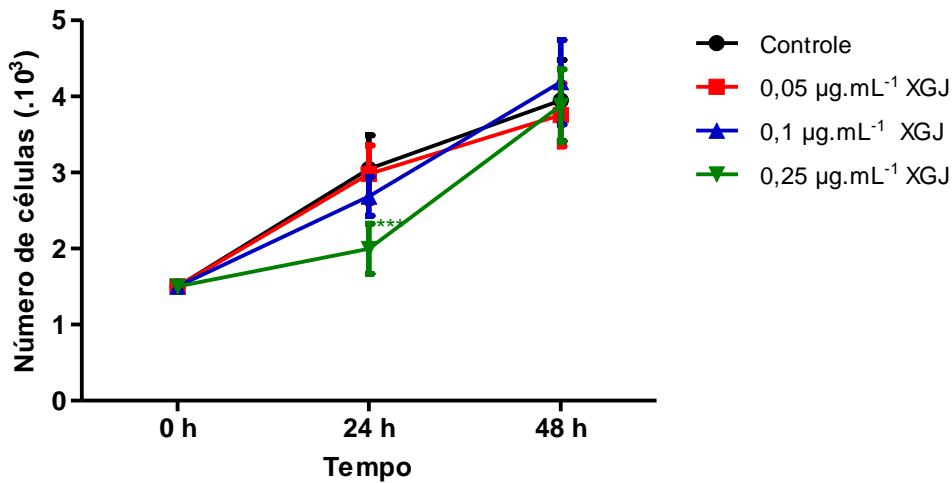


FIGURA 9 - EFEITOS DOS POLISSACARÍDEOS SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR DE MACRÓFAGOS RAW 264.7

FONTE: o autor (2010).

NOTA: A. Tratamento com PEP. B. Tratamento com XGJ. Macrófagos RAW 264.7 na densidade de $1,5 \cdot 10^4$ células por poço, foram incubados por 24 e 48 h nas concentrações dos polissacarídeos especificadas no gráfico. A quantificação foi realizada pelo método do cristal violeta e a leitura da absorbância foi em 550 nm, como descrito do item 5.6.3 de Material e Métodos. Os valores representam a média \pm DP de três experimentos independentes, em quadruplicata. ***Diferença significativa para o controle; $p < 0,001$. **Diferença significativa para o controle; $p < 0,01$. *Diferença significativa para o controle; $p < 0,05$. Controle corresponde ao meio na ausência de polissacarídeos.

Os resultados obtidos no presente estudo diferem daqueles descritos na literatura em relação a proliferação celular de macrófagos RAW 264.7 tratados com diferentes polissacarídeos. Gamal-Eldeen *et al.* (2007), avaliando a proliferação de macrófagos RAW 264.7 tratados com o extrato quimicamente modificado de polissacarídeo derivado do *Leucaena leucocephala*, constataram um aumento na proliferação de 178% em relação ao controle. Avaliando os efeitos do tratamento por 48 horas com o extrato aquoso da raiz de *Astragali* (ARE) sobre a proliferação de RAW 264.7. Lee *et al.* (2005) observaram um aumento no crescimento celular de 104, 113, 117 e 133% em relação ao controle, nas concentrações de 500, 1000, 1500 e 2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Im *et al.* (2005) cultivaram macrófagos RAW 264.7 na presença e na ausência de um polissacarídeo modificado de *Aloe* (MAP) por 48 horas. Neste estudo, foi verificado que o polissacarídeo modificado inibiu o crescimento de RAW 264.7 de maneira dose-dependente, atingindo até 90% de inibição. Para o polissacarídeo isolado da *Salicornia herbacea* (SHE), o mesmo grupo encontrou resultado semelhante, verificando a inibição do crescimento de células RAW 264.7 de maneira dose-dependente, sendo que a atividade inibitória do polissacarídeo alcançou 90% na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (IM; KIM; LEE, 2006). Após purificação de SHE e associação com IFN- γ , verificou-se um efeito sinérgico aumentando em 40% a atividade inibitória do polissacarídeo (IM *et al.*, 2007).

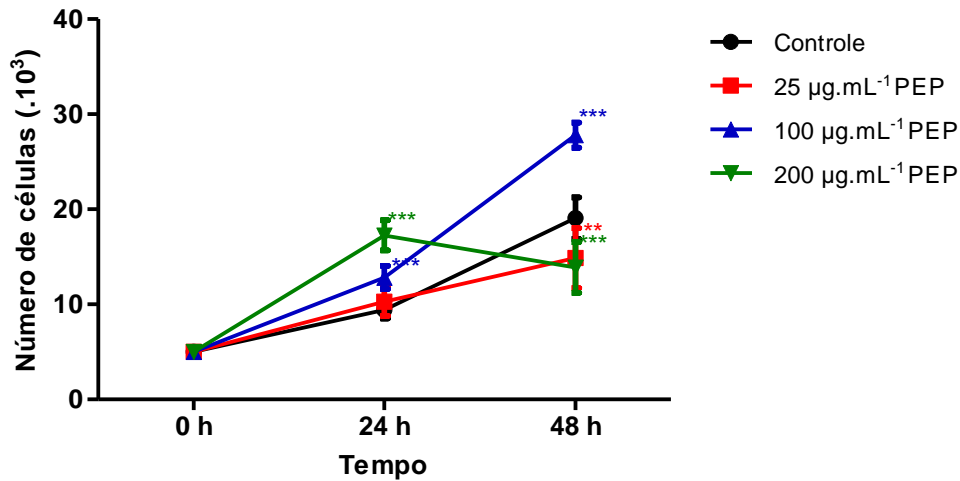
Considerando que os efeitos biológicos de polissacarídeos podem estar diretamente relacionados com sua estrutura, os resultados do presente estudo em relação a proliferação celular de macrófagos RAW 264.7 contribuem para reforçar que pode-se obter respostas distintas utilizando um mesmo tipo celular em presença de polissacarídeos estruturalmente diferentes.

Os resultados dos ensaios de proliferação celular em células HeLa tratadas com os polissacarídeos estão demonstrados na FIGURA 10. Observa-se que na maior concentração utilizada de PEP (200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) ocorreu um aumento no crescimento celular em relação ao controle no tempo de 24 horas em ~83%. Já no tempo de 48 horas houve, nessa mesma concentração, uma inibição do crescimento em relação ao controle em ~27%. Na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ também houve um crescimento

maior (~36%), quando comparado ao controle, no tempo de 24 horas. Contudo, diferente da dose de 200 g.mL⁻¹, no tempo de 48 horas o efeito indutor da proliferação persiste e há um aumento de ~45% em relação ao controle. Na menor concentração utilizada do polissacarídeo (25 µg.mL⁻¹), no tempo de 24 horas não há diferença em relação ao crescimento do controle e, no tempo de 48 horas, o efeito inibitório observado para a maior concentração de PEP se repete, inibindo ~22% em relação ao controle (FIGURA 10 A). Diante desses resultados, pode-se sugerir que o polissacarídeo PEP possui efeitos opostos sobre a proliferação de células HeLa, sendo estes efeitos dependentes da concentração e do tempo de incubação.

O tratamento com XGJ promoveram um aumento na proliferação celular das células HeLa, em todas as concentrações utilizadas, num comportamento dose-dependente, variando de ~65% a ~156% em relação ao controle no tempo de 24 horas e de ~19% a 38% em relação ao controle no tempo de 48 horas, sugerindo um efeito indutor da proliferação celular (FIGURA 10 B).

A.



B.

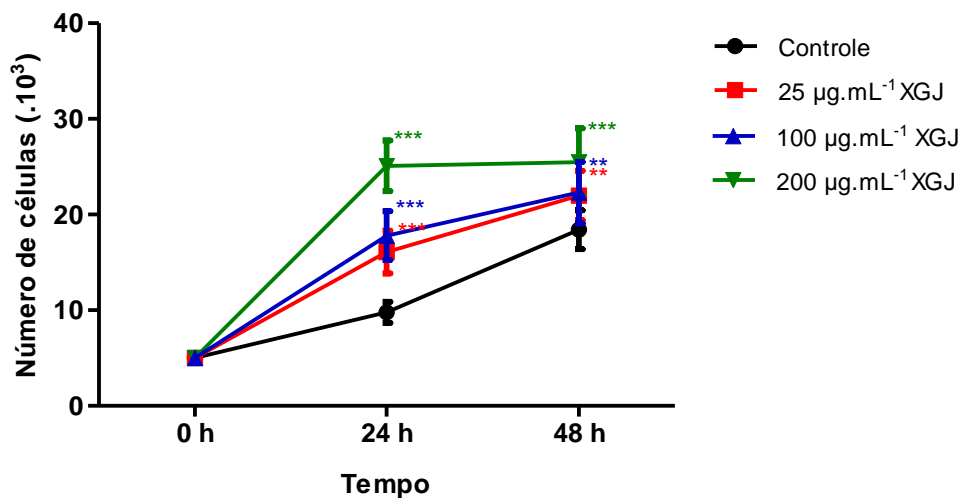


FIGURA 10 - EFEITOS DOS POLISSACARÍDEOS SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS HELA

FONTE: o autor (2010).

NOTA: A. Tratamento com PEP. B. Tratamento com XGJ. Células HeLa na densidade de $5 \cdot 10^3$ células por poço, foram incubados por 24 e 48 h nas concentrações dos polissacarídeos especificadas no gráfico. A quantificação foi realizada pelo método do cristal violeta e a leitura da absorbância foi em 550 nm, como descrito do item 5.6.3 de Material e Métodos. Os valores representam a média \pm DP de seis experimentos independentes, em quadruplicata. ***Diferença significativa para o controle; $p < 0,001$. **Diferença significativa para o controle; $p < 0,01$. Controle corresponde ao meio na ausência dos polissacarídeos.

Os estudos a respeito da proliferação celular em linhagens de células tumorais visam descobrir primariamente compostos que possam inibir a progressão da linhagem celular. Nesse sentido, os resultados obtidos no presente estudo não mostraram atividade antitumoral significativa para os polissacarídeos PEP e XGJ. Noieto *et al.* (2009), avaliando os efeitos do tratamento de duas preparações de galactomananas (GALMAN A e B) extraídas das sementes de *Mimosa scabrella* (bracatinga) e complexadas ao oxovanadium ($\text{VO}^{2+}/\text{VO}^{3+}$) sobre células HeLa. Os autores observaram um leve aumento na proliferação de células tratadas com GALMAN A e um leve decréscimo no tratamento com GALMAN B. Por outro lado, quando complexadas ao oxovanadium, ambas inibiram a proliferação celular em ~60%, demonstrando que a presença do metal é crucial para o efeito tóxico observado.

Polissacarídeos sulfatados de 11 espécies de algas tropicais marinhas coletadas da cidade de Natal, nordeste do Brasil, foram avaliadas sobre seus efeitos anti-proferativos sobre células HeLa. Após 72 horas de incubação, a proliferação celular foi inibida entre 33% e 67,5% pelo polissacarídeo de *S. filipendula*; 31,4% a 65,7% pelo polissacarídeo de *D. delicatula*; 36,3% a 58,4% pelo polissacarídeo de *C. prolifera* e 40,2% a 61% pelo polissacarídeo de *Dicyotamenstrualis*, todos testados nas concentrações de 0,01 a 2 mg.mL⁻¹. A eficácia do efeito antiproliferativo desses polissacarídeos de alga foram correlacionados ao seu conteúdo de sulfato (COSTA *et al.*, 2010).

Avaliando os efeitos do tratamento do extrato dializado de *Cistanche salsa* sobre 18 linhagens de células tumorais, Maruyama *et al.* (2008) observaram a inibição da proliferação celular das linhagens H-60 (leucemia promielocítica aguda), Daudi (linfoma de Burkitt`s), Raji (linfoma de Burkitt`s), BHL-89 (leucemia linfóide crônica), Namalwa (linfoma de Burkitt`s), Ramos (linfoma de Burkitt`s americano), HMy-2 (leucemia celular plasmática), HeLa (adenocarcinoma de cérvix), HepG2 (carcinoma de fígado) e B16 (melanoma). Também verificaram indução da proliferação das linhagens Jurkat (leucemia linfoblástica aguda), MOLT-4 (leucemia linfoblástica aguda), RPMI 8226 (mieloma), BALL-1 (leucemia linfoblástica aguda) e

U266 (mieloma). Não houve diferença em relação ao controle nas linhagens U937 (linfoma histiocítico), A549 (carcinoma de pulmão) e MH134 (carcinoma de fígado).

Efeitos estimulatórios sobre a proliferação de macrófagos RAW 264.7 seria interessante por se tratar de células pertencentes ao sistema imune. Já indução da proliferação nas células HeLa pode sugerir um efeito negativo do composto como possível agente antitumor.

6.4 EFEITO DOS POLISSACARÍDEOS SOBRE A MORFOLOGIA DE MACRÓFAGOS RAW 264.7 E CÉLULAS HELA

O estudo das alterações de morfologia celular é um importante instrumento para avaliar a possível citotoxicidade das substâncias testadas. A ausência de efeitos sobre a viabilidade celular não exclui a possibilidade de efeitos deletérios causados pelos polissacarídeos às células. Com a finalidade de verificar tal possibilidade, alguns parâmetros morfológicos dos macrófagos RAW 264.7 e de células HeLa foram analisados.

A morfologia normal de macrófagos dessa linhagem demonstra células pequenas, arredondadas, com superfície lisa, emitindo projeções filamentosas curtas e escassas, além da ausência de vacúolos (RADKAR *et al.*, 2008; PFEIFFER *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2008; HAAK-FRENDSCHO *et al.*, 1990). Macrófagos ativados nessa linhagem apresentam-se achatados, espalham-se consideravelmente, possuem muitos projeções citoplasmáticos dando aparência áspera (similares a células dentríticas) e são altamente vacuolados (LEE *et al.*, 2008; HAAK-FRENDSCHO *et al.*, 1990). Células na fase inicial de ativação parecem ter uma distribuição bi-modal de fenótipos morfológicos, ou seja, algumas células apresentam morfologia característica de macrófagos ativados, enquanto que outras apresentam-se arredondadas e sem vacúolos (HAAK-FRENDSCHO *et al.*, 1990). Em análise morfométrica utilizando o software Bioquat System IV, os perímetros celulares foram mensurados e quantificados em termos de uma unidade arbitrária e a área média da superfície de células RAW 264.7 ativadas foi de aproximadamente o dobro da de células inativadas

(HAAK-FRENSCHO *et al.*, 1990). No presente estudo, não foi observado diferenças morfológicas significativas entre o controle e os macrófagos tratados com os polissacarídeos PEP ou XGJ como pode ser observado na FIGURA 11, onde estão apresentadas as fotomicrografias das culturas de macrófagos RAW 264.7 tratadas com os polissacarídeos por 48 horas.

No presente estudo, as fotomicrografias mostram que tanto as células tratadas como as sem tratamento (controle) apresentam características de células ativadas, porém este comportamento não foi reproduzível quando avaliado as funções de para produção de O_2^- , NO^* e $TNF-\alpha$. Embora estudos utilizando macrófagos da linhagem RAW 264.7 tenham mostrado que estas células são capazes de responder a estes parâmetros, de forma semelhante a macrófagos de uma cultura primária (ELDEEN *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2005; IM *et al.*, 2005, 2006, 2007; SUN *et al.*, 2009; KANG *et al.*, 2009; YU *et al.*, 2009; RADKAR *et al.*, 2008; PFEIFFER *et al.*, 2004; LEE *et al.*; 2008), em nosso laboratório não foi possível quantificar a produção de O_2^- , NO^* e $TNF-\alpha$ mesmo na presença de PMA e de LPS, compostos utilizados como controles positivos na ativação destas vias. Uma investigação nas condições de cultivo foi realizada, no entanto não foi possível detectar algo para explicar tal situação.

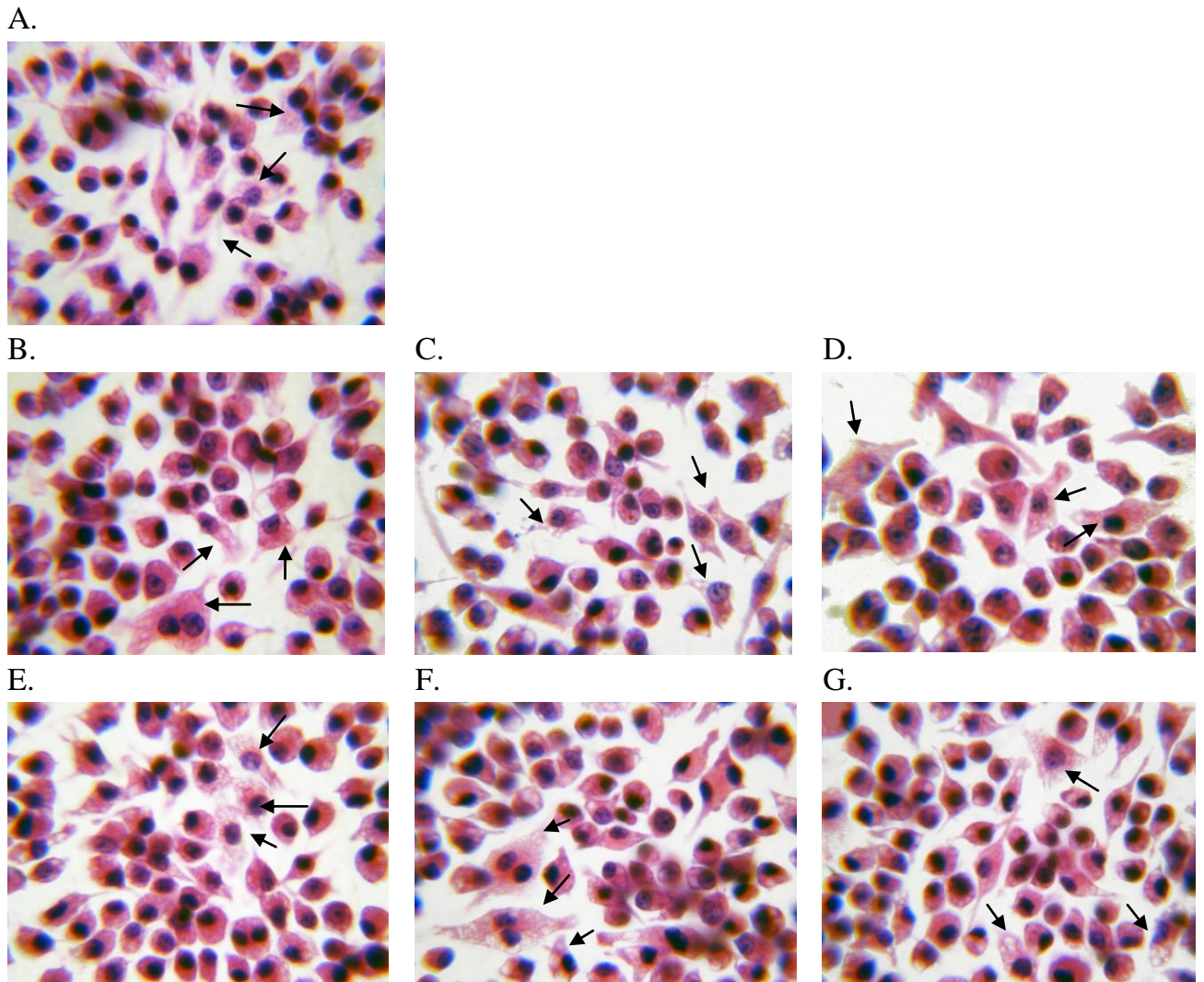


FIGURA 11- EFEITOS DOS POLISSACARÍDEOS SOBRE A MORFOLOGIA DE MACRÓFAGOS RAW 264.7

FONTE: o autor (2010).

NOTA: A. Controle (ausência dos polissacarídeos). B. Concentração de $2,5\mu\text{g.mL}^{-1}$ PEP. C. Concentração de $5\mu\text{g.mL}^{-1}$ PEP. D. Concentração de $10\mu\text{g.mL}^{-1}$ PEP. E. Concentração de $0,05\mu\text{g.mL}^{-1}$ XGJ. F. Concentração de $0,1\mu\text{g.mL}^{-1}$ XGJ. G. Concentração de $0,25\mu\text{g.mL}^{-1}$ XGJ. As flechas mostram características de célula ativada. Macrófagos RAW 264.7 na densidade de $2,5 \times 10^5$ células por poço, foram incubados por 48 h em diferentes concentrações de PEP. Lamínulas contendo as monocamadas de macrófagos foram processadas para microscopia óptica, como descrito do item 5.6.4 de Material e Métodos. Coloração: hematoxilina/eosina. Aumento de 1000x. Zoom 2.3x.

Na FIGURA 12 estão apresentadas as fotomicrografias das culturas de células HeLa, observadas por microscopia óptica, tratadas com os polissacarídeos por 48 horas. No controle (FIGURA 12 A), células na ausência dos polissacarídeos, observam-se características epiteliais, citoplasma basófilo e núcleos grandes com um ou mais nucléolos, como é próprio dessa linhagem. Os elementos celulares encontram-se justapostos, constituindo uma monocamada contínua, sendo estes os aspectos normais da monocamada celular (CARNEIRO-LEÃO, 1997). Na cultura tratada com a concentração de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de XGJ, observam-se algumas alterações na morfologia, a monocamada encontra-se menos justaposta e há um condensamento das células assim como do núcleo quando comparado ao controle.

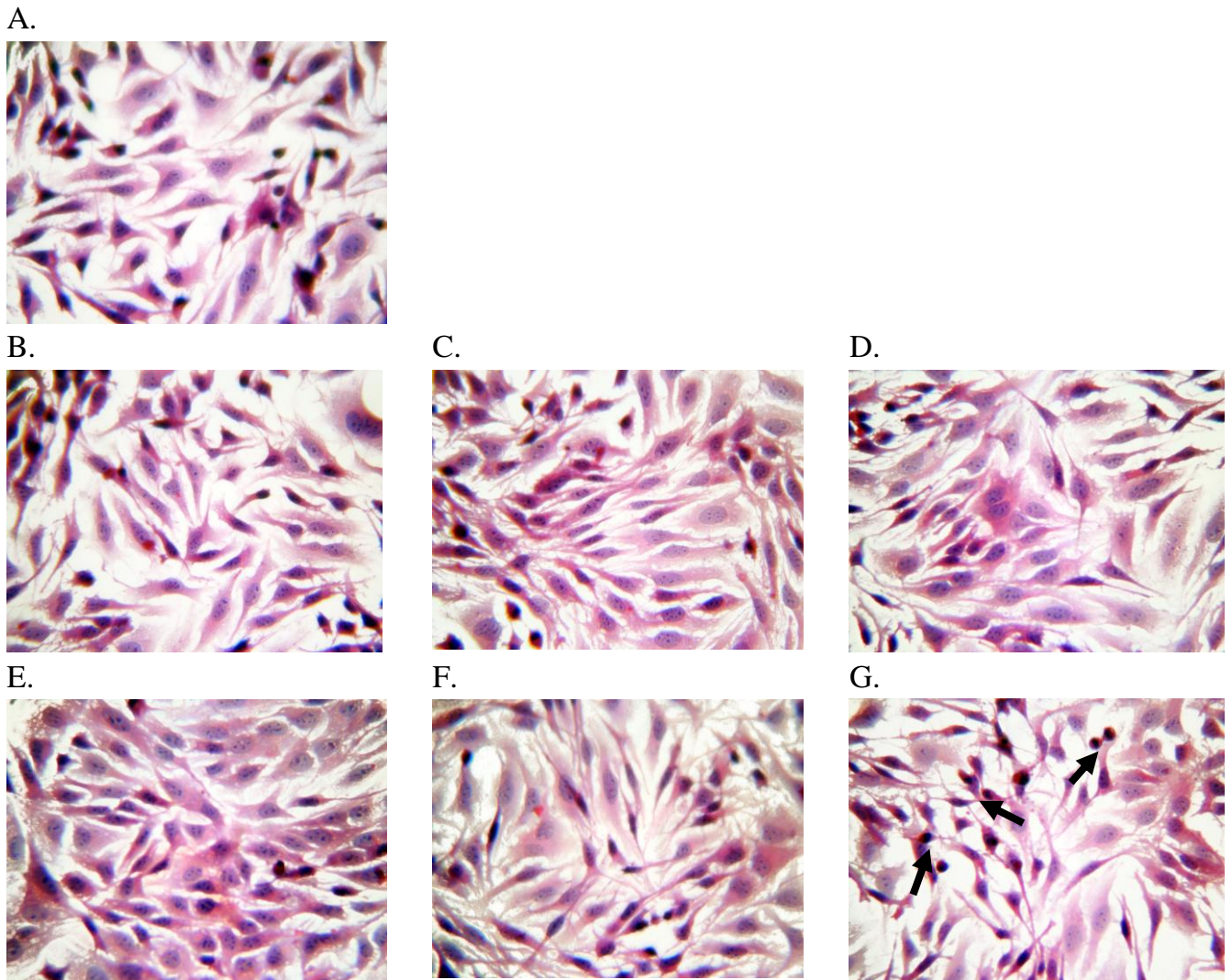


FIGURA 12 - EFEITOS DOS POLISSACARÍDEOS SOBRE A MORFOLOGIA DE CÉLULAS HELA

FONTE: o autor (2010)

NOTA: A. Controle (ausência dos polissacarídeos). B. Concentração de $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ PEP. C. Concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ PEP. D. Concentração de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ PEP. E. Concentração de $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ XGJ. F. Concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ XGJ. G. Concentração de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ XGJ. As flechas mostram as alterações morfológicas. Células HeLa na densidade de $1,5 \cdot 10^5$ células por poço, foram incubados por 48 h em diferentes concentrações dos polissacarídeos. Lamínulas contendo as monocamadas de células foram processadas para microscopia óptica, como descrito no item 5.6.4 de Material e Métodos. Coloração: hematoxilina/eosina. Aumento de 400x. Zoom de 2.3x.

Diferente do tratamento com os polissacarídeos utilizados no presente estudo, os polissacarídeos nativos de *R. celastri* causaram poucas alterações em cultura de células HeLa, apresentando vacúolos citoplasmáticos contendo material acidófilo e material filamentosos. Já seu derivado sulfatado causou alterações drásticas sobre esta linhagem celular, efeitos proporcionais às concentrações utilizadas, observando-se redução da adesão celular à superfície de crescimento, citoplasma intensamente basófilo e aspecto fusiforme, ocorrência de “blebs”, condensação celular e agregados celulares (CARNEIRO-LEÃO, 1997).

Moretão *et al.* (2004), avaliando os efeitos de uma arabinogalactana sobre células HeLa, observaram que o tratamento com o polissacarídeo induziu a formação de uma intensa condensação celular, diminuição das células aderidas e a presença de “blebs”, num comportamento dose-dependente.

Alterações morfológicas significativas decorrentes do tratamento dos polissacarídeos de *Sargassum stenophyllum* sobre células HeLa, também foram encontradas por Stevan *et al.* (2001), observando uma diminuição do número de células, presença de “blebs” e “clusters”, células condensadas, núcleos atípicos e aparência de fibroblastos.

6.5 EFEITO DOS POLISSACARÍDEOS SOBRE A ATIVIDADE FAGOCÍTICA DE MACRÓFAGOS RAW 264.7

Dentre as funções de macrófagos que se tornam aumentadas durante o processo de ativação está a capacidade fagocítica. A fagocitose constitui a primeira linha da defesa do sistema imunológico contra elementos estranhos.

A FIGURA 13 mostra os resultados da atividade fagocítica de macrófagos RAW 264.7 tratados com os polissacarídeos. Nestes experimentos, um total de 10.199 macrófagos e 11.450 leveduras foram contados. Foram utilizados dois parâmetros para a análise dos resultados: 1) Número de leveduras fagocitadas por macrófago (FIGURA 13) e 2) Número de macrófagos que realizaram a fagocitose (TABELA 1).

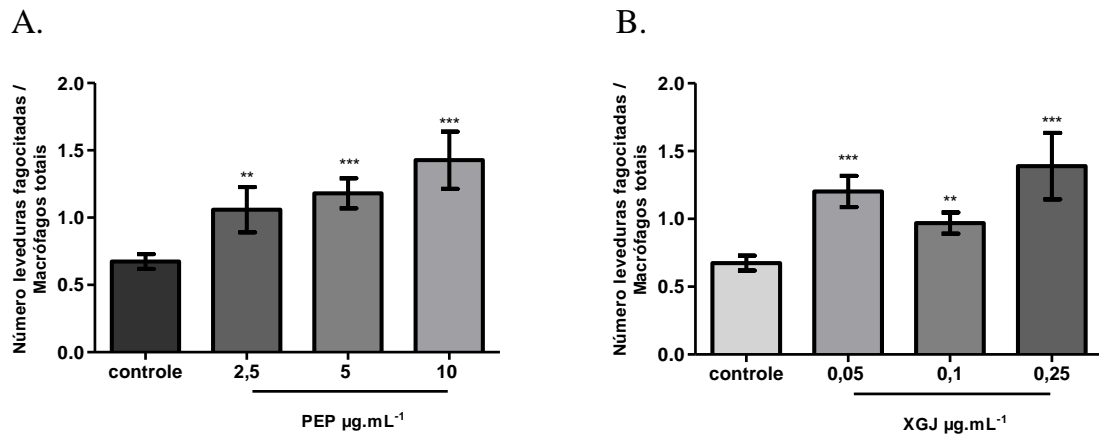


FIGURA 13 - EFEITOS DOS POLISSACARÍDEOS SOBRE A ATIVIDADE FAGOCÍTICA DE MACRÓFAGOS RAW 264.7

FONTE: o autor (2010).

NOTA: A. Tratamento com PEP. B. Tratamento com XGJ. Macrófagos RAW 264.7 na densidade de $2,5 \cdot 10^5$ células por poço, foram incubados por 48 h com as concentrações dos polissacarídeos especificadas no gráfico. Lamínulas contendo as monocamadas de macrófagos foram lavadas com PBS e incubadas com leveduras na proporção de 8 leveduras para cada macrófago e processadas para microscopia óptica, como descrito no item 5.6.5 de Material e Métodos. Os valores representam a média \pm DP de dois experimentos independentes, em triplicata. *** Diferença significativa para o controle; $p < 0,001$. ** Diferença significativa para o controle; $p < 0,01$. Controle corresponde ao meio na ausência dos polissacarídeos.

TABELA 1 - PORCENTAGEM (%) DE MACRÓFAGOS QUE REALIZARAM A FAGOCITOSE

Controle	Concentrações de PEP ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)			Concentrações de XGJ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)		
	2,5	5	10	0,05	0,1	0,25
39,55%	49,80% **	55,26% ***	56,27% ***	53,19% **	54,59% ***	58,63% ***

FONTE: o autor (2010).

NOTA: Macrófagos RAW 264.7 na densidade de $2,5 \cdot 10^5$ células por poço, foram incubados por 48 horas com as concentrações dos polissacarídeos especificadas na TABELA. Lamínulas contendo as monocamadas de macrófagos foram lavadas com PBS e incubadas com leveduras na proporção de 8 leveduras para cada macrófago e processadas para microscopia óptica, como descrito no item 5.6.5 de Material e Métodos. Os valores representam a média \pm DP de dois experimentos independentes, em triplicata. *** Diferença significativa para o controle; $p < 0,001$. ** Diferença significativa para o controle; $p < 0,01$. Controle corresponde ao meio na ausência dos polissacarídeos.

Ambos os polissacarídeos mostraram-se efetivos na ativação da capacidade fagocítica de macrófagos RAW 264.7. O tratamento com PEP apresentou diferença significativa em relação ao controle em todas as concentrações utilizadas, mostrando um comportamento dose-dependente. A razão de leveduras fagocitadas por macrófago foi de 0,67 no controle; 1,05 na concentração de 2,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 1,18 na concentração de 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 1,42 na concentração de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de PEP, o que corresponde a um aumento da capacidade fagocítica de até 112% (FIGURA 13 A). Em concordância a esse dado, houve um aumento de 42% dos macrófagos com leveduras internalizadas em seu citoplasma na lâmina tratada com a maior concentração de PEP (10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (TABELA 1). Na FIGURA 14 (A, B, C, D) estão apresentadas as fotomicrografias do controle e das lâminas tratadas com as concentrações de 2,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de PEP, respectivamente.

Assim como PEP, o tratamento com a XGJ apresentou diferença significativa em todos os tratamentos em relação ao controle. A razão de leveduras fagocitadas por macrófago foi de 0,67 no controle; 1,20 na concentração de 0,05 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 0,96 na concentração de 0,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 1,38 na concentração de 0,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de XGJ, o que corresponde a um aumento da capacidade fagocítica de até 106% (FIGURA 13 B). Em concordância a esse dado, houve um aumento de 48% dos macrófagos com leveduras internalizadas em seu citoplasma na lâmina tratada com a maior concentração de XGJ utilizada (0,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (TABELA 1). Na FIGURA 14 (A, E, F, G) estão apresentadas as fotomicrografias do controle e das culturas tratadas com as concentrações de 0,05 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 0,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 0,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de XGJ, respectivamente.

Vale ressaltar que apesar da XGJ ser mais citotóxica que PEP, o que impossibilitou o uso de concentrações maiores do polissacarídeo, ela mostrou ser mais potente, tendo efeito semelhante ao PEP, mesmo em baixas concentrações. Note que PEP na concentração de 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ apresentou a mesma razão que 0,05 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de XGJ, concentração 100 vezes menor.

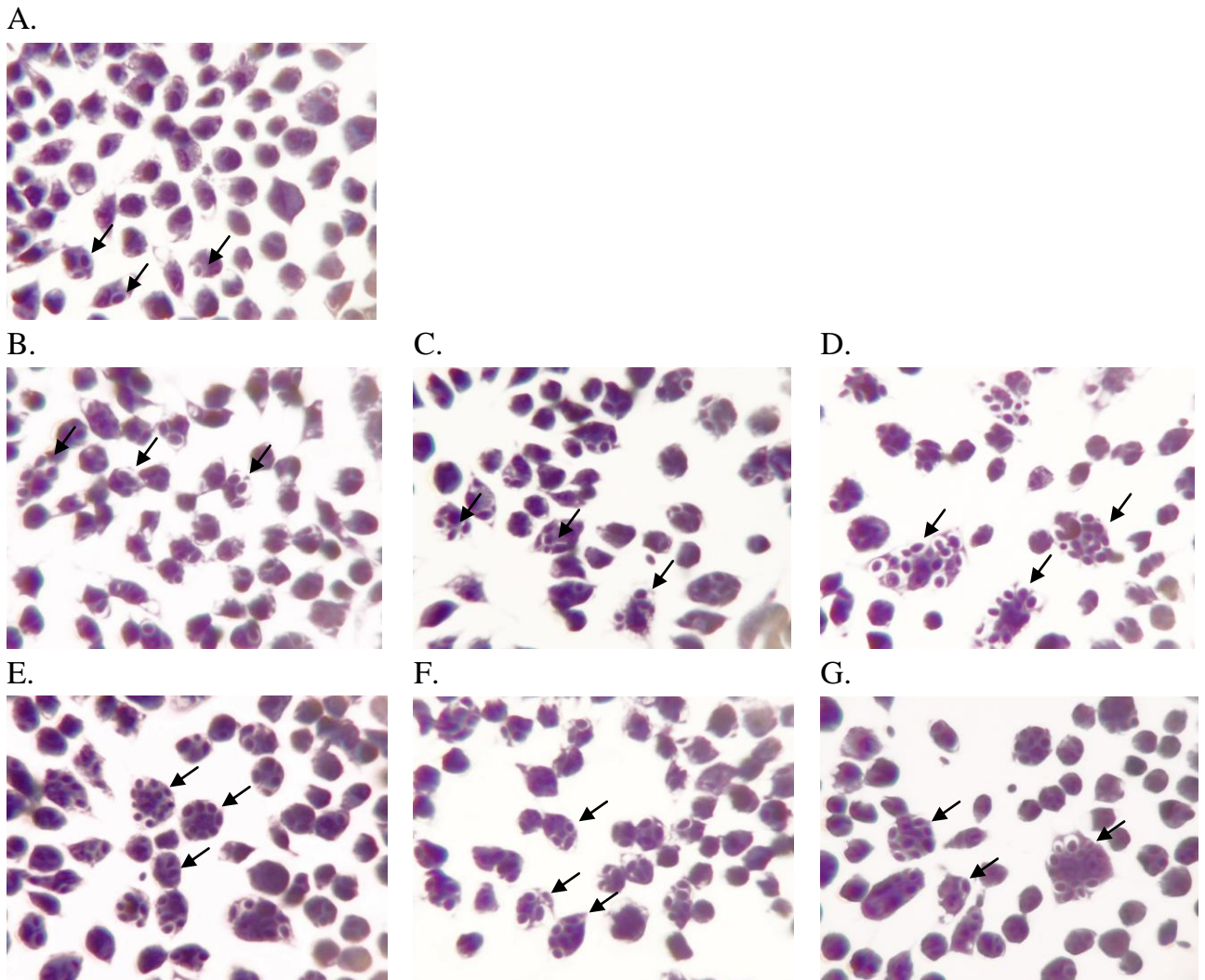


FIGURA 14 - EFEITOS DOS POLISSACARÍDEOS SOBRE A ATIVIDADE FAGOCÍTICA DE MACRÓFAGOS RAW 264.7 – INTERNALIZAÇÃO DAS LEVEDURAS PELOS MACRÓFAGOS

FONTE: o autor (2010)

NOTA: A. Controle (ausência dos polissacarídeos). B. Concentração de $2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ PEP. C. Concentração de $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ PEP. D. Concentração de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ PEP. E. Concentração de $0,05 \mu\text{g.mL}^{-1}$ XGJ. F. Concentração de $0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ XGJ. G. Concentração de $0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ XGJ. As flechas indicam as leveduras internalizadas. Macrófagos RAW 264.7 na densidade de $2,5 \cdot 10^5$ células por poço, foram incubados por 48 horas em diferentes concentrações dos polissacarídeos. Lamínulas contendo as monocamadas de macrófagos foram lavadas com PBS e incubadas com leveduras na proporção de 8 leveduras para cada macrófago e processadas para microscopia óptica, como descrito no item 5.6.4 de Material e Métodos. Coloração Giemsa. Aumento 1000x. Zoom de 2.3x.

Outros estudos em que foi avaliada a capacidade fagocítica de macrófagos tratados com polissacarídeos tiveram resultados semelhantes aos encontrados neste estudo. A atividade fagocítica de células RAW 264.7 foi avaliada na presença de polissacarídeo isolado da *Salicornia herbacea* na concentração de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ por 48 horas e IgG-opsonizado (SRBCs) foram adicionados. O número médio de SRBCs opsonizadas fagocitadas pelos macrófagos do controle foi de 0,4, enquanto a média do número de SRBCs fagocitadas pelos macrófagos tratados com polissacarídeo foi de 5,2 (IM *et al.*, 2006).

Gamal-Eldeen *et al.* (2007), estudaram os efeitos do tratamento de extrato quimicamente modificado de polissacarídeo derivado do *Leucaena leucocephala* sobre macrófagos RAW 264.7. Eles avaliaram a atividade fagocítica dessa linhagem celular contra FITC-zymosan, medido fluorometricamente, após o tratamento com $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de diferentes preparações do polissacarídeo e verificaram todas as preparações promoveram um aumento na atividade que variou de 18% a 41% em relação ao controle.

Moretão *et al.* (2003), avaliaram a capacidade fagocítica de macrófagos peritoneais de camundongos tratados com a arabinogalactana (ARAGAL), um polissacarídeo extraído da goma de *Anadenanthera colubrina* (Angico Branco), nas concentrações de 25 a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ utilizando leveduras como partículas fagocíticas. Eles verificaram que houve um aumento do índice endocítico de 35% a 66% maior que aqueles obtidos no controle. Já Stuelp-Campelo *et al.* (2002), avaliando os efeitos da α -D-glucana (1 \rightarrow 3) (1 \rightarrow 4) extraída do líquen *Ramalina celastri* sobre macrófagos peritoneais de camundongo, utilizando látex fluorescente como partículas fagocíticas, promoveu um aumento de 70% da capacidade fagocítica em relação ao controle, 7 dias após o tratamento dos animais.

A galactomanana de *Trigonella foenum-graecum L.* (fenugreek), também se mostrou eficaz, melhorando a capacidade fagocítica de macrófagos peritoneais de camundongo, em até ~20% a mais que o controle (RAMESH; YAMAKI; TSUSHIDA, 2002).

Polissacarídeos extraídos do cogumelo *Trametes robiniophila* Murril, ativaram a capacidade fagocítica de macrófagos peritoneais de camundongos *in vivo*. A atividade fagocítica dos macrófagos dos animais tratados com o polissacarídeo foi superior em todas as concentrações utilizadas (100, 200 e 400 mg.kg⁻¹) em relação ao grupo controle tratado com salina (JIA *et al.*, 2009).

O aumento da capacidade fagocítica pode ser explicado pela existência de múltiplos sítios de reconhecimento de polissacarídeos nos macrófagos, tais como receptor complemento 3, receptor para manose, receptor “scavenger”, dectina-1 e receptor “Toll-like” 4, os quais desencadeariam diferentes mecanismos de sinais no seu interior, culminando na fagocitose (LEUNG *et al.*, 2006).

6.6 EFEITOS DE PEP SOBRE A PRODUÇÃO DE NO[•] POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGO

A produção de NO[•] é uma importante via em que os macrófagos exercem sua função microbicida no organismo. A produção de NO[•] ocorre em resposta ao estímulo produzido principalmente por IFN- γ e LPS, por meio da enzima óxido nítrico sintase induzível (BEUTLER, 2004). Dentro dos fagolisossomos o NO[•] se combina com ânion superóxido, para produzir peroxinitrito, que é altamente reativo e microbicida (ABBAS; LITCHMAN, 2005; BEUTLER, 2004; KLIMP, 2002). Os produtos finais da oxidação do peroxinitrito são o nitrito e nitrato. Neste estudo a produção de NO[•] foi determinada pela dosagem de nitrito. Resultados de experimentos avaliando a produção de óxido nítrico de macrófagos peritoneais de camundongos tratados com PEP encontram-se na FIGURA 15. Observa-se que em todas as concentrações houve diferença estatística significativa em relação ao controle, o qual é constituído de meio sem PEP. Houve um aumento de 308% a 363% na produção de NO[•] naqueles tratados com PEP quando comparados ao controle. Além disso, a produção de NO[•] foi maior que a do controle positivo (LPS a 100 ng.mL⁻¹), em todas as concentrações de PEP testadas, com um aumento de 89% a 114%.

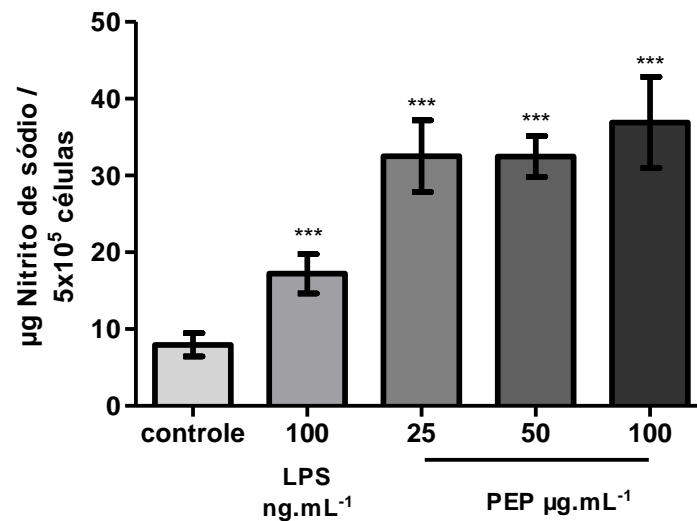


FIGURA 15 - EFEITOS DE PEP SOBRE A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS

FONTE: o autor (2010).

NOTA: Macrófagos na densidade de 5.10^5 células por poço, foram incubados por 48 h com PEP ou LPS nas concentrações especificadas no gráfico. O óxido nítrico foi dosado como nitrito de sódio no sobrenadante, após a adição de reagente de Griess, na proporção de 1:1, com a leitura da absorbância em 550 nm, como descrito no item 5.6.6 de Material e Métodos. A concentração de NO^* foi calculada utilizando-se uma curva de calibração de nitrito de sódio. Os valores representam a média \pm DP de quatro experimentos independentes, cada um em quadruplicata. ***Diferença significativa para o controle; $p < 0,001$. Controle corresponde a produção de óxido nítrico na ausência de PEP.

Resultados semelhantes ao encontrado neste trabalho foram observados por Kim *et al.* (2004), para o polissacarídeo ácido isolado de *Phellinus linteus* que aumentou a produção de NO^* em macrófagos peritoneais de camundongos de maneira significativa em relação ao controle, num comportamento dose-dependente até $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Assim como PEP, a produção de NO^* com a maior concentração utilizada do polissacarídeo de *P. linteus* ($200 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foi maior (~27%) que do controle positivo LPS (200ng.mL^{-1}).

Rosário *et al.* (2008), trabalhando com xiloglucanas isoladas de sementes de *Copaifera langsdorffii* (XGC) e *Hymenaea courbaril* (XGJ - mesmo polissacarídeo

utilizado neste estudo) e *Mucuna sloanei* (XGM), avaliaram a produção de NO[•] em macrófagos peritoneais de camundongos e observaram um aumento de ~262% a 307% em relação ao controle para XGC (10 a 50 µg.mL⁻¹) e ~68% a 92% para XGJ (10 a 50 µg.mL⁻¹). Manana (MPOLY) (10 µg.mL⁻¹) de *Saccharomyces cerevisiae* e galactomanana (GMPOLY) (5 µg.mL⁻¹) isolada do líquen *Ramalina celastri* aumentaram a produção de NO[•] em macrófagos peritoneais de camundongos cerca de 40% em relação ao controle (NOLETO *et al.*, 2002, 2004).

Yu *et al.* (2009), observaram para macrófagos RAW 264.7 tratados com o polissacarídeo extraído de *Auricularia polytricha* um aumento na produção de NO[•] de maneira dose-dependente (50 a 400 µg.mL⁻¹), chegando a ser 40 vezes superior ao controle e igual ao controle positivo LPS (10 µg.mL⁻¹). Leiro *et al.* (2007), utilizando a mesma linhagem celular, verificaram que o tratamento com o polissacarídeo sulfatado extraído de sementes de *Ulva rigida* também apresentou um comportamento dose-dependente (25 a 100 µg.mL⁻¹) e que a dessulfatação do polissacarídeo diminuiu em cerca de 50% a produção de NO[•].

A via de produção de NO[•], como já mencionado, é crucial para a atividade microbicida de macrófagos (ABBAS; LITCHMAN, 2005; BEUTLER, 2004; KLIMP, 2002). Desta forma, compostos capazes de estimular estas células para o aumento na produção de NO[•] podem, futuramente, serem utilizados na terapêutica como agentes microbicidas.

6.7 EFEITOS DE XGJ SOBRE ALGUNS PARÂMETROS DO METABOLISMO OXIDATIVO DE CÉLULAS HELA

Foram avaliados dois parâmetros do metabolismo oxidativo de células HeLa tratadas com a XGJ: 1) o consumo de oxigênio e 2) a produção de piruvato e lactato. Na FIGURA 16 e 17 estão demonstrados os efeitos da XGJ na concentração de 200 µg.mL⁻¹ sobre o consumo de oxigênio em células HeLa. Os traçados da FIGURA 16 são correspondentes aos ensaios realizados com as células intactas, sem a presença de

substratos exógenos. A presença da XGJ não promoveu alterações no consumo de O_2 de células HeLa intactas. Portanto, a velocidade do consumo de oxigênio representada nos traçados da FIGURA 16 refere-se apenas à oxidação de substratos endógenos.

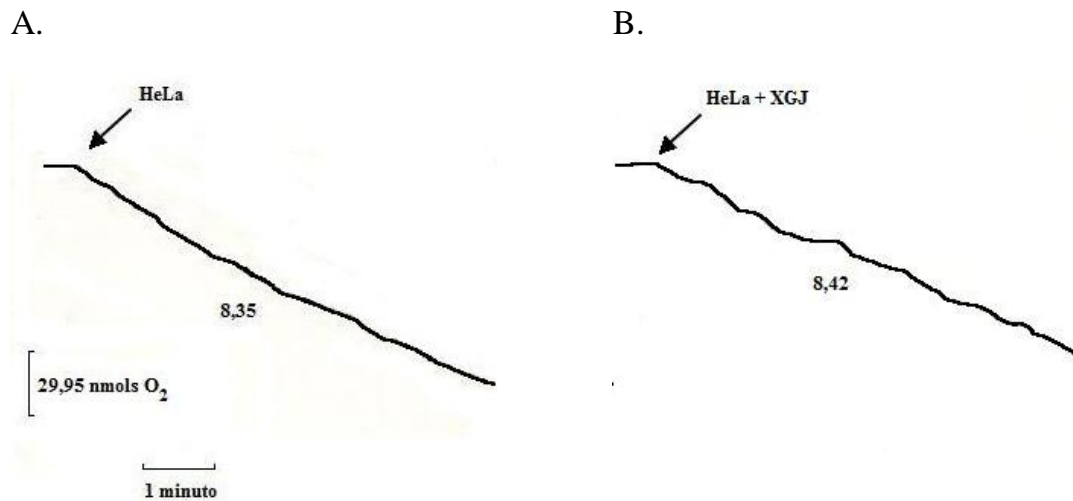


FIGURA 16 - EFEITOS DA XGJ SOBRE O CONSUMO DE O_2 POR CÉLULAS HELA INTACTAS

FONTE: o autor (2010)

NOTA: A. Controle. B. Adição de XGJ $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Células HeLa na densidade de $4\cdot 10^6$ células em 1,3 mL, foram suspensas em solução PBS e incubadas a 28°C , sob agitação. A velocidade do consumo de oxigênio foi determinada polarograficamente, como descrito do item 5.6.7 de Material e Métodos. Resultados expressos em nmol O_2 consumidos/ minuto/ $4\cdot 10^6$ células. Traçados representativos de três experimentos independentes.

Para garantir a entrada do polissacarídeo nas células, utilizou-se uma técnica de permeabilização, a qual permite a incorporação de substâncias que normalmente não atravessariam a barreira da membrana plasmática, sem destruir a integridade ou comprometer o funcionamento da célula. Optou-se pelo uso da digitonina, que é um detergente não iônico que age por interação com o colesterol e outros β hidroxisteróis da membrana plasmática formando poros de tamanho e distribuição homogêneos, que permitem a passagem de moléculas de até 200 kDa (SCHULZ, 1990). Este método não provoca danos às membranas intracelulares, como de mitocôndrias e retículo

endoplasmático, pois as mesmas possuem pouco ou nenhum colesterol (ALBERTS *et al.*, 2002).

Os traçados da FIGURA 17 correspondem aos ensaios realizados em células HeLa permeabilizadas pela digitonina. A adição de succinato e ADP não altera a velocidade de consumo de oxigênio, uma vez que estes substratos não têm acesso à células intactas. A adição de digitonina aumenta a velocidade de consumo de oxigênio devido à permeabilização da membrana e conseqüente entrada do succinato e ADP na mitocôndria. Observa-se que após a adição da digitonina, houve um aumento no consumo de O₂ de células HeLa no sistema em que foi adicionado XGJ porém não na mesma proporção que o controle (FIGURA 17). No experimento controle houve um aumento da velocidade do consumo de oxigênio de 74%, enquanto que no ensaio com a XGJ o aumento foi de apenas 27%, significando uma inibição de 36% promovida pela presença do polissacarídeo.

Após a adição da oligomicina, um composto que se liga ao componente OSCP do complexo F₁F₀ ATPase, bloqueando a entrada de prótons para a matriz mitocondrial, e a conseqüente síntese de ATP ocorre inibição do consumo de oxigênio (NICHOLLS; FERGUSON, 1992). A adição de FCCP, um desacoplador clássico que promove o aumento da velocidade da respiração, reverte o efeito causado pela oligomicina (TERADA, 1981). Ainda na FIGURA 17 pode-se constatar que após a adição de FCCP, a velocidade de consumo de O₂ aumenta no sistema em que foi adicionado a XGJ, porém, novamente, não na mesma proporção que o controle. Enquanto que no controle há um aumento na velocidade de 15% - em relação a velocidade observada após a adição da digitonina. No sistema contendo o polissacarídeo houve um aumento de apenas 47% na velocidade do consumo de oxigênio na presença do desacoplador.

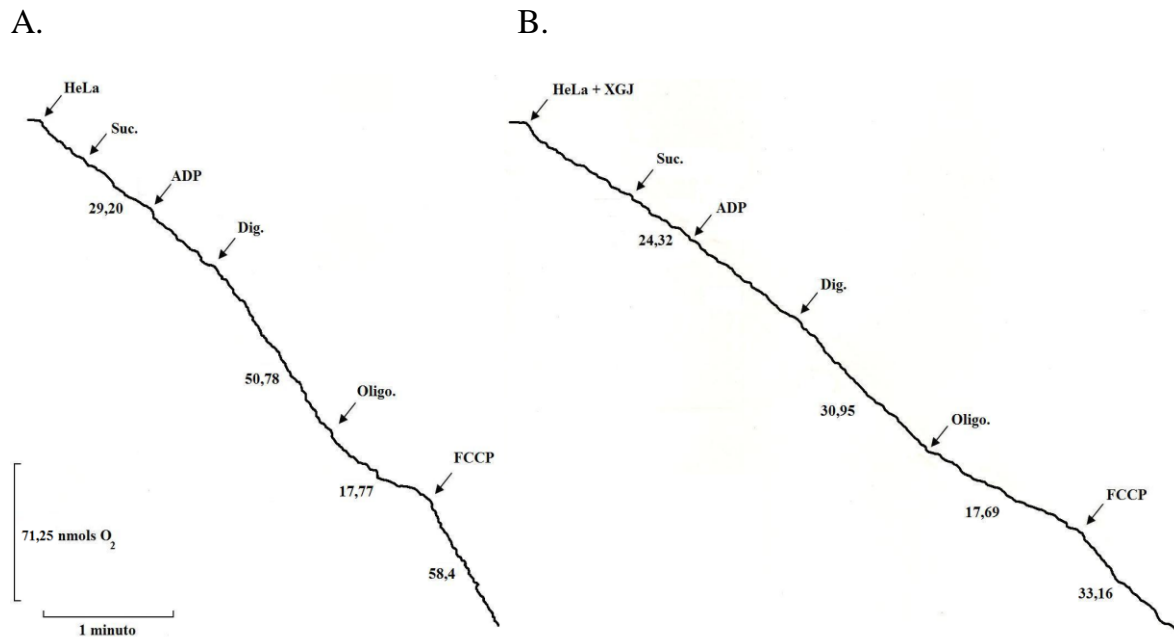


FIGURA 17 - EFEITOS DA XGJ SOBRE O CONSUMO DE O₂ POR CÉLULAS HELA PERMEABILIZADAS

FONTE: o autor (2010)

NOTA: A. Controle. B. Adição de XGJ 200 µg.mL⁻¹. Células HeLa na densidade de 4.10⁶ células em 1,3 mL, foram suspensas em solução PBS e incubadas a 28 °C, sob agitação. A velocidade do consumo de oxigênio foi determinada polarograficamente, como descrito do item 5.6.7 de Material e Métodos. Adições: Suc. Succinato de sódio 10 mmol.L⁻¹, Dig. Digitonina 0,005 g%, Oligo. Oligomicina 3 µg. Quando indicado, ADP e FCCP foram adicionados nas concentrações de 0,8 mmol.L⁻¹ e 1 µmol.L⁻¹, respectivamente. Resultados expressos em nmol O₂ consumidos/ minuto/ 4.10⁶ células. Traçados representativos de três experimentos independentes.

Considerando os resultados apresentados nas FIGURAS 16 e 17 é possível sugerir que, nestas condições experimentais, o polissacarídeo não é capaz de atravessar a membrana plasmática e quando sua entrada é facilitada pela digitonina, um de seus efeitos é o de inibir o consumo de oxigênio. No entanto, o mecanismo relacionado a este efeito exige a realização de outros experimentos, como o estudo dos efeitos da XGJ sobre os complexos da cadeia respiratória mitocondrial.

Estudos sobre efeitos de polissacarídeos sobre o consumo de O₂ por células intactas não foram encontrados na literatura. Porém, a metodologia tem sido

extensivamente utilizada para avaliação dos efeitos de outras drogas (BRENNER-LAVIE; KLEIN; BEN-SHACHAR, 2009; HUSSAIN *et al.*, 2008; BUZZAI *et al.*, 2007; DESQUIRET *et al.*, 2006; PELICANO *et al.*, 2003).

Realizamos então os experimentos de determinação da produção de piruvato e lactato para avaliar uma possível correlação entre a inibição do consumo observada em células permeabilizadas. Os resultados encontram-se apresentados na FIGURA 18. Células HeLa foram incubadas com 5 mmols.L⁻¹ de D-glucose, na presença e na ausência de 200 µg.mL⁻¹ de XGJ, e um método indireto, em que é quantificada a formação ou oxidação de NADH, foi utilizado para a determinação da produção de lactato ou piruvato, respectivamente.

Observa-se que houve uma diminuição de 20% em relação ao controle na produção de piruvato, com diferença significativa nos tempos 0 e 30 minutos, no sistema em que a XGJ foi adicionada. Paralelamente, houve um aumento de 26% em relação ao controle na produção de lactato no tempo de 60 minutos no sistema em que o polissacarídeo estava presente.

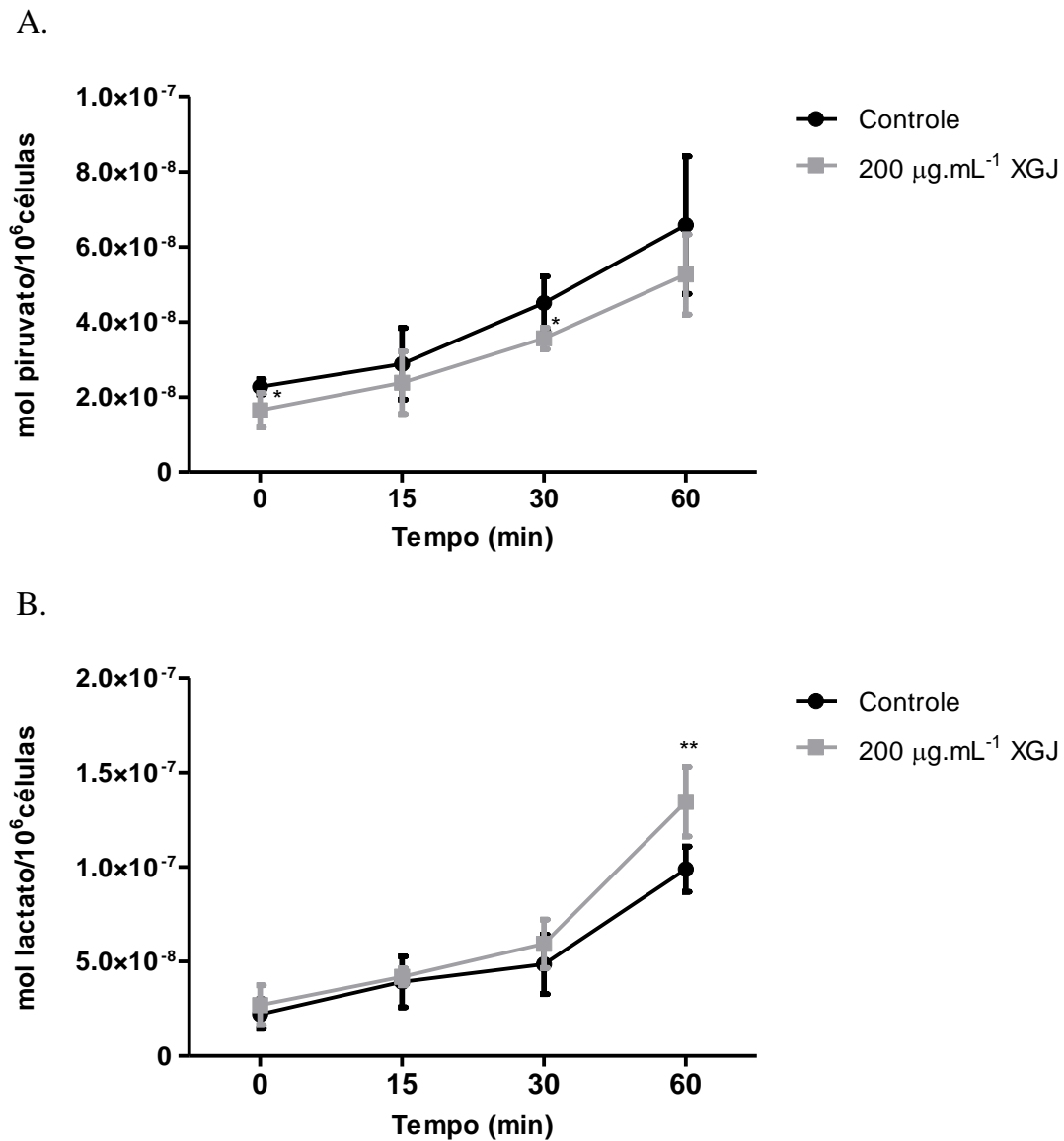


FIGURA 18 - EFEITOS DA XGJ SOBRE A PRODUÇÃO DE PIRUVATO E LACTATO POR CÉLULAS HELA

FONTE: o autor (2010).

NOTA: A. Piruvato. B. Lactato. Células HeLa na densidade de 1.10^6 células.mL⁻¹, foram suspensas em solução PBS e incubadas a 37 °C, sob agitação, e energizadas com D-glucose 5 mmols.L⁻¹. A XGJ na concentração de 200 µg.mL⁻¹ foi adicionada no tempo 0. Alíquotas foram coletadas nos tempos especificados nos gráficos. No sobrenadante foram dosados piruvato e L-lactato, como descrito no item 5.6.8 de Material e Métodos. A leitura da absorbância foi em 340 nm. Os valores representam a média ± DP de três experimentos independentes, em duplicata. *Diferença significativa para o controle; $p < 0,05$. **Diferença significativa para o controle; $p < 0,01$. Controle corresponde ao meio na ausência de XGJ.

Considerando que XGJ parece interferir nas funções mitocondriais relacionadas à provisão de energia, diminuindo o consumo de oxigênio e, conseqüentemente, a oxidação de substratos pela cadeia respiratória, um acúmulo de coenzimas reduzidas na matriz mitocondrial deve ser considerado. Neste caso, a razão NADH/NAD⁺ poderia estar aumentada o que poderia refletir em aumento desta razão também no citosol. Por sua vez, uma razão NADH/NAD⁺ elevada no citosol poderia levar a redução do piruvato a lactato, como observado neste estudo. Deve-se considerar ainda que a produção diminuída de ATP, decorrente da inibição do consumo de oxigênio, poderia ativar a via glicolítica anaeróbia, o que também explicaria os efeitos da XGJ sobre a produção de lactato e piruvato. Outras hipóteses também podem ser levantadas para os efeitos promovidos pela XGJ sobre estes parâmetros. O polissacarídeo poderia estimular enzimas da via glicolítica, ou mesmo a lactato desidrogenase no sentido da redução do piruvato. Estas possibilidades motivam estudos futuros que esclareçam estes efeitos.

Ainda para a interpretação destes resultados deve-se considerar as diferenças metodológicas entre os ensaios de consumo de oxigênio e produção de piruvato e lactato, nomeadamente: a utilização de células permeabilizadas no primeiro e intactas no segundo; o tempo de contato da XGJ com as células, que foi maior (60 min) no ensaio de produção de piruvato e lactato em relação aos experimentos de consumo de oxigênio (~8 min); os substratos utilizados, succinato para o consumo de oxigênio e glucose para a produção de piruvato e lactato.

CONCLUSÕES

Em relação aos efeitos dos tratamentos com PEP, este trabalho permite concluir que:

- 1) Diminui a viabilidade de macrófagos RAW 264.7 de maneira dose-dependente (25 a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), enquanto que em macrófagos peritoneais não teve efeito citotóxico.
- 2) Diminui a viabilidade de células HeLa nas concentrações de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.
- 3) Promove a proliferação de macrófagos RAW 264.7.
- 4) Possui efeito predominantemente indutor da proliferação de células HeLa.
- 5) Aumenta a capacidade fagocítica de macrófagos RAW 264.7.
- 6) Induz um aumento na produção de óxido nítrico em macrófagos peritoneais de camundongos nas concentrações de 25 a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Em relação aos efeitos dos tratamentos com XGJ, pode-se concluir que:

- 1) É altamente citotóxico para macrófagos RAW 264.7 em concentrações maiores que 0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.
- 2) Possui um efeito indutor da proliferação de células HeLa.
- 3) Altera a morfologia de células HeLa na concentração de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.
- 4) Aumenta a capacidade fagocítica de macrófagos RAW 264.7.
- 5) Diminui a velocidade do consumo de O_2 em células HeLa permeabilizadas.
- 6) Promove uma diminuição na produção de piruvato e um aumento na produção de lactato em células HeLa.

Considerando os resultados obtidos no presente estudo pode-se sugerir que tanto PEP quanto a XGJ são moduladores de resposta biológica.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. **Imunologia Celular e Molecular**. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

ABCAM. <http://www.abcam.com/RAW-264-7-Mouse-leukaemic-monocyte-macrophage-cell-line-Whole-Cell-Lysate-ab7187.html> - Disponível em 01/02/2009 acessado às 13:42h.

ABELSON, H.T.; RABSTEIN, L.S. Lymphosarcoma: Virus-induced Thymic-independent Disease in Mice. **Cancer Research**, Philadelphia, v. 30, p. 2213-2222, 1970.

ADAMS, D.S.; PERO, S.C.; PETRO, J.B.; NATHANS, R. ; MACKIN, W.M.; WAKSHULL, E. PGG-glucan activates NF-kappa- β -like and NF-IL-6-like transcription factor complexes in a murine monocytic cell line. **Journal of Leukocyte Biology**, Bethesda, v. 62, p. 865–873, 1997.

ADEREM, A.; UNDERHILL, D.M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Annual Review Immunology**, Palo Alto, v. 17, p. 593–623, 1999.

AHMADI, K.; RIAZIPOUR, M. Effect of *Ganoderma lucidum* on cytokine release by peritoneal macrophages. **Iranian Journal of Immunology**, v. 4, n. 4, p. 220-226, 2007.

ALBAN, S., SCHAUERTE, A.; FRANZ, G. Anticoagulant sulfated polysaccharides: Part I. Synthesis and structure-activity relationships of new pullulan sulfates. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 47, p. 267-276, 2002.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of the Cell**. 4 ed., New York: Garland Science, 2002.

AMATO, R.J. Renal cell carcinoma: review of novel single-agent therapeutics and combination regimens. **Annals of Oncology**, Dordrecht, v. 16, p.7–15, 2005.

BABINEAU, T.J.; MARCELLO, P.; SWAILS, W.; KENLER, A.; BISTRAN, B.; FORSE, R.A. Randomized phase I/II trial of a macrophage-specific immunomodulator (PGG-glucan) in high-risk surgical patients. **Annals of Surgery**, Philadelphia, v. 220, p. 601–609, 1994.

BABIOR, B.M. The respiratory burst oxidase. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, New York, v. 65, p. 49-88, 1992.

BADWAY, J.A.; KARNOVSKI, M.L. Active oxygen species and the functions of phagocytic leucocytes. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 49, p. 695-726, 1980.

BARROSO, P.A.; MARCO, J.D.; CALVOPINA, M.; KATO, H.; KORENAGA, M.; HASHIGUCHI, Y. A trial of immunotherapy against *Leishmania amazonensis* infection in vitro and in vivo with Z-100, a polysaccharide obtained from *Mycobacterium tuberculosis*, alone or combined with meglumine antimoniate. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 59, p. 1123–1129, 2007.

BEINKE, S.; LEY, S.C. Functions of NF- κ B1 and NF- κ B2 in immune cell biology. **Biochemical Journal**, London, v. 382, p. 393-409, 2004.

BERTON, G.; GORDON, S. Modulation of macrophage mannosyl-specific receptors by cultivation on immobilized zymosan. Effects on superoxide-anion release and phagocytosis. **Immunology**, Oxford, v. 49, p. 705-715, 1983.

BEUTLER, B. Innate immunity: an overview. **Molecular Immunology**, Elmsford, v. 40, p. 845-859, 2004.

BOHN, J.A.; BeMILLER, J.N. (1 \rightarrow 4)- β -D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 28, p. 3-14, 1995.

BRENNER-LAVIE, H.; KLEIN, E.; BEN-SHACHAR, D. Mitochondrial complex I as a novel target for intraneuronal DA: Modulation of respiration in intact cells. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 78, p. 85-95, 2009.

BROWN, G.D.; HERRE, J.; WILLIAMS, D.L.; WILLMENT, J.A.; MARSHALL, A.S.J.; GORDON, S. Dectin-1 mediates the biological effects of β -glucans. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 197, n. 9, p. 1119–1124, 2003.

BUCHI, D.F.; SOUZA, W. Internalization of surface components during Fc-receptor mediated phagocytosis by macrophages. **Cell Structure and Function**, Okayama, v. 18, p. 399-407, 1993.

BUSATO, A.P.; VARGAS-RECHIA, C.G.; REICHER, F. Xyloglucan from leaves of *Hymenaea courbaril*. **Phytochemistry**, Kidlington, v. 58, p. 525-531, 2001.

BUSATO, A.P.; VARGAS-RECHIA, C.G.; GORIN, P.A.J.; PETKOWICZ, C.L.; TISCHER, C.A., BOCHICCHIO, R.; REICHER, F. New 4-*O*-substituted xylosyl units in the xyloglucan from leaves of *Hymenaea courbaril*. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 35, p. 277-282, 2005.

BUZZAI, M.; JONES, R.G.; AMARAVADI, R.K.; LUM, J.J.; DEBERARDINIS, R.J.; ZHAO, F.; VIOLLET, B.; THOMPSON, C.B. Systemic treatment with the antidiabetic drug metformin selectively impairs p53-deficient tumor cell growth. **Cancer Research**, Baltimore, v. 67, n. 14, p. 6745-6752, 2007.

CARNEIRO, E.B.B. ; GANTER, J.L.M.S. ; REICHER, F. . Structural aspects of the exudate from the fruit of *Chorisia speciosa* St. Hill. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 26, p. 219-224, 1999.

CARNEIRO, E.B.B. **Polissacarídeos Ácidos de *Chorisia speciosa* St. Hil. (Bombacaceae)**. Curitiba, 2000. Tese de Doutorado em Ciências Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

CARNEIRO-LEÃO, A.M.A.; BUCHI, D.F.; IACOMINI, M.; GORIN, P.A.J.; OLIVEIRA, M.B.M. Cytotoxic effects against HeLa cells of polysaccharide from the lichen *Ramalina celastri*. **Journal of Submicroscopy, Cytology and Pathology**, Bologna, v. 24, n. 4, p. 1-5, 1997.

CARSWELL, E.A.; OLD, L.J.; KASSEL, R.L.; GREEN, S.; FIORE, N.; WILLIAMSON, B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Allahabad, v. 72, p. 3666-3670, 1975.

CHEN, X.; XU, X.; ZHANG, L.ZENG, F. Chain conformation and anti-tumor activities of phosphorylated (1→3)-β-D-glucan from *Poria cocos*. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 78, p. 581–587, 2009.

CLEARY, J.A.; KELLY, G.E.; HUSBAND; A.J. The effect of molecular weight and beta-1,6-linkages on priming of macrophage function in mice by (1,3)-beta-D-glucan. **Immunology & Cell Biology**, Adelaide, v. 77, p. 395–403, 1999.

COHN, Z.A. The activation of mononuclear phagocytes: fact, fancy and future. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 121, p. 813-816, 1978.

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

CRAWFORD, R.M.; FINBLOOM, D.S.; CHARA, J.; PAUL, W.E.; MELTZER, M.S. Bcell stimulatory factor-1 (IL-4) activated macrophages for increased tumoricidal activity and expression of Ia antigens. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 139, p. 135-141, 1987.

CURTIN, J.F.; DONOVAN, M.; COTTER, T.G. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 265, p. 49-72, 2002.

CZOC, R.; LAMPRECHT, W. Pyruvate, phosphoenolpyruvate and D-Glycerate-2-phosphate. **Methods in Enzymology Analyze**, Weinheim, p. 1446-1451, 1974.

DENG, G.; LIN, H.; SEIDMAN, A.; FORNIER, M.; D'ANDREA, G.; WESA, K.; YEUNG, S.; CUNNINGHAM-RUNDLES, S.; VICKERS, A.J.; CASSILETH, B. A phase I/II trial of a polysaccharide extract from *Grifola frondosa* (Maitake mushroom) in breast cancer patients: immunological effects. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, Berlin, v.135, p, 1215–1221, 2009.

DESQUIRET, V.; LOISEAU, D.; JACQUES, C.; DOUAY, O. MALTHIÈTY, P.R.; ROUSSEL, D. Dinitrophenol-induced mitochondrial uncoupling in vivo triggers respiratory adaptation in HepG2 cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1757, p. 21-30, 2006.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 28, p. 350-356, 1956.

DYKEN, S.V.; REESE, T.A.; HUANG, X.; CORRY, D.B.; LOCKSLEY, R.M. *Aspergillus*-induced eosinophil recruitment to murine lung is dependent on cell wall polysaccharides. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 182, p. 80-89, 2009.

EL-HASAN, A.; WALKER, F.; SCHONE, J.; BUCHENAUER, H. Detection of viridiofungin A and other antifungal metabolites excreted by *Trichoderma harzianum* active against different plant pathogens. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 124, p. 457–470, 2009.

ESTABROOK, R.W. Mitochondrial Respiratory Control and The Polarographic Measurement of ADP: Ratios. **Methods in Enzymology**, New York, v. 10, p. 41-47, 1967.

FENG, N.; HONGNAN, J.; WANG, M.; DU, C.; WRIGTH, J.A.; YOUNG, A.H. Antitumor activity of Virulizin, a novel biological response modifier (BRM) in a panel of human pancreatic cancer and melanoma xenografts. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, Berlin, v. 51, p. 247–255, 2003.

GAMAL-ELDEEN, A.M.; AMER, H.; HELMY, W.A.; TALAAT, R.M.; RAGAB, H. Chemically-modified polysaccharide extract derived from *Leucaena leucocephala* alters Raw 264.7 murine macrophage functions. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 7, p. 871-878, 2007.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N nitrates] in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, Bethesda, v. 26, p. 131-138, 1982.

GUTMANN, I.; WAHLEFELD, W.A. L-(+)-Lactate determination with lactate dehydrogenase and NAD. **Methods in Enzymology Analyze**, Weinheim, p. 1464-1469, 1974.

HAAK-FRENDSCHO, M.; WYNN, T.A.; CZUPRYNSKI, C.J.; PAULNOCK, D. Transforming growthfactor- β 1 inhibits activationof macrophage cell line RAW264.7 for cell killing. **Clinical & Experimental Immunology**, Oxford, v. 82, p. 404-410, 1990.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals reactive species and toxicology. In: Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. (eds.), **Free Radical Biology & Medicine**, p. 544-616, 1999.

HU, J.-F; GARO, E.; HOUGH, G.W.; GOERING, M.G.; O'NEIL-JOHNSON, M.; ELDRIDGE, G.R. Antibacterial, partially acetylated oligorhamnosides from *Cleistopholis patens*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 69, p. 585-590, 2006.

HUSSAIN, S.-R.; LUCAS, D.M.; JOHNSON, A.J.; LIN, T.S.; BAKALETZ, A.P.; DANG, V.X.; VIATCHENKO-KARPINSKI, S.; RUPPERT, A.S.; BYRD, J.C.; KUPPUSAMY, P.; CROUSER, E.D.; GREVER, M.R. Flavopiridol causes early mitochondrial damage in chronic lymphocytic leukemia cells with impaired oxygen consumption and mobilization of intracellular calcium. **Blood**, New York, v. 111, n. 6, 2008.

IM, S.-A.; OH, S.-T.; SONG, S.; KIM, M.-R.; KIM, D.-S.; WOO, S.-S.; JO, T.H.; PARK, Y.I.; LEE, C.-K. Identification of optimal molecular size of modified *Aloe* polysaccharides with maximum immunomodulatory activity. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 5, p. 271-279, 2005.

IM, S.-A.; KIM, K.; LEE, C.-K. Immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Salicornia herbacea*. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 6, p. 1451-1458, 2006.

IM, S.-A.; LEE, Y.-R.; LEE, Y.-H.; OH, S.-T.; GERELCHULUUN, T.; KIM, B.-H.; KIM, Y.; YUN, Y.-P.; SONG, S.; LEE, C.-K. Synergistic activation of monocytes by polysaccharides isolated from *Salicornia herbacea* and interferon- γ . **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 111, p. 365-370, 2007.

JEON, Y.J.; HAN, S.B.; AHAN, K.S.; KIM, H.M. Activation of NF- κ B/Rel in angellan-stimulated macrophages. **Immunopharmacology**, New York, v. 43, p. 1-9, 1999.

JEON, Y.J.; KIM, H.M. Experimental evidences and signal transduction pathways involved in the activation of NF- κ B/Rel by angellan in murine macrophages. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 1, p. 1331-1339, 2001.

JIA, X.-N.; DONG, W.; LU, W.-D.; GUO, L.-Z.; WEI, Y.-X. In vivo immunostimulatory and tumor-inhibitory activities of polysaccharides isolated from solid-state-cultured *Trametes robiniophila* Murrill. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 25, p. 2057-2063, 2009.

KAMINSKI, N.E.; ROBERTS, J.F.; GUTHRIE, F.E. A rapid spectrophotometric method for assessing macrophage phagocytic activity. **Immunology Letters**, Amsterdam, v. 10, p. 329-331, 1985.

KANG, E.H.; GEBRU, E.; KIMB, M.H.; CHENG, H.; PARK, S.-C. EstA protein, a novel virulence factor of *Streptococcus pneumoniae*, induces nitric oxide and pro-inflammatory cytokine production in RAW 264.7 macrophages through NF- κ B/MAPK. **Microbial Pathogenesis**, London, v. 47, p. 196-201, 2009.

KARDOSOVÁ, A.; EBRINGEROVÁ, A.; ALFOLDI, J.; NOSAL'OVA, G.; MATAKOVA, T.; HRIBALOVA, V. Structural features and biological activity of an acidic polysaccharide complex from *Mahonia aquifolium* (Pursh) Nutt. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 57, p. 165-176, 2004.

KATO, Y.; UCHIDA, J.; ITO, S.; MITSUISHI, Y. Structural analysis of the oligosaccharides units of xyloglucan and their effects on growth of COLO 201 human tumor cells. **International Congress Series**, Amsterdam, v. 1223, p. 161-164, 2001.

KIM, Y.-C.; CHOI, G.-S.; LEEB, S.-H.; PARKA, Y.-M. Acidic polysaccharide isolated from *Phellinus linteus* enhances through the up-regulation of nitric oxide and tumor necrosis factor- α from peritoneal macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 95, p. 64-76, 2004.

KITAJMA, Y. Structural and biochemical characteristics of pathogenic fungus: cell walls, lipids and dimorphism, and action modes of antifungal agents. **Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi**, Bunkyo-ku, v. 41, p. 211-217, 2000.

KLEBANOFF, S. J. Oxygen metabolites from phagocytes In: **Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates**. Raven Press, p. 541-588, 1992.

KLIMP, A.H.; VRIES, E.G.E.; SCHERPHOF, G.L.; DAEMEN, T. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, Shannon, v. 44, n. 2, p. 143-161, 2002.

KONO, K.; KAWAGUCHI, Y.; MIZUKAMI, Y.; MIMURA, K.; SUGAI, H.; AKAIKE, H.; FUJII, H. Protein-bound polysaccharide K partially prevents apoptosis of circulating T cells induced by anti-cancer drug S-1 in patients with gastric cancer. **Oncology**, Basel, v. 74, n. 3-4, p. 143-149, 2008.

KUENG, W.; SILBER, E.; EPPENBERGER, U. Quantification of cells cultured on 96-well plates. **Analytical Biochemistry**, Bethesda, v. 182, p. 16-19, 1989.

KRISHNATRY, A.S.; BRAZEAU, D.A.; FUNG, H. Broad regulation of matrix and adhesion molecules in THP-1 human macrophages by nitroglycerin. **Nitric Oxide**, Orlando, In press: doi:10.1016/j.niox.2009.10.004, 2009.

KWOK, T.T.; CHEN, P.; LIU, P.Y.; TANG, Y.C.; KONG, S.K.; FUNG, K.P. The anti-tumour effect of *Klebsiella pneumoniae* capsular polysaccharides. **Biological Signals**, Basel, v. 10, p. 294-298, 2001.

LEE, Y.S.; HAN, O.K.; PARK, C.W.; YANG, C.H.; JEON, T.W.; YOO, W.K.; KIMF, S.H.; KIMC, H.J. Pro-inflammatory cytokine gene expression and nitric oxide regulation of aqueous extracted *Astragali* radix in RAW 264.7 macrophage cells. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 100, p. 289-294, 2005.

LEE, D.K.; JANG, S.; KIM, M.J.; KIM, J.H.; CHUNG, M.J.; KIM, K.J.; HA, N.J. Anti-proliferative effects of Bifidobacterium adolescentis SPM0212 extract on human colon cancer cell lines. **BMC Cancer**, v. 8, p. 310-318, 2008.

LEIRO, J.M.; CASTRO, R.; ARRANZ, J.A.; LAMAS, J. Immunomodulating activities of acidic sulphated polysaccharides obtained from the seaweed *Ulva rigida* C. Agardh. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 7, p. 879-888, 2007.

LÉO, P.; GALES, A.L.L.; SUAZO, C.A.T.; MORAES, A.M. Células Animais: Conceitos Básicos. In: MORAES, A.M.; AUGUSTO, E.F.P.; CASTILHO, L. D. **Tecnologia de Cultivo de Células Animais: de Biofármacos a Terapia Gênica**. 1ª Ed. Ed. Roca, p. 15-41, 2008.

LEUNG, M.Y.K.; LIU, C.; ZHU, L.F.; HUI, Y.Z.; YU, B.; FUNG, K.P. Chemical and Biological Characterization of a Polysaccharide Biological Response Modifier from *Aloe vera* L. var. *chinensis* (Haw.) Berg. **Glycobiology**, Oxford, v. 14, n. 6, p. 501-510, 2004.

LEUNG, M.Y.K.; LIU, C.; KOON, J.C.M.; FUNG, K.P. Polysaccharide Biological Response Modifiers. **Immunology Letters**, Amsterdam, v. 105, p. 101-114, 2006.

LI, B.; ALLENDORF, D.J.; HANSEN, R.; MARROQUIN, J.; DING, C.; CRAMER, D.E.; YAN, J. Yeast beta-glucan amplifies phagocyte killing of iC3b-opsonized tumor cells via complement receptor 3-syk-phosphatidylinositol 3-kinase pathway. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 177, p. 1661-1669, 2006.

MA, J.; CHEN, T.; MANDELIN, J.; CEPONIS, A.; MILLER, N.E.; HUKKANEN, M.; MA, G.F.; KONTTINEN, Y.T. Regulation of macrophage activation. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 60, p. 2334-2346, 2003.

MACKAY, R.J.; RUSSEL, S.W. Protein changes associated with stages of activation of mouse macrophages for tumor cell killing. **Journal of Immunology**. Baltimore, v. 137, p.1392-1398, 1986.

MARCINKIEWICZ, J. Nitric oxide and antimicrobial activity of reactive oxygen intermediates. **Immunopharmacology**, New York, v. 37, p. 35-41, 1997.

MACMICKING, J.; QIAO-WEN, X.; NATHAN, C. Nitric Oxide and Macrophage Function. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 15, p. 323-350, 1997.

MACMICKING, J. Recognizing macrophage activation and host defense. **Cell Host & Microbes**, v. 5, p. 405-407, 2009.

MARTINEZ, F.O.; HELMING, L.; GORDON, S. Alternative activation of macrophage: an immunologic functional perspective. **The Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 27, p. 451-483, 2009.

MARTINICHEN-HERRERO, J.C.; CARBONERO, E.R.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. Anticoagulant and antithrombotic activity of a sulfate obtained from a glucan component of the lichen *Parmotrema mantiqueirensis* Hale. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 60, p. 7-13, 2005.

MARUYAMA, S.; AKASAKA, T.; YAMADA, K.; TACHIBANA, H. *Cistanche salsa* extract acts similarly to protein-bound polysaccharide-K (PSK) on various types of cell lines. **Journal of Traditional Medicines**, Beijing, v. 25, p. 166-169, 2008.

MASTROMARINO, P.; PETRUZZIELLO, R.; MACCHIA, S.; RIETI, S.; NICOLETTI, R.; ORSI, N. Antiviral activity of natural and semisynthetic polysaccharides on the early steps of rubella virus infection. **Journal of Antimicrobial chemotherapy**. v. 39, p. 339-345, 1997.

MAYER, B., HEMMENS, B. Biosynthesis and Action of Nitric Oxide in Mammalian cells. **Trends in Biochemical Sciences**, Amsterdam, v. 22, p. 477-481, 1997.

MELLINGER, C.G.; CARBONERO, E.R.; NOLETO, G.R.; CIPRIANI, T.R.; OLIVEIRA, M.B.M.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. Chemical and biological properties of an arabinogalactan from *Phyllanthus niruri*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, n. 68, v. 10, p. 1479-1483, 2005.

MELLINGER, C.G.; CIPRIANI, T.R.; NOLETO, G.R.; CARBONERO, E.R.; OLIVEIRA, M.B.M.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. Chemical and immunological modifications of an arabinogalactan present in tea preparations of *Phyllanthus niruri* after treatment with gastric fluid. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 43, p. 115-120, 2008.

MENDES, S.F.; SANTOS JR, O.; BARBOSA, A.M.; VASCONCELOSA, A.F.D.; ARANDA-SELVERIOA, G.; MONTEIRO, N.K.; DEKKERC, R.F.H.; PEREIRA, M.S.; TOVARD, A.M.F.; MOURÃO, P.A.S.; SILVAM, .L.C. Sulfonation and anticoagulant activity of botryosphaeran from *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 grown on fructose. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 45, p. 305-309, 2009.

MIZUNO, T.; OHSAWA, K.; HAGIWARA, N.; KUBOYAMA, R. Fractionation and characterization of antitumor polysaccharides from Maitake, *Grifola frondosa*. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 50, p. 1679-1688, 1986.

MIZUNO, T.; KINOSHITA, T.; ZHUANG, C.; ITO, H.; MAYUZUMI, Y. Antitumor-active heteroglycans from *Niohshimeji* Mushroom, *Tricholoma giganteum*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 59, p. 568-571, 1995.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. **Pharmacological Reviews**, Baltimore, v. 43, p. 109-141, 1991.

MORETÃO, M.P.; BUCHI, D.F.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M.; OLIVEIRA, M.B.M. Effect of acidic heteropolysacchride (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco) on peritoneal macrophage functions. **Immunology Letters**, Amsterdam, v. 89, p. 175-185, 2003.

MORETÃO, M.P.; ZAMPRONIO, A.R.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M.; OLIVEIRA, M.B.M. Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages activated by an acidic heteropolysacchride (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco). **Immunology Letters**, Amsterdam, v. 93, p. 189-197, 2004.

MORETÃO, M.P. **Propriedades Biomoduladoras da Arabinogalactana (ARAGAL) de *Anadenanthera colubrina* (Angico Branco)**. Curitiba, 2004. Tese de

Doutoramento em Ciências Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay of cellular growth and survival: application to proliferate and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 65, p. 55-63, 1983.

MOSSER, D.M. The many faces of macrophage activation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 73, p. 209-212, 2003.

MOURÃO, P.A.S.; BOISSON-VIDAL, C.; TAPON-BRETAUDIÈRE, J.; DROUET, B.; BROS, A.; FISCHER, A.M. Inactivation of thrombin by a fucosylated chondroitin sulfate from echinoderm. **Thrombosis Research**, Elmsford, v. 102, p. 167-176, 2001.

MULLER, B.; KRAUS, J.; FRANZ, G. Chemical structure and biological activity of water-soluble polysaccharides from *Cassia angustifolia* leaves. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 55, p. 536-539, 1989.

NATHAN, C.F. Regulation of macrophages oxidative metabolism and antiparasitic activity. In: van FURTH, R. **Mononuclear Phagocytes Characteristics, Physiology and Function**, Boston: Martinus Nijhoff, p. 411-420, 1985.

NI, Y.; TURNER, D.; YATES, K.M.; TIZARD, I. Isolation and characterization of structural components of *Aloe vera* L. leaf pulp. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 4, p. 1745-1755, 2004.

NICHOLLS, D.G.; FERGUSON, S.J. **Bioenergetics 2**. San Diego: Academic Press, 1992.

NOLETO, G.R.; MERCÊ, A.L.R.; IACOMINI, M.; GORIN, P.A.J.; THOMASOCCOL, V.; OLIVEIRA, M.B.M. Effects of a lichen galactomannan and its vanadyl (IV) complex on peritoneal macrophages and leishmanicidal activity. **Molecular and Cellular Biochemistry**, The Hague, v. 233, p. 73-83, 2002.

NOLETO, G.R.; MERCÊ, A.L.R.; IACOMINI, M.; GORIN, P.A.J.; OLIVEIRA, M.B.M. Yeast mannan-vanadium (IV) complexes and then effects on peritoneal macrophages. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 57, p. 113-122, 2004.

NOLETO, G.R.; PETKOWICZ, C.L.O.; MERCÊ, A.L.R.; NOSEDA, M.D.; MÉNDEZ-SÁNCHEZ, S.C.; REICHER, F.; OLIVEIRA, M.B.M. Two galactomannan preparations from seeds from *Mimosa scabrella* (bracatinga): Complexation with oxovanadium(IV/V) and cytotoxicity on HeLa cells. **Journal of Inorganic Biochemistry**, New York, v. 103, p. 749-757, 2009.

PANICO, A.M.; CARDILE, V.; GARUFI, F.; PUGLIA, C.; BONINA, F.; RONSISVALLE, S. Effect of hyaluronic acid and polysaccharides from *Opuntia ficus*

indica (L.) cladodes on the metabolism of human chondrocyte cultures. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 315 – 321, 2007.

PAULY, M.; FREIS, O.; PAULY, G. Galactomannan and xyloglucan: Bio-active polysaccharides. **Altured's Cosmetics & Toiletries**, v. 114, p. 65-78, 1999.

PELICANO, H.; FENG, L.; ZHOU, Y.; CAREW, J.S.; HILEMAN, E.O.; PLUNKETT, W.; KEATING, M.J.; HUANG, P. A novel strategy to enhance drug-induced apoptosis in human leukemia cells by a reactive oxygen species-mediated mechanism. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 278, n. 39, 2003.

PFEIFFER, Z.A.; AGA, M.; PRABHU, U.; WATTERS, J.J.; HALL, D.J.; BERTICS, P.J. The nucleotide receptor P2X7 mediates actin reorganization and membrane blebbing in RAW 264.7 macrophages via p38 MAP kinase and Rho. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v. 75, p. 1173-1182, 2004.

POLESHKO, A.; PALAGIN, I.; ZHANG, R.; BOIMEL, P.; CASTAGNA, C.; ADAMS, P.D.; SKALKA, A.M.; KATZ, R.A. Identification of cellular proteins that maintain retroviral epigenetic silencing: evidence for an antiviral response. **Journal of Virology**, Washington, v. 82, n. 5, p. 2313–2323, 2008.

PONCE, N.M.; PUJOL, C.A.; DAMONTE, E.B.; FLORES, M.L.; STORTZ, C.A. Fucoidans from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*: extraction methods, antiviral activity and structural studies. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 338, p. 153–165, 2003.

RADKAR, V.; LAU-CAM, C.; HARDEJ, D.; BILLACK, B. The role of surface receptor stimulation on the cytotoxicity of resveratrol to macrophages. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, p. 3664–3670, 2008.

RAMAMOORTHY, L.; TIZARD, I.R. Induction of apoptosis in a macrophage cell line RAW 264.7 by acemannan, a β -(1,4)-acetylated mannan. **Molecular Pharmacology**, New York, v. 53, p. 415–421, 1998.

RAMESH H.P.; YAMAKI K.; TSUHIDA T. Effect of fenugreek (*Trigonella foenumgraecum* L.) galactomannan fractions on phagocytosis in rat macrophages and on proliferation and IgM secretion in HB4C5 cells. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 50, p. 79-83, 2002.

RASCHKE, W.C.; BAIRD, S.; RALPH, P.; NAKOINZ, I. Functional macrophage cell lines transformed by abelson leukemia virus. **Cell**, Cambridge, v. 15, p. 261-267, 1978.

REANG, P.; GUPTA, M.; KOHLI, K. Biological Response Modifiers in Cancer. **Medscape General Medicine**, v. 8, n. 4, p. 33-39, 2006.

REILLY, T.P.; BELLEVUE, F.H.; WOSTER, P.M.; SVENSSON, C.K. Comparison of the in Vitro Cytotoxicity of Hydroxylamine Metabolites of Sulfamethoxazole and Dapsone. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 55, p. 803-810, 1998.

ROSÁRIO, M.M.T. **Obtenção e Aplicação de Xiloglucanas em Testes sobre Macrófagos Peritoneais de Camundongo**. Curitiba, 2006. Dissertação de Mestrado em Ciências Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

ROSÁRIO, M.M.T.; NOLETO, G.R.; BENTO, J.F.; REICHER, F.; OLIVEIRA, M.B.M.; PETKOWICZ, C.L.O. Effect of storage xyloglucans on peritoneal macrophages. **Phytochemistry**, New York, v. 69, p. 464-472, 2008.

ROSENBERG, S.A. Principles and applications of biologic therapy. In: DE VITA, V.T., HELLMANN, S.; ROSENBERG, S.A. (eds) **Cancer: principles & practice of oncology**. 4 ed. Philadelphia: J. B. Lippincott, 1993, p. 276-292.

SAIMA, Y.; DAS, A.K.; SARKAR, K.K.; SEN, A.K.; SUR, P. An antitumor pectic polysaccharide from *Feronia limonia*. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 27, p. 333-335, 2000.

SANZ, M.L.; COTE, G.L.; GIBSON, G.R.; RASTALL, R.A. Prebiotic properties of alternansucrose maltose-acceptor oligosaccharides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, p. 5911-5916, 2005.

SATO, T.; IWABUCHI, K; NAGAOKA, I; ADACHI, Y.; OHNO, N.; TAMURA, H.; SEYAMA, K.; FUKUCHI, Y.; NAKAYAMA, H.; YOSHIZAKI, F.; TAKAMORI, K.; OGAWA, H. Induction of human neutrophil chemotaxis by *Candida albicans*-derived β -1,6-long glycoside side-chain-branched β -glucan. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v. 80, p. 204-211, 2006.

SCHEPETKIN, I.A.; QUINN, M.T. Botanical Polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 6, p. 317-333, 2006.

SCHEPETKIN, I.A.; XIE, G.; KIRPOTINA, L.N.; KLEIN, R.A.; JUTILA, M.A.; QUINN, M.T. Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Opuntia polyacantha*. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 8, p. 1455 – 1466, 2008.

SCHILLER, M.; METZE, D.; LUGER, T.A.; GRABBE, S.; GUNZER, M. Immune response modifiers – mode of action. **Experimental Dermatology**, Oxford, v.15, p. 331-341, 2006.

SCHULZ, I. Permeabilizing cells: Some methods and applications for the study of intracellular processes. **Methods in Enzymology**, New York, v. 192, p. 280-300, 1990.

SEGAL, A.W.; ABO, A. The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes. **Trends in Biochemical Sciences**, Amsterdam, n. 18, v. 2, p. 43-47, 1993.

SKLOOT, R. **HeLa: The Immortal Life of Henrietta Lacks**, Nova Iorque: Random House, 2007.

SON, H.J.; HAN, D.-W.; BAEK, H.S.; LIM, H.R.; LEE, M.H.; WOO, Y.I.; PARK, J.-C. Stimulated TNF- α release in macrophage and enhanced migration of dermal fibroblast by β -glucan. **Current Applied Physics**, v. 7S1, p. e33–e36, 2007.

SONG, J.Y.; HAN, S.K.; SON, E.H.; PYO, S.N.; YUN, Y.S.; YI, S.Y. Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages by ginsan. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 2, p. 857-865, 2002.

SOUBA, W.W. Cytokine control of nutritional and metabolism in critical illness. **Current Problems in Surgery**, Chicago, v. XXXI (7), p. 579-643, 1994.

STAHEL, P.F.; SMITH, W.R.; MOORE, E.E. Role of biological modifiers regulating the immune response after trauma. **Injury: International Journal of the Care Injured**, v. 38, p. 1409-1422, 2007.

STEVAN, F.R.; OLIVEIRA, M.B.M.; BUCCHI, D.F.; NOSEDA, M.D.; IACOMINI, M.; DUARTE, M.E.R. Cytotoxic effects against HeLa cells of polysaccharides from seaweeds. **Journal of Submicroscopy Cytology and Pathology**, Paris, v. 33, n. 4, p. 477-484, 2001.

SUN, Y.; LIANG, H.; CAI, G.; GUAN, S.; TONG, H.; YANG, X.; LIU, J. Sulfated modification of the water-soluble polysaccharides from *Polyporus albicans* mycelia and its potential biological activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 44, p. 14-17, 2009.

STUELP-CAMPELO, P.M.; OLIVEIRA, M.B.M.; CARNEIRO-LEÃO, A.A.; CARBONERO, E.R.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. Effect of a soluble α -D-glucan from the lichenized fungus *Ramalina celastri* on macrophage activity. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 2, p. 691-698, 2002.

TALARICO, L.B.; ZIBETTI, R.G.M.; FARIA, P.C.S.; SCOLARO, L.A.; DUARTE, M.E.R.; NOSEDA, M.D.; PUJOL, C.A.; DAMONTE, E.B. Anti-herpes simplex virus activity of sulfated galactans from the red seaweeds *Gymnogongrus griffithsiae* and *Cryptonemia crenulata*. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 34, p. 63-71, 2004.

TARTAGLIA, L.A.; AYRES, T.M.; WONG, G.H.; GOEDEL, D.V. A novel domain within the 55kd TNF receptor signals cell death. **Cell**, Cambridge, v. 74, n. 5, p. 845-853, 1993.

TAYLOR, P.R.; MARTINEZ-POMAREZ, L.; STACEY, M.; LIN, H-H.; BROWN, G.D.; GORDON, S. Macrophage receptors and immune recognition. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 23, p. 901-944, 2005.

TERADA, H. The interaction of highly active uncouplers with mitochondria. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 639, p. 225-242, 1981.

TSUJITANI, S.; OSAKI, T.; SAITO, H.; FUKUDA, K.; TATEBE, S.; IKEGUCHI, M. The NKG2D expression on CD8+ T cells and the efficacy of polysaccharide K (PSK) in gastric cancer. **Journal of Clinical Oncology**, Alexandria, v. 26, n. 15S, p. 3065, 2008.

TOKUNAKA, K.; OHNO, N.; ADACHI, Y.; TANAKA, S.; TAMURA, H.; YADOMAE, T. Immunopharmacological and immunotoxicological activities of a water-soluble (1→3)-β-D-glucan, CSBG from *Candida spp.* **International Journal of Immunopharmacology**, Oxford, v. 22, p. 383-394, 2000.

TZIANABOS, A.O. Polysaccharide Immunomodulators as Therapeutic agents: Structural aspects and biologic function. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 13, n. 4, p. 523-533, 2000.

VASTA, G. R.; QUESENBERRY, M.; AHMED, H.; O'LEARY, N. C-type lectins and galectins mediate innate and adaptive immune functions: their roles in the complement activation pathway. **Developmental & Comparative Immunology**, New York, v. 23, p. 401-420, 1999.

VAZQUÉZ-LOPEZ, C.; ARMAS-SERRA, C.; BERNARDINA, W.; RODRIGUEZ-CAABEIRO, F. Oral inoculation with *Gymnorhynchus gigas* induces anti-parasite anaphylactic antibody production in both mice and rats and adverse reactions in challenge mice. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, p. 307-315, 2001.

WEINBERG, R.A. **A Biologia do Câncer**. Porto Alegre: Artmed, 2008.

WILLIAMS, J.D.; TOPLEY, N.; ALOBAIDI, H.M.; HARBER, M.J. Activation of human polymorphonuclear leukocytes by particulate zymosan is related to both its major carbohydrate components: glucan and mannan. **Immunology**, Oxford, v. 58, p. 117-125, 1986.

WILLMENT, J.A.; GORDON, S.; BROWN, D.G. Characterization of the human β -glucan receptor and its alternatively spliced isoforms. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 276, n. 47, p. 43818–43823, 2001.

XIE, W.; XU, P.; WANG, W.; LIU, Q. Preparation and antibacterial activity of a water-soluble chitosan derivative. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 50, p. 35-40, 2002.

YADAV, M.; SCHOREY, J.S. The β -glucan receptor dectin-1 functions together with TLR2 to mediate macrophage activation by mycobacteria. **Blood**, New York, v. 8, n. 9, 2006.

YAN, J.; VETVICKA, V.; XIA, Y.; COXON, A.; CARROLL, M.C.; MAYADAS, T.N.; ROSS, G.D. β -Glucan, a “specific” biologic response modifier that uses antibodies to target tumors for cytotoxic recognition by leukocyte complement receptor type 3 (CD11b/CD18). **Journal of Immunology**, Baltimore, n. 163, p. 3045–3052, 1999.

YANG, X.; ZHAO, Y.; LV, Y.; YANG, Y.; RUAN, Y. Protective effect of polysaccharide fractions from *Radix A. Sinensis* against *tert*-Butylhydroperoxide induced oxidative injury in murine peritoneal macrophages. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, n. 6, p. 928 – 935, 2007.

YAMADA, H.; KOMIYAMA, K.; KIYOHARA, H.; CYONG, J.-C.; HIRAKAWA, Y.; OTSUKA, Y. Structural characterization and antitumor activity of a pectic polysaccharide from roots of *Angelica acutiloba*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 56, p. 182-186, 1990.

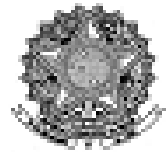
YU, M.; XU, X.; QING, Y.; LUO, X.; YANG, Z.; ZHENG, L. Isolation of an anti-tumor polysaccharide from *Auricularia polytricha* (jew’s ear) and its effects on macrophage activation. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 228, p. 477-485, 2009.

ZHA, X.-Q; LUO, J.-P.; JIANG, S.-F. Induction of immunomodulating cytokines by polysaccharides from *Dendrobium huoshanense*. **Pharmaceutical Biology**, Lisse, v. 45, n. 1, p. 71-76, 2007.

ANEXO



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comitê de Ética em Experimentação Animal
(CEEA)



Nº 393

CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno do CEEA, CERTIFICA que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEEA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

PROCESSO:

23075.095163/2009-31

APROVADO:

05/08/2009 – R.O. 07/2009

TÍTULO:

Avaliação dos efeitos imunomoduladores e citotóxicos de polissacarídeos obtidos de *Charisia speciosa* St. Hill e *Hymenaea courbaril*

AUTORES:

Guilhermina Rodrigues Nolto, Sílvia M. S. Correia Cadena, Juliana da Costa Silveira, Mônica Mendes K. Marcolino, Marianna Maia Taulois do Rosário

DEPARTAMENTO: Bioquímica

Prof.ª Dr.ª Ana Maria C. Filadelfi
Coordenadora do CEEA

