

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIANNA MAIA TAULOIS DO ROSÁRIO

**CARACTERIZAÇÃO DE XILOGLUCANAS NATIVAS E MODIFICADAS E EFEITOS  
SOBRE VIAS DE ATIVAÇÃO EM MACRÓFAGOS PERITONIAIS DE  
CAMUNDONGOS**

Curitiba

2010

MARIANNA MAIA TAULOIS DO ROSÁRIO

**CARACTERIZAÇÃO DE XILOGLUCANAS NATIVAS E MODIFICADAS E EFEITOS  
SOBRE VIAS DE ATIVAÇÃO EM MACRÓFAGOS PERITONIAIS DE  
CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências – Bioquímica.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Carmen Lúcia de Oliveira Petkowicz

Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Guilhermina Rodrigues Noleto

Curitiba

2010

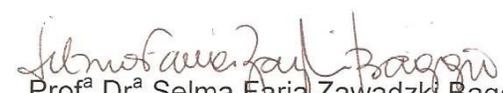
## TERMO DE APROVAÇÃO

MARIANNA MAIA TAULOIS DO ROSÁRIO

**Caracterização de xiloglucanas nativas e modificadas e efeitos sobre vias de ativação em macrófagos peritoneais de camundongos**

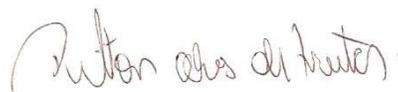
Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências – Bioquímica, no Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Carmen Lúcia de Oliveira Petkowicz (Orientadora)  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR

  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Selma Faria Zawadzki Baggio  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR

  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Patrícia Maria Stuelp Campelo  
Pontifícia Universidade Católica do Paraná

  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mariana Piemonte Moretão  
Universidade Positivo

  
Prof Dr Rilton Alves de Freitas  
Universidade do Vale do Itajaí

Curitiba, 10 de Setembro de 2010.

Aos meus pais Rose e Luiz por  
sempre incentivar a realização deste  
trabalho.

Ao Cassius, por me mostrar que, a  
cada minuto, eu posso ser uma pessoa  
melhor.

A Carol, por nunca me  
decepcionar.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, ao meu anjo-da-guarda e aos meus guias por serem minhas forças nos momentos de alegria e de dificuldade, por acompanharem e iluminarem a minha vida.

Aos meus pais Rose e Luiz pelo amor, carinho, amizade e conselhos. As nossas longas conversas e discussões, que sempre enriqueceram e ajudaram nas minhas escolhas. Esta vitória eu dedico a vocês. Obrigada por existirem.

À Karina que me deu o maior e melhor presente no dia da minha defesa, o meu lindo e amado sobrinho Vicente.

Ao Cassius, por ser meu parceiro de todas as horas, por andarmos lado a lado em busca do nosso futuro, você teve um papel fundamental para conclusão deste trabalho. Obrigada pelo carinho, apoio, paciência e amor. Obrigada por me mostrar a felicidade.

À minha querida e amada “amiga-irmã”, Carolina Aires, sua amizade foi o maior presente do meu doutorado. Cresci pessoalmente e profissionalmente ao seu lado. Você enriquece a minha vida, é o meu orgulho, meu exemplo, afinal, você NUNCA, absolutamente NUNCA me decepcionou. Obrigada, pelo estímulo, incentivo, carinho, amizade, longas conversas, risadas, conquistas e por ter compartilhado sua vida comigo. Amo você.

À minha melhor amiga, ou melhor, quase irmã Gisele, pela amizade fiel, incentivo e apoio em todos os momentos da minha vida.

À Professora Carmen pela correção do nosso artigo e deste trabalho.

À Professora Guilhermina pelas discussões dos resultados, correções do trabalho, pelos estímulos e conselhos que foram fundamentais para a conclusão desta tese.

À Professora Maria Benigna, *in memorium*, pelo exemplo de professora e educadora. Sempre serei grata por ter compartilhado momentos ímpares ao seu lado.

À banca interna, composta pelas Professoras Selma e Sílvia, as quais contribuíram e enriqueceram o meu trabalho com conselhos, perguntas, discussões e correções.

À banca, compostas pelos Professores Hilton, Patrícia, Mariana e Selma que fizeram de mim uma aluna de sorte por ter tido a oportunidade de compartilhar seus conhecimentos. Cada comentário foi de extrema importância para a solidificação e lapidação deste trabalho. Agradeço por todos os questionamentos, discussões e correções realizadas. Foi inquestionável o papel de cada uma para a conclusão desta tese.

À Professora Joana Leá, pelo carinho, amizade e incentivo. Sempre serei grata aos seus conselhos, colo e ajuda nos momentos de desespero. Foi uma honra conhecê-la e tê-la como amiga.

À Professora Juliana pelo carinho, amizade, conversas, dicas, risadas, e além de tudo isso, as valiosas dicas e discussões dos resultados. Ao tempo dispendido para me ensinar e ajudar na determinação de AGP. Você é um exemplo de EDUCADORA.

Em especial, a Professora Elaine Carbonero pelo conhecimento e a ajuda para purificar a minha amostra.

Aos Professores do Departamento de Bioquímica pelos ensinamentos e ajuda neste trabalho.

À minha grande amiga e parceira Mônica Kangussu-Marcolino, ou melhor, minha “Mini-mim”, pela sua ajuda, amizade, alegria, paciência e calma que foram fundamentais para a conclusão deste trabalho. Você é uma pessoa brilhante que tive o privilégio de conhecer, trabalhar e ser amiga.

Ao Alex pela ajuda ímpar neste trabalho. Você é especial. Obrigada por existir.

Ao João, pela amizade, conversas, risadas e ao apoio nos momentos difíceis da minha vida. Sua ajuda foi única e, inquestionavelmente, fundamental para a conclusão deste trabalho.

À Luciana, Diva, pela verdadeira amizade, carinho e conselhos. Muito obrigada pela sua ajuda e dicas nos experimentos, nas colunas e espectros.

À Marina pela amizade, conversas espirituais, parceria no laboratório anexo. Foi um prazer compartilhar meus dias com você.

A Lúcia, Heide, Rogério, Marília, Nicole, Andrea Tarzia pelo companherismo, amizade e convívio no laboratório.

À Fer Simas, Ju Cassol, Ana Helena, Giovana, pelos momentos e conversas maravilhosas, além amizade que só me proporcionou grandes alegrias.

Ao Luciano pelos carinhosos abraços matinais e pela amizade.

Aos amigos do laboratório de Cultivo Celular pelo harmonioso e gostoso convívio na realização dos experimentos. Obrigada pela paciência e carinho.

Ao Professor Dr Renato Dall’Stella pela amizade, carinho, conhecimento e incentivo profissional. Sempre serei grata por sua ajuda. Você é o meu porto-seguro. Obrigada por existir.

Ao meu chefe, Dr Marcelo Malaghini, pelo apoio e incentivo para conclusão deste trabalho.

A Gisele, Junilce, Mariana, Denise e Maria Christina pelo carinho, apoio e incentivo.

À Direção do Instituto de Criminalística pelo apoio profissional.

À Coordenação do Curso de Pós-graduação em Bioquímica, Professores e amigos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pelo apoio e incentivo.

Aos funcionários do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR pelo o ótimo trabalho prestado.

Em especial, ao Sr Eveli, funcionário do IPEF, pela dedicação, ótima recepção e ajuda para coleta das folhas de copaíba.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

“Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas”

*Antoine de Saint-Exupéry*

## RESUMO

Xiloglucanas de reserva foram obtidas de cotilédones moídos e deslipidificados de *Copaifera langsdorffii* (copaíba) (XGC), *Hymeneae courbaril* (jatobá) (XGJ) e *Tamarindus indica* (tamarindo) (XGT) através de extração aquosa a 25 °C. As proporções molares de Glc: Xyl: Gal foram de 2,4: 1,5: 1,0, para XGC, 3,8: 2,6: 1,0 para XGJ e 3,6: 2,4: 1,0 para XGT. Análises por HPSEC-MALLS/RI indicaram que todas as frações apresentaram-se homogêneas com valores de  $M_w$  para XGC, XGJ e XGT de  $9,6 \times 10^5$ ,  $9,1 \times 10^5$  e  $9,1 \times 10^5$  g/mol, respectivamente. Parte das xiloglucanas de reserva obtidas foram tratadas com a enzima  $\beta$ -galactosidase para obtenção das frações desgalactosiladas, denominadas XGCd, XGJd, XGTd, as quais apresentaram redução na quantidade de unidades de galactose, de aproximadamente 70%, 76% e 60%, respectivamente. Para obtenção de xiloglucana fucosilada, folhas de *C. langsdorffii*, após a remoção de pigmentos, lipídeos e lignina, foram submetidas às extrações sequenciais, aquosa e alcalinas. A fração obtida da primeira extração alcalina com KOH 4M (FCHB4) foi a que apresentou maior proporção de Glc, Xyl, Gal e Fuc, entretanto, também foi observada a presença de unidades de manose, arabinose e ácido urônico. O perfil de eluição obtido por HPSEC-MALLS/RI indicou uma fração heterogênea. FCHB4 foi submetida à purificação por cromatografia de troca iônica (FCHB4DS) e precipitação com reativo de Fehling (PFHB4), obtendo uma fração com composição monossacarídica e espectro de  $^{13}\text{C}$  característico de xiloglucanas fucosiladas. Os efeitos das xiloglucanas nativas e modificadas foram avaliados em macrófagos peritoneais de camundongos, após a determinação da viabilidade celular, em diferentes concentrações, nos tempos de incubação de 2 e 48h. A produção de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  por macrófagos tratados com XGT, XGCd, XGJd e XGTd não foi estatisticamente significativa, entretanto, quando as células foram incubadas com os polissacarídeos na presença de PMA, reduziram significativamente a produção de  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . O aumento da capacidade fagocítica somente foi observado no tratamento com XGT. Porém, a produção de  $\text{NO}^{\bullet}$  foi estimulada em diferentes intensidades, por todos os polissacarídeos de reserva testados. Diferentes repostas quanto à produção de citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  foram observadas para as xiloglucanas nativas e modificadas. Na máxima concentração, XGC aumentou IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  em 1740 e 220% respectivamente, enquanto que XGCd não mostrou tal estímulo. XGJ estimulou a produção de todas as citocinas. Com menor intensidade, XGJd estimulou IL-1 $\beta$  e IL-6 em 104 e 40% a 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . XGTd foi a única fração que ativou intensamente a produção das três citocinas atingindo 1160, 76 e 203% para a produção de IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , respectivamente. A fração nativa estimulou significativamente a produção de IL-6 e mostrou leve estímulo para produção de IL-1 $\beta$  na máxima concentração testada. A partir dos resultados obtidos, pode-se observar que cada polissacarídeo testado apresentou características singulares na ativação de macrófagos, com intensidades e repostas distintas. Portanto, as xiloglucanas de reserva, nativas e modificadas podem ser classificadas como modificadoras da resposta biológica.

Palavras chaves: Xiloglucanas. Macrófagos. Ânion Superóxido. Óxido Nítrico. Citocinas.

## ABSTRACT

Storage xyloglucans were obtained from milled and defatted cotyledons from *Copaifera langsdorffii* (copaíba) (XGC), *Hymenaea courbaril* (jatobá) (XGJ) and *Tamarindus indica* (tamarindo) (XGT) by aqueous extraction at 25°C. The fractions contained Glc:Xyl:Gal in molar ratio of 2,4: 1,5: 1,0, for XGC, 3,8: 2,6: 1,0 for XGJ and 3,6: 2,4: 1,0 for XGT. HPSEC-MALLS/RI analyses showed that all the fractions were homogeneous and that their  $M_w$  values were  $9,6 \times 10^5$ ,  $9,1 \times 10^5$  e  $9,1 \times 10^5$  g/mol, respectively. Storage xyloglucans fractions were treated with  $\beta$ -galactosidase enzyme to obtain desgalactosilated fraction named XGCd, XGJd XGTd, which showed a reduction of galactoses units reaching 70%, 76% e 60%, respectively. To obtain fucosilated xyloglucans, *C. langsdorffii* leaves, after pigment, fat and lignin remotion, were submitted to several aqueous and alkaline extractions. The fraction obtained from first extraction with 4M KOH (FCHB4), showed the highest ratio of Glc, Xyl, Gal and Fuc, however, it was also observed the presence of mannose, arabinose and uronic acid. HPSEC-MALLS/RI analysis revealed that this fraction was heterogeneous. FCHB4 was submitted to purification procedures using ion-exchange chromatography (FCHB4DS) and precipitation by Fehling solution (PFHB4), leading to a fraction containing a characteristic monosaccharide composition and presenting a  $^{13}\text{C}$  spectrum characteristic of fucosilated xyloglucan. The effects of native and modified xyloglucans on functional properties of peritoneal cavity macrophages were evaluated after celular viability determination, in different concentration, at 2 and 48h of incubation. The effects of XGT, XGCd, XGJd and XGTd on  $\text{O}_2^{\bullet-}$  production in absence of PMA were not statistically significant, however, showed significant reduction of  $\text{O}_2^{\bullet-}$  production in the PMA presence. The enhancement of phagocytic activity was only observed by XGT. The  $\text{NO}^{\bullet}$  production was stimulated in different intensities for all tested storage polysaccharides. Different responses in IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  cytokines production were observed for native and modified xyloglucans. The maximum concentration of XGC increased IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in 1740 and 220%, respectively, while XGCd did not show this effect. XGJ promote the production of all cytokines. With less intensity, XGJd stimulated IL-1 $\beta$  and IL-6 reaching 104 and 40% at 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . XGTd had been the only fraction that intensely activated the three cytokines production, leading to 1160, 76 and 203% of increasing for the production of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF-  $\alpha$ , respectively. The native fraction significantly stimulated the production of IL-6 and showed a slight stimulus for the production of IL-1 $\beta$  in maximum concentration. From the obtained results, it was observed that each polysaccharide presents unique characteristics in the macrophages activation, with differents intesidades and response. Therefore storage xyloglucan, native and modified may be classified as biological response modifiers.

Key words: Xyloglucans. Macrophage. Superoxide Anion. Nitric Oxide. Cytokines.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE CÉLULAS VEGETAIS ILUSTRANDO A DISPOSIÇÃO DA PAREDE CELULAR .....	20
FIGURA 2 – MODELO DE PAREDE CELULAR PRIMÁRIA DO TIPO I E DO TIPO II .....	22
FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DE UM SEGMENTO DE CADEIA DE XILOGLUCANA DE PAREDE CÉLULAR DO TIPO I .....	25
FIGURA 4 – CÓDIGO DE UMA LETRA PARA AS CADEIAS LATERAIS DAS XILOGLUCANAS COM DIFERENTES SUBSTITUIÇÕES .....	25
FIGURA 5 – MECANISMO PROPOSTO PARA A ATIVAÇÃO DA NADPH OXIDASE PRESENTE EM CÉLULAS FAGOCÍTICAS .....	37
FIGURA 6 – ESQUEMA ILUSTRANDO A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO <sup>•</sup> ) .....	39
FIGURA 7 – ESQUEMA ILUSTRANDO A AÇÃO DAS CITOCINAS E AS RESPOSTAS PRODUZIDAS PELAS CÉLULAS ALVO .....	42
FIGURA 8 – RESPOSTAS DOS MACRÓFAGOS TRATADOS COM POLISSACARÍDEOS .....	48
FIGURA 9 – (A) FRUTOS E (B) SEMENTES DE <i>C. langsdorffii</i> (COPAÍBA) .....	53
FIGURA 10 – (A) FRUTOS E (B) SEMENTES DE <i>H. courbaril</i> (JATOBÁ) .....	54
FIGURA 11 – (A) FRUTOS E (B) SEMENTES DA ESPÉCIE <i>T. indica</i> (TAMARINDO) .....	55
FIGURA 12 – ESTRATÉGIA ADOTADA PARA REALIZAÇÃO DO PRESENTE TRABALHO .....	56
FIGURA 13 – FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS PROVENIENTES DAS FOLHAS DE <i>C. langsdorffii</i> (ITEM 4.5) .....	60
FIGURA 14 – ESQUEMA DOS PROCESSOS DE PURIFICAÇÃO ADOTADOS PARA OBTENÇÃO DA XILOGLUCANA ESTRUTURA DAS FOLHAS DE <i>C. langsdorffii</i> .....	62
FIGURA 13 – REAÇÃO DE DOSAGEM DE NITRITO COM O REAGENTE DE GRIESS .....	72
FIGURA 14 – PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC-MALLS/RI PARA AS XILOGLUCANAS OBTIDAS DAS SEMENTES DE (A) <i>C. langsdorffii</i> (XGC), (B) <i>H. courbaril</i> (XGJ) E (C) <i>T. indica</i> (XGT) .....	79
FIGURA 15 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DE UM OLIGOSSACARÍDEO DE XILOGLUCANA. ....	80
FIGURA 16 – ESPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup> C DAS XILOGLUCANAS OBTIDAS DE SEMENTES DE <i>C. langsdorffii</i> SOLUBILIZADAS EM D <sub>2</sub> O E ANALISADAS A 70°C (A) XILOGLUCANA NATIVA E (B) XILOGLUCANA MODIFICADA. ....	81
FIGURA 17 – ESPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup> C DAS XILOGLUCANAS OBTIDAS DE SEMENTES DE <i>H. courbaril</i> SOLUBILIZADAS EM D <sub>2</sub> O E ANALISADAS A 70°C (A) XILOGLUCANA NATIVA E (B) XILOGLUCANA MODIFICADA. ....	82
FIGURA 18 – ESPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup> C DAS XILOGLUCANAS OBTIDAS DE SEMENTES DE <i>T. indica</i> SOLUBILIZADAS EM D <sub>2</sub> O E ANALISADAS A 70°C (A) XILOGLUCANA NATIVA E (B) XILOGLUCANA MODIFICADA. ....	83
FIGURA 20 – PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC-MALLS/RI/UV DA FRAÇÃO FCHB4 OBTIDA DAS FOLHAS DE <i>C. langsdorffii</i> .....	88
FIGURA 22 – ESPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup> C DAS FRAÇÕES (A) FCHB4 E (B) FCHB4DS OBTIDAS DAS FOLHAS DE <i>C. langsdorffii</i> SOLUBILIZADAS EM D <sub>2</sub> O E ANALISADAS A 70°C .....	90

FIGURA 23 – PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC-MALLS/RI PARA AS FRAÇÕES OBTIDAS DAS FOLHAS DE <i>C. langsdorffii</i> POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA (A) FCHB4DS E (B) FCHB4NACL.....	92
FIGURA 24 – GEL DE AGAROSE COM O REAGENTE $\beta$ -GLUCOSIL YARIV PARA A DETECÇÃO DE ARABINOGALACTANA-PROTEÍNAS DA FRAÇÃO FCHB4NACL OBTIDA DAS FOLHAS DE <i>C. langsdorffii</i> .....	93
FIGURA 25– PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC MALLS/RI PARA A FRAÇÃO PFHB4, OBTIDA PELA PRECIPITAÇÃO DA FRAÇÃO FCHBH4DS2 COM REATIVO DE FELHING .....	95
FIGURA 26 – ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DAS FRAÇÕES PFHB4 OBTIDAS DAS FOLHAS DE <i>C. langsdorffii</i> SOLUBILIZADAS EM $\text{D}_2\text{O}$ E ANALIZADAS A $70^\circ\text{C}$ .....	95
FIGURA 27 – EFEITO DA XILOGLUCANA XGT PROVENIENTE DAS SEMENTES DE <i>T. indica</i> SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE MACRÓFAGOS. ....	98
FIGURA 28 – EFEITOS DAS XILOGLUCANAS DESGALACTOSILADAS XGCD, XGJD E XGTD PROVENIENTES DAS SEMENTES DE <i>C. langsdorffii</i> , <i>H. courbaril</i> E <i>T. indica</i> SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE MACRÓFAGOS NO PERÍODO DE INCUBAÇÃO DE (A) 2 H E (B) 48 H.....	99
FIGURA 29 – EFEITO DA XILOGLUCANA PFHB4 OBTIDA DAS FOLHAS DE <i>C. langsdorffii</i> SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE MACRÓFAGOS NO PERÍODO DE INCUBAÇÃO DE 48 H. .	100
FIGURA 30 – ATIVIDADE FAGOCÍTICA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS EXPOSTOS ÀS XILOGLUCANAS NATIVAS (A) E MODIFICADAS(B) OBTIDAS DAS SEMENTES DE <i>C. langsdorffii</i> , <i>H. courbaril</i> E <i>T. indica</i> . ....	102
FIGURA 31 – EFEITO DAS XILOGLUCANAS NATIVAS OBTIDAS DAS SEMENTES DE <i>T. INDICA</i> (A) E MODIFICADAS OBTIDAS DAS SEMENTES DE <i>C. langsdorffii</i> , <i>H. courbaril</i> E <i>T. indica</i> . (B) SOBRE A PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO POR MACRÓFAGOS .....	105
FIGURA 32 – EFEITO DAS XILOGLUCANAS NATIVAS OBTIDAS DAS SEMENTES DE <i>T. indica</i> (A) E MODIFICADAS OBTIDAS DAS SEMENTES DE <i>C. langsdorffii</i> , <i>H. courbaril</i> E <i>T. indica</i> . (B) NA PRESENÇA DE PMA SOBRE A PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO POR MACRÓFAGOS. ....	108
FIGURA 33 – EFEITO DAS XILOGLUCANAS NATIVAS OBTIDAS DAS SEMENTES DE <i>T. indica</i> (A) E MODIFICADAS OBTIDAS DAS SEMENTES DE <i>C. langsdorffii</i> , <i>H. courbaril</i> E <i>T. indica</i> . (B) SOBRE A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS .....	113
FIGURA 34 – EFEITO DA XILOGLUCANA ESTRUTURAL PFHB4 OBTIDA DAS FOLHAS DE <i>C. langsdorffii</i> SOBRE A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS .....	114
FIGURA 35 – EFEITO DAS XILOGLUCANAS NATIVAS (A) E MODIFICADAS OBTIDAS DAS SEMENTES DE <i>C. langsdorffii</i> , <i>H. courbaril</i> E <i>T. indica</i> . (B) SOBRE A PRODUÇÃO DE IL-1 BETA.....	117
FIGURA 36 – EFEITO DAS XILOGLUCANAS NATIVA (A) E MODIFICADAS OBTIDAS DAS SEMENTES DE <i>C. langsdorffii</i> , <i>H. courbaril</i> E <i>T. indica</i> . (B) SOBRE A PRODUÇÃO DE IL-6 POR MACRÓFAGOS. ....	119
FIGURA 37 – EFEITO DAS XILOGLUCANAS NATIVAS OBTIDA DAS SEMENTES (A) E MODIFICADAS OBTIDAS DAS SEMENTES DE <i>C. langsdorffii</i> , <i>H. courbaril</i> E <i>T. indica</i> . (B) SOBRE A PRODUÇÃO DE TNF-ALFA POR MACRÓFAGOS .....	120

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – RENDIMENTO, CONTEÚDO DE AÇÚCAR TOTAL E PROTEÍNAS E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DAS SEMENTES DE <i>H. courbaril</i> , <i>C. langsdorffii</i> E <i>T. indica</i> .....	77
TABELA 2 – ATRIBUIÇÃO DOS SINAIS DO ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C PARA AS XILOGLUCANAS DE <i>H. courbaril</i> , <i>C. langsdorffii</i> E <i>T. indica</i> . ....	80
TABELA 3 – RENDIMENTO, CONTEÚDO DE CARBOIDRATOS E PROTEÍNAS E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS XILOGLUCANAS DE <i>H. courbaril</i> , <i>C. langsdorffii</i> E <i>T. indica</i> APÓS TRATAMENTO COM β-GALACTOSIDASE.....	85
TABELA 4 – RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DAS FOLHAS DE <i>C. langsdorffii</i> .....	87
TABELA 5 – RENDIMENTO, CONTEÚDO DE CARBOIDRATOS, PROTEÍNAS E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS APÓS PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO FCHB4 OBTIDA DAS FOLHAS DE <i>C. langsdorffii</i> .....	89
TABELA 6 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) DA REGIÃO ANOMÉRICA DA XILOGLUCANA PRESENTE NA FRAÇÃO FCHB4DS E PFHB4 OBTIDAS DAS FOLHAS DE <i>C. langsdorffii</i> .....	91
TABELA 7 – COMPILAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DAS FRAÇÕES DE XILOGLUCANAS UTILIZADAS NOS TESTES DE ATIVIDADE BIOLÓGICA .....	96
TABELA 8 – RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS A PARTIR DAS XILOGLUCANAS NATIVAS E MODIFICADAS NA PRODUÇÃO DE NO*, IL-1, IL-6 E TNF-α.....	124

## LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

$\delta$	- Deslocamento químico
AU	- Ácido urônico
BRM	- Modificadores da resposta biológica
BSA	- Albumina de soro bovino
CEEA	- Comitê de Ética em Experimentação Animal
D <sub>2</sub> O	- Água deuterada
Di	- Diâmetro interno
DMSO	- Dimetilsulfóxido
$dn/dc$	- Variação do índice de refração em relação à concentração
eNOS	- Óxido nítrico sintase endotelial
EP	- Erro padrão
FCHB4	- Fração hemicelulósica B obtida das folhas de <i>C. langsdorffii</i> a partir da primeira extração com KOH 4M
FCHB4DS	- Fração obtida pela eluição da fração FCHB4 (extraída das folhas de <i>C. langsdorffii</i> ) com tampão fosfato em gel DEAE Sephacel
FCHB4NaCl	- Fração obtida pela eluição da fração FCHB4 (extraída das folhas de <i>C. langsdorffii</i> ) com NaCl 4M em gel DEAE Sephacel.
GLC	- Cromatografia líquido-gasosa
GLC-MS	- Cromatografia líquido-gasosa acoplada à espectrometria de massa
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	- Peróxido de hidrogênio
HA	- Hemicelulose A
HB	- Hemicelulose B
HBSS	- Solução salina tamponada de Hank
HEPES	- N-(2-hidroxietil) piperazina N' (ácido 2-etano sulfônico)
HG	- Homogalacturonanas
HO <sup>•</sup>	- Radical hidroxil
HPSEC	- Cromatografia de exclusão estérica de alta pressão
i.p.	- Intraperitoneal
IFN- $\gamma$	- Interferon-gama
IL	- Interleucina
iNOS	- Óxido nítrico sintase induzível

JAK	- Janus activation kinases
LPS	- Lipopolissacarídeo
MALLS	- Espalhamento de luz laser em multiângulos
MEM	- Meio essencial mínimo de Eagle
MTT	- (3-[4,5dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide); azul de tetrazólio
$M_w$	- Massa molar ponderal média
NADH	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
Nd	- Não determinado
NF- $\kappa$ B	- Fator nuclear kappa B
nNOS	- Óxido nítrico sintase neuronal
NO $\cdot$	- Óxido nítrico
NOS	- Óxido nítrico sintase
NOX	- NADPH oxidase
O $_2^{\cdot-}$	- Ânion superóxido
PBS	- Solução salina tamponada
PFHB4	- Fração obtida do precipitado da amostra FCHB4DS, oriunda das folhas de <i>C. langsdorffii</i> , tratada com reativo Felhing.
PMA	- Forbol 12-miristato, 13-acetato
ppm	- Partes por milhão
RG-I	- Ramnogalacturonanas-I
RG-II	- Ramnogalacturonanas-II
RI	- Índice de refração
RMN- $^{13}$ C	- Ressonância magnética nuclear de carbono treze
ROS	- Espécies reativas de oxigênio
SFHB4	- Fração obtida do sobrenadante da amostra FCHB4DS, oriunda das folhas de <i>C. langsdorffii</i> , tratada com reativo Felhing.
SOD	- Superóxido dismutase
STAT (1 e 3)	- Signal transducers and activators of transcription
TLR	- Receptores Toll-like
TNF ( $\alpha$ )	- Fator de necrose tumoral (alfa)
TNFR	- Receptor para TNF
TR	- Traços

- UV - Ultravioleta
- XGA - Xilogalacturonanas
- XGC - Xiloglucana da semente de *C. langsdorffii*
- XGCd - Xiloglucana desgalactosilada da semente de *C. langsdorffii*
- XGJ - Xiloglucana da semente de *H. courbaril*
- XGJd - Xiloglucana desgalactosilada da semente de *H. courbaril*
- XGT - Xiloglucana da semente de *T. indica*
- XGTd - Xiloglucana desgalactosilada da semente de *T. indica*

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
1.1	OBJETIVO GERAL	17
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>19</b>
2.1	PAREDE CELULAR	19
2.2	XILOGLUCANAS	23
2.2.1	Xiloglucana estrutural	26
2.2.2	Xiloglucana de reserva	28
2.3	MACRÓFAGOS	32
2.4	BURST RESPIRATÓRIO	35
2.5	ÓXIDO NÍTRICO	38
2.6	CITOCINAS	41
2.6.1	Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF $\alpha$ )	43
2.6.2	Interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ )	45
2.6.3	Interleucina-6 (IL-6)	46
2.7	ATIVIDADE BIOLÓGICA DE POLISSACARÍDEOS	47
2.8	ESPÉCIES VEGETAIS UTILIZADAS PARA OBTENÇÃO DE XILOGLUCANAS	52
2.8.1	<i>Copaifera langsdorffii</i>	52
2.8.2	<i>Hymenaea courbaril</i>	53
2.8.3	<i>Tamarindus indica</i>	54
<b>3</b>	<b>ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL</b>	<b>56</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>57</b>
4.1	OBTENÇÃO DAS SEMENTES DE <i>H. courbaril</i> , <i>C. langsdorffii</i> E <i>T. indica</i> , E DAS FOLHAS <i>C. langsdorffii</i>	57
4.2	ISOLAMENTO DOS COTILÉDONES DAS SEMENTES E INATIVAÇÃO ENZIMÁTICA	57
4.3	OBTENÇÃO DAS XILOGLUCANAS DE RESERVA	57
4.4	OBTENÇÃO DAS XILOGLUCANAS MODIFICADAS	58
4.5	OBTENÇÃO DA XILOGLUCANA ESTRUTURAL DAS FOLHAS DE <i>C. langsdorffii</i>	59

4.6	CROMATOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA .....	61
4.7	PRECIPITAÇÃO COM SOLUÇÃO DE FEHLING .....	61
4.8	DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ARABINOGALACTANA-PROTEÍNAS.....	63
4.9	DOSAGENS COLORIMÉTRICAS .....	63
4.10	DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA .....	64
4.10.1	Hidrólises ácidas totais.....	64
4.10.2	Redução e acetilação dos produtos resultantes do processo de hidrólise .....	65
4.11	CROMATOGRAFIA LÍQUIDO-GASOSA (GLC) E CROMATOGRAFIA LÍQUIDO-GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA (GLC-MS) .....	65
4.12	ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA DE ALTA PRESSÃO (HPSEC) ACOPLADA A DETECTORES DE ESPALHAMENTO DE LUZ LASER MULTI ÂNGULOS (MALLS), ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RI) E ULTRAVIOLETA (UV).....	66
4.13	ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).....	67
4.14	SOLUÇÕES E MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS NOS PROCEDIMENTOS UTILIZANDO MACRÓFAGOS.....	67
4.14.1	Solução das xiloglucanas estudadas .....	67
4.14.2	Solução salina tamponada (PBS).....	67
4.14.3	Solução salina balanceada de Hanks (HBSS) .....	68
4.14.4	Meio de cultura.....	68
4.15	OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS .....	69
4.16	DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR.....	70
4.17	PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO ( $O_2^{\bullet-}$ ).....	70
4.18	PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO ( $NO^{\bullet}$ ) .....	71
4.19	DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE IL-1BETA, IL-6 E TNF- ALFA .....	73
4.20	CAPACIDADE FAGOCÍTICA DE MACRÓFAGOS .....	74
4.21	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	75
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>76</b>
5.1	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS XILOGLUCANAS DE RESERVA DE SEMENTES DE <i>H. courbaril</i> , <i>C. langsdorffii</i> E <i>T. indica</i> .....	76
5.2	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS XILOGLUCANAS DESGALACTOSILADAS .....	84
5.3	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA XILOGLUCANA ESTRUTURAL DAS FOLHAS DE <i>C. langsdorffii</i> .....	86

5.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DAS XILOGLUCANAS ISOLADAS.....	96
5.4.1	Viabilidade Celular .....	97
5.4.2	Atividade fagocítica .....	101
5.4.3	Produção de $O_2^{\bullet-}$ na presença e na ausência de PMA .....	104
5.4.4	Produção de $NO^{\bullet}$ .....	111
5.4.5	Produção de citocinas .....	116
5.5	DISCUSSÃO FINAL.....	124
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>129</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>131</b>
	<b>APÊNDICE.....</b>	<b>153</b>
	<b>ANEXO .....</b>	<b>160</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, estudos com polissacarídeos de diferentes origens vegetais vêm atraindo a atenção de pesquisadores, devido à capacidade destas moléculas modificarem a resposta biológica (TZIANABOS, 2000; TAKADA *et al.*, 2003; KARDOSOVÁ; MACHOVÁ, 2006; BYEON *et al.*, 2009). Os efeitos destes compostos ocorrem em diferentes alvos celulares, em especial através da ativação de células do sistema imune, principalmente na modificação de funções de macrófagos, células que estão envolvidas nas respostas antitumoral, antiviral e antibacteriana (SCHEPETKINS; QUINN, 2006). As atividades biológicas dos polissacarídeos parecem relacionar-se com as características estruturais e físico-químicas destas moléculas, dentre estas, a composição monossacarídica, o grau de ramificação, os tipos de ligações e a solubilidade (BOHN; BeMILLER, 1995; TZIANABOS, 2000).

Polissacarídeos isolados de diferentes espécies de líquens, algas, folhas e sementes, nativos e/ou modificados quimicamente, tem sido objeto de estudo no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR. Nos trabalhos desenvolvidos neste departamento, foram relatadas diferentes respostas de macrófagos e células tumorais tratadas com polissacarídeos previamente caracterizados estruturalmente. Como exemplo, foi estudada a atividade biológica de galactomanana e  $\alpha$ -glucana isoladas do líquen *Ramalina celastri*, e dentre os efeitos observados, a ativação de macrófagos peritoneais de camundongos foi relatada para ambos os polissacarídeos (STUELP-CAMPELO *et al.*, 2002; NOLETO *et al.*, 2002). Arabinogalactanas extraídas de fontes vegetais exibiram propriedades imunomoduladoras promovendo a ativação de macrófagos além de atividade antitumoral contra células do Sarcoma 180 (CARNEIRO-LEÃO, 1997; MORETÃO; 2003; 2004; MELLINGER *et al.*, 2005; 2008). Rosário *et al.* (2008) verificaram o comportamento imunomodulador de xiloglucanas isoladas dos cotilédones de *Copaifera langsdorffii*, *Hymenaea courbaril* e *Mucuna sloanei* em macrófagos obtidos da cavidade peritoneal. Neste estudo, as xiloglucanas promoveram aumento *in vitro* na produção de óxido nítrico (NO<sup>\*</sup>) em macrófagos e *in vivo* estimularam o recrutamento destas células

para a cavidade peritoneal de camundongos após 24h de tratamento. Entretanto, foram observados diferenças de intensidade de resposta biológica para cada espécie estudada, as quais foram atribuídas às diferenças da estrutura fina dos polímeros.

Considerando os estudos prévios, os quais mostraram: os efeitos de diferentes polissacarídeos sobre diferentes vias de resposta imunomoduladoras de macrófagos; indícios de que a variação estrutural é fundamental para atividade biológica e; a expressiva ação de xiloglucanas como prováveis ativadoras das funções de macrófagos, o presente trabalho visa investigar se modificações estruturais de xiloglucanas de reserva provenientes dos cotilédones de *H. courbaril*, *C. langsdorffii* e *T. indica* interferem nas respostas biológicas anteriormente observadas para estes polímeros, bem como avaliar os efeitos de uma xiloglucana estrutural obtida das folhas de *C. langsdorffii* sobre macrófagos peritoneais.

## 1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade de xiloglucanas nativas e modificadas por desgalactosilação sobre diferentes vias de ativação de macrófagos peritoneais de camundongos, verificando suas atuações como possíveis modificadores da resposta biológica.

## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Isolar e caracterizar xiloglucanas de reserva das sementes de *Copaifera langsdorffii* (copaíba), *Hymenaea courbaril* (jatobá), *Tamarindus indica* (tamarindo);
- ✓ Modificar as xiloglucanas de reserva através de tratamento enzimático com  $\beta$ -galactosidase;
- ✓ Isolar, purificar e caracterizar xiloglucana estrutural das folhas de *C. langsdorffii*;

- ✓ Avaliar os efeitos *in vitro* das xiloglucanas nativas e modificadas sobre macrófagos peritoniais quanto à capacidade fagocítica, produção de  $O_2^{\bullet-}$ ,  $NO^{\bullet}$ , interleucina-1 $\beta$ , interleucina-6 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ );
- ✓ Verificar os efeitos *in vitro* da xiloglucana estrutural proveniente das folhas *C. langsdorffii* sobre macrófagos, quanto à viabilidade celular e a produção de  $NO^{\bullet}$ .

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 PAREDE CELULAR

A parede celular vegetal é uma estrutura complexa formada por polissacarídeos de alta massa molar, proteínas e compostos fenólicos (SOMERVILLE *et al.*, 2004). Esta estrutura está presente em todos os estágios de desenvolvimento da célula vegetal, desempenhando um papel fundamental regulando a velocidade e a direção do crescimento da célula (CARPITA; Mc CANN, 2000; O'NEILL; YORK, 2003). Várias funções da parede celular foram caracterizadas na célula vegetal, tais como: estrutural, influência na morfologia da planta, regulação da pressão osmótica celular, barreira contra patógenos, além de possuir moléculas sinalizadoras que participam da comunicação célula-célula e parede-núcleo (CARPITA; Mc CANN, 2000, SOMERVILLE *et al.*, 2004; SCHELLER; ULVSKOV, 2010).

A parede celular é uma estrutura dinâmica capaz de controlar modificações estruturais, com duas características contraditórias e aparentemente simultâneas. Primeiro, a parede deve expandir para acomodar o crescimento celular, segundo, deve manter a integridade estrutural, tanto para equilibrar a turgidez quanto para promover a rigidez da planta (SZYMANSKI; COSGROVE, 2009; ANDERSON *et al.*, 2010). A parede celular primária é uma matriz flexível que se deposita durante a divisão celular e aumenta sua área de superfície durante a expansão da célula. Após ter cessado o crescimento da célula, internamente à parede primária pode se formar a parede secundária. Frequentemente, esta estrutura é composta de camadas designadas como, S1, S2 e S3, e a diferença entre elas deve-se à distribuição dos polissacarídeos que as constituem. Entre as paredes primárias de células vizinhas encontra-se uma estrutura denominada lamela média (Figura 1) (CARPITA; Mc CANN, 2000; COSGROVE; 2005; KANEDA; RENSING; SAMUELS, 2010).

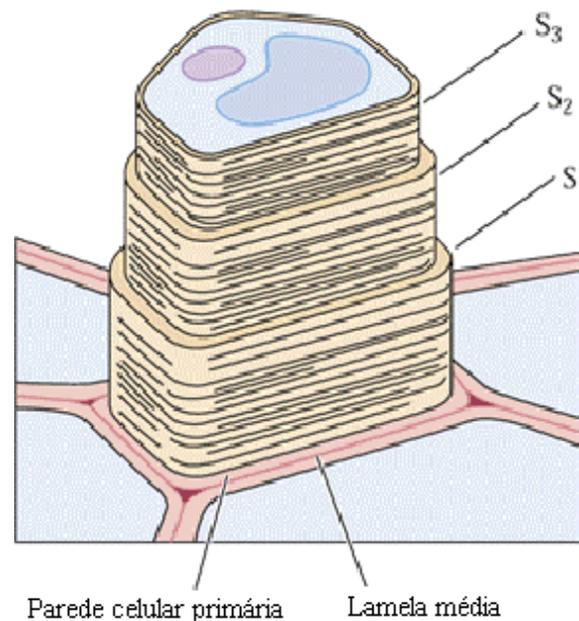


FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE CÉLULAS VEGETAIS ILUSTRANDO A DISPOSIÇÃO DA PAREDE CELULAR

FONTE: CARPITA; Mc CANN, 2000.

NOTA: Célula vegetal mostrando as diferentes camadas da parede celular secundária (S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> e S<sub>3</sub>), a parede celular primária e a lamela média entre as paredes primária de células adjacentes.

Os principais componentes da parede celular vegetal primária são carboidratos, tais como a celulose, hemiceluloses e as pectinas. A celulose é um polímero formado por uma cadeia linear constituído por unidades de glucose ligadas  $\beta$ -(1→4), compreendendo de 15 a 30% da parede celular primária. As hemiceluloses tais como: xiloglucanas, glucuronoarabinoxilanas e xilanas são heteropolissacarídeos que se encontram associados às microfibrilas de celulosas (CARPITA; McCANN, 2000). As pectinas são polissacarídeos ricos em ácido galacturônico, que incluem as homogalacturonanas (HG), ramnogalacturonanas-I (RG-I), ramnogalacturonanas-II (RG-II), xilogalacturonanas (XGA) e apiogalacturonanas (MOHNEN, 2008).

O primeiro modelo de parede celular primária foi proposto por Albersheim e sua equipe (ALBERSHEIM, 1975). Neste estudo foi demonstrada, de forma conjunta, a interação dos diferentes componentes conhecidos, como, celulose, hemiceluloses, pectinas e proteínas, estabelecendo assim um modelo básico de parede celular. Nesse modelo as xiloglucanas estariam ligadas à microfibrilas de celulose através de ligações

de hidrogênio, enquanto que ligações covalentes conectariam outros polissacarídeos como ramnogalacturonanas, arabinogalactanas e xiloglucanas, bem como, glicoproteínas (KEEGSTRA *et al.*, 1973; ALBERSHEIM, 1975). Posteriormente, Hayashi (1989) e Fry (1989) propuseram que as microfibrilas de celulose seriam interconectadas por ligações de hidrogênio ao longo das cadeias de xiloglucana. Polissacarídeos pécnicos e proteínas participariam independentemente, envolvendo o complexo celulose-xiloglucana de maneira não-covalente.

Atualmente, um dos modelos mais aceito de parede celular primária foi elaborado por Carpita e Gibeaut (1993) que propuseram dois tipos de estrutura para as angiospermas, baseado nas diferenças na quantidade de polissacarídeos pécnicos e hemicelulose principal. O primeiro modelo, chamado de parede do tipo I, inclui a parede das espécies de dicotiledôneas e algumas monocotiledôneas (não comelinóides). A parede do tipo II corresponde à parede das Poaceas e engloba a maior parte das monocotiledôneas (comelinóides).

A parede primária do tipo I é composta por uma rede de fibras de celulose entrelaçadas com xiloglucanas, formando uma rede celulose-xiloglucana, a qual compreende 50% da parede celular. As xiloglucanas ligam-se firmemente as microfibrilas de celulose e são longas o suficiente para estender-se e ligar duas microfibrilas. Esta rede de celulose-xiloglucana está embebida por uma matriz de pectina (20-35%), a qual controla entre outras propriedades fisiológicas, a porosidade. Além disso, a parede primária do tipo I contém outros polissacarídeos hemicelulósicos em menor proporção e grande quantidade de proteínas estruturais, sendo a principal a extensina, a qual pode interagir com os polissacarídeos (CARPITA; McCANN, 2000; COSGROVE, 2005; LEROUXEL *et al.*, 2006; SANDHU; RANDHAWA; DHUGGA, 2009).

Na parede primária celular do tipo II as microfibrilas de celulose estão interligadas as glucuronoarabinoxilanas, as quais constituem a hemicelulose principal. Em geral, a parede primária do tipo II possui menor proporção de pectina (10%), porém o aumento da densidade de carga é proveniente das unidades de ácido glucurônico da hemicelulose. A quantidade de proteínas estruturais é menor na parede tipo II, entretanto, estas apresentam compostos fenólicos que participam na formação de

ligações cruzadas entre os polissacarídeos (CARPITA; McCANN, 2000). Na Figura 2 esquematicamente tem-se os dois tipos de parede celular primária.

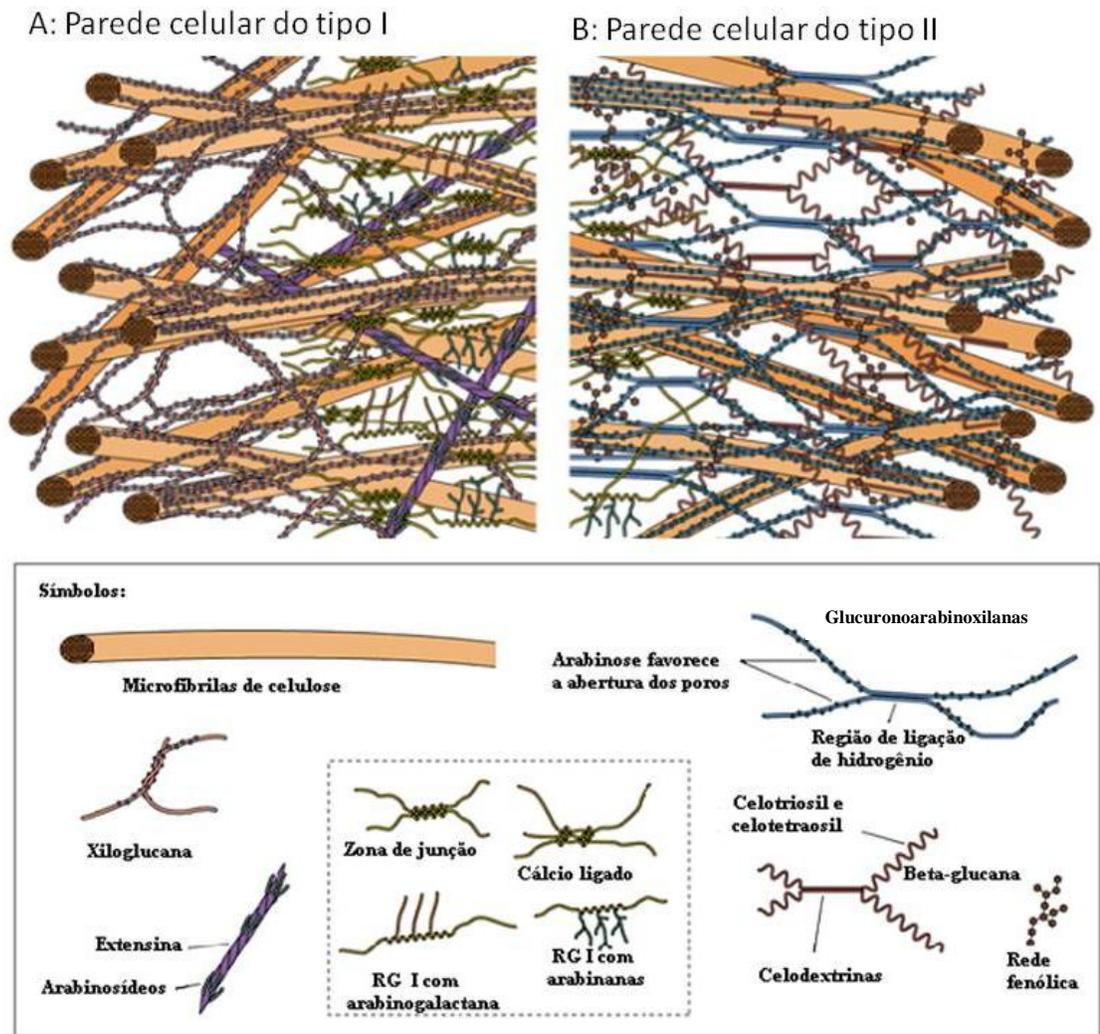


FIGURA 2 – MODELO DE PAREDE CELULAR PRIMÁRIA DO TIPO I E DO TIPO II

FONTE: Adaptado de CARPITA; Mc CANN, 2000.

NOTA: A: Modelo tridimensional de parede celular primária do tipo I mostrando as interações moleculares entre celulose, xiloglucanas e pectinas. B: Modelo tridimensional da parede celular do tipo II, mostrando a interação molecular entre celulose, glucuronoarabinoxilanas, pectinas e substâncias aromáticas.

Abreviação: RG I – ramnogalacturonanas do tipo I.

A parede celular secundária é depositada quando a célula cessa o crescimento e apresenta celulose, hemiceluloses e lignina como principais componentes. Neste tipo de parede celular, as hemiceluloses formam uma rede juntamente com a celulose e desta forma a lignina se mantém associada através de ligações cruzadas tornando esta estrutura mais rígida e hidrofóbica. As hemiceluloses presentes na parede secundária

são as xilanas e as glucomananas. Nas angiospermas há o predomínio de xilanas, enquanto as gimnospermas apresentam principalmente galactoglucomananas (ZHONG; YE, 2009).

Um tipo especializado de parede celular secundária é a encontrada nos cotilédones e endospermas de sementes. Estas paredes secundárias possuem pouca ou nenhuma celulose, enquanto a parede do tecido de reserva (endosperma, cotilédone ou perisperma) está massivamente espessa e contém depósitos de polissacarídeos que são mobilizados durante a germinação. Estes são os polissacarídeos de reserva, os quais são classificados em três grupos: mananas, que inclui as mananas puras, galactomananas e glucomananas, galactanas e xiloglucanas (REID; EDWARDS, 1995; CARPITA; McCANN, 2000).

Entre os diferentes componentes da parede celular, abordaremos as xiloglucanas, as quais constituem objeto de estudo deste trabalho.

## 2.2 XILOGLUCANAS

As xiloglucanas são polissacarídeos que apresentam funções distintas no vegetal. Possuem um importante papel estrutural por estarem presentes na parede celular primária de vegetais superiores, além de atuarem como material de reserva em sementes de certas espécies de dicotiledôneas. As xiloglucanas também podem apresentar função regulatória, pois seus oligossacarídeos, os quais são denominados oligossacarinas, regulam o crescimento celular (KOOIMAN, 1960; McNEIL; DARVILL; FRY, 1984; HAYASHI, 1989, ECKARDT, 2008).

A estrutura básica da xiloglucana de reserva e a estrutural são semelhantes, apresentando D-glucose, D-xilose e D-galactose em proporção de aproximadamente 4:3:1 (FRY, 1989; McNEIL; DARVILL; FRY, 1984; HAYASHI, 1989). As xiloglucanas apresentam uma cadeia principal constituída por unidades de D-glucopiranose unidas por ligações glicosídicas  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4). A cadeia principal pode ser substituída em O-6 por

unidades de  $\alpha$ -D-xilopiranoose, a qual também pode ser substituída em O-2 por unidades de  $\beta$ -D-galactopiranoose (FRY, 1989; HAYASHI, 1989; CARPITA; McCANN, 2000).

Entretanto, nas xiloglucanas de parede celular primária as unidades de  $\beta$ -D-galactopiranoose podem ser substituídas em O-2 por unidades de  $\alpha$ -L-fucose, sendo assim denominadas xiloglucanas fucosiladas (CARPITA; GIBEAUT, 1993). Na Figura 3 pode-se observar a representação de um segmento de uma cadeia de uma xiloglucana de parede primária. Segundo Fry (1989) as cadeias laterais possuem alguma regularidade de distribuição ao longo da cadeia celulósica.

Fry *et al.*, (1993) sugeriram uma nomenclatura para os oligossacarídeos obtidos a partir de xiloglucanas, nas quais as cadeias laterais são nomeadas através das unidades monossacarídicas que não são substituídas, da esquerda para direita. As unidades de glucose da cadeia principal, substituídas por xilose são representadas pela letra X, enquanto que unidades de glucose sem substituinte pela letra G. Já se galactose, arabinose e fucose são encontradas como unidades terminais, empregam-se as letras L, S e F, respectivamente. Quando a unidade redutora de cada oligossacarídeo está sob a forma reduzida acrescenta-se a terminação ol. Estas cadeias laterais apresentam-se comumente relatadas em xiloglucanas extraídas de vegetais superiores, entretanto foram caracterizadas outras substituições com a atribuição de letras para representá-las, conforme ilustrado na Figura 4 (SIMS *et al.*, 1996; VINCKEN *et al.*, 1996; HANTUS *et al.*, 1997; YORK *et al.*, 1996; FRY *et al.*, 1993; RAY *et al.*, 2004).



O outro grupo é encontrado nas espécies da família Solanaceae sendo definido como poli-XXGG, o qual apresenta duas unidades de glucose substituídas com unidades de xilose, alternadas a duas unidades de glucose não substituídas. Este tipo de estrutura foi observado em xiloglucana de *Lycopersicon esculentum* (tomate) (JIA *et al.*, 2003), *Nicotiana tabacum* (tabaco) (SIMS *et al.*, 1996; YORK *et al.*, 1996) e *Solanum tuberosum* (batata) (VINCKEN *et al.*, 1996).

A parede celular primária das monocotiledôneas comelinóides também apresenta xiloglucana na sua estrutura, e apesar de estar em quantidade inferior quando comparado com a parede celular das dicotiledôneas, este polissacarídeo foi caracterizado e possui predominantemente a estrutura do grupo poli-XXGG (SCHELLER; ULVSKOV, 2010).

### 2.2.1 Xiloglucana estrutural

A estrutura das xiloglucanas de parede celular primária tem sido revisada (McNEIL; DARVILL; FRY, 1984; HAYASHI, 1989; FRY, 1989) desde que este polissacarídeo foi inicialmente isolado de cultura de células em suspensão de *Acer pseudoplatanus* (BAUER *et al.*, 1973). As xiloglucanas compreendem 20-25% das paredes primárias de dicotiledôneas e 2% das monocotiledôneas (McNEIL; DARVILL; FRY, 1984; FRY, 1989; HAYASHI, 1989; VARNER; LIN, 1989; HSIEH; HARRIS, 2009; SCHELLER; ULVSKOV, 2010), sendo que foram identificadas também em gimnospermas (KAKEGAWA; EDASHIGE; ISHI, 1998; BOCHICCHIO, 2003; LORENCES, 2004).

Xiloglucanas fucosiladas têm sido isoladas da parede celular das folhas de diferentes espécies, como *Brassica oleracea* (repolho) (STEVENS; SELVENDRAN, 1984), *Gossypium* sp. (algodão), (BUCHALA *et al.*, 1993), *Arabidopsis thaliana* (arabidopsis), (ZABLACKIS *et al.*, 1995; OBEL *et al.*, 2009), *Digitalis purpurea* (dedaleira) (HENSEL; SCHMIDGALL; KREIS, 1998), *H. courbaril* (jatobá) (BUSATO; VARGAS-RECHIA; REICHER, 2001), *Cichorium intybus* (chicória) (SUN *et al.*, 2006),

*Myrothamnus flabellifolius* (arbusto da ressurreição) (MOORE *et al.*, 2006) e *T. indica* (tamarindo) (KAI, 2009).

Ao analisar a estrutura da xiloglucana presente na folha de *H. courbaril* (jatobá) Busato *et al.* (2005) observaram que além da substituição por galactose em O-2 nas unidades de xilose, esta unidade também pode estar substituída em O-4.

Um novo oligossacarídeo de xiloglucana estrutural foi isolado e caracterizado das folhas e da polpa do fruto da espécie *Argania spinosa* (argania). Nestes estudos foi obtido o XUFG, no qual a letra “U” representa a unidade de glucose da cadeia principal, substituída por unidades de xilose e esta, por sua vez, substituída por outra unidade de xilose em O-2, ao invés de unidades de galactose (RAY *et al.*, 2004; ABOUGHE-ANGONE; 2008).

Outra xiloglucana não usual foi isolada e caracterizada das flores de *Nerium indicum*. Neste estudo os autores descrevem a presença de um trissacarídeo constituído por glucose e xilose, entretanto, não foi observada a presença de unidades de galactose e fucose (DING *et al.*, 2003).

Paredes (2009) caracterizou uma xiloglucana fucosilada proveniente da raiz de *Lepidium meyenii* (maca), uma planta nativa do Peru, a qual é amplamente utilizada devido suas propriedades medicinais e alimentícias.

Recentemente, Obel *et al.* (2009) caracterizaram xiloglucanas estruturais presentes em diferentes tecidos da planta *Arabidopsis thaliana* e mostraram que, todas as partes estudadas apresentavam qualitativamente a mesma composição dos oligossacarídeos, entretanto foram observadas variações quantitativas significativas entre os oligossacarídeos dos diferentes locais.

Alguns trabalhos descrevem a ocorrência de xiloglucanas fucosiladas em frutos e a sua participação no amadurecimento. A xiloglucana obtida de parede celular dos frutos de *Diospyros kaki* L. (caqui) foi caracterizada, sendo a proporção de Glc: Xyl: Gal: Fuc de 10: 6: 3,4: 1,4 (CUTILLAS – ITURRALDE *et al.*, 1996). Uma xiloglucana estrutural da parede celular de frutos de *Actinidia deliciosa* (kiwi) foi purificada e caracterizada, apresentando uma proporção similar Glc: Xyl: Gal: Fuc de 10: 6,9: 2,1: 0,3 (REDGWELL; MELTON; BRASCH, 1988; LI; SAKURAI; NEVINS 2009). Renard *et al.* (1995) e Doco *et al.* (2003) utilizaram material despectinizado para isolar

xiloglucanas estruturais de maçã e uva. Recentemente, Arnous e Meyer (2009) avaliaram, através de hidrólises ácidas, os polissacarídeos presentes na casca de três tipos de uvas cultivadas para produção de vinho (Cabernet Sauvignon, Merlot e Shiraz) e na casca de dois tipos de maçã (Red Delicious and Golden Delicious). A partir da composição monossacarídica foi estimado como polissacarídeo majoritário presente nas paredes celulares, a homogalacturonana, enquanto que, aproximadamente 10 mol% dos polissacarídeos presentes na cascas destas frutas eram xiloglucanas.

Vierhuis *et al.* (2001) obtiveram frações hemicelulósicas ricas em xilana e xiloglucana a partir de frutos da oliveira em diferentes estágios de maturação. Os autores não observaram alterações na composição e distribuição de massa molar das frações contendo xiloglucanas. Entretanto, o processo de amadurecimento de frutos que está associado a alterações na parede celular parece envolver modificações nas xiloglucanas. Estudos utilizando frutos de *Lycopersicon esculentum* (tomate), *Cucumis melo* (melão) e *Ficus carica* (figo) têm demonstrado que as xiloglucanas sofrem degradação durante a maturação, resultando em alterações na quantidade e massa molar destes polissacarídeos (SAKURAI; NEVINS, 1993; ROSE *et al.*, 1998; OWINO *et al.*, 2004).

Hoffman *et al.* (2005) analisaram xiloglucanas da parede celular de plantas da subclasse Asteridae. Estes autores verificaram que *Ipomoea purpurea* (glória da manhã), *Ocimum basilicum* (manjeriço) e *Plantago major* (tanchagem) apresentam xiloglucanas com um padrão de substituição do tipo XXGGG, contendo cinco unidades de glucose, onde apenas as duas primeiras são substituídas por xilose.

### 2.2.2 Xiloglucana de reserva

Os polissacarídeos de reserva são compostos acumulados durante o crescimento e desenvolvimento da planta, armazenados no período de dormência e utilizados para fornecimento de monossacarídeos para um novo ciclo de crescimento. A diferença entre os polissacarídeos estruturais e de reserva é muito tênue não sendo

bem definida, isto é, muitos carboidratos presentes nas sementes possuem estrutura muito semelhante as dos encontrados na parede celular, sendo estes isolados de outros tecidos. Além do amido, há diversos tipos de polissacarídeos de reserva entre eles: mananas, galactomananas, galactoglucomananas, glucanas e xiloglucanas (AVIGAD; DEY, 1997). As xiloglucanas de reserva também são chamadas de amilóides devido a sua propriedade semelhante ao amido de apresentar coloração azul após tratamento com solução de iodo/iodeto de potássio (GAILLARD, 1961; KOOIMAN, 1961; AVIGAD; DEY, 1997).

Kooiman (1957, 1960, 1967) foi o primeiro a descrever as xiloglucanas. Nestes trabalhos, este polissacarídeo foi extraído de sementes de diferentes fontes: *T. indica* (tamarindo), *Tropaeolum majus* (capuchinha), *Cyclamen europaeum* (ciclamen), *Impatiens balsamina* (beijo de frade), *H. courbaril* (jatobá), *Schotia latifolia* (feijão de bôer) e *Annona muricata* (graviola).

Vários estudos já foram realizados com xiloglucanas de sementes de *T. indica* (tamarindo) visando sua caracterização estrutural através de oligossacarídeos obtidos quimicamente ou enzimaticamente. As propriedades reológicas do polissacarídeo nativo e modificado (sulfatados e alquilaminado) justificam o interesse por este polímero (YORK *et al.*, 1993; LANG *et al.*, 1992, SIMS *et al.*, 1998; MARRY *et al.*, 2003; FREITAS *et al.*, 2005). Kumar e Bhattacharya (2008) revisaram as propriedades das sementes de *T. indica*, como: o conteúdo de proteína, carboidratos e ácidos graxos, além do comportamento reológico da solução aquosa obtida do pó das sementes. Neste estudo os autores também apontam as aplicações da xiloglucana das sementes de *T. indica* na indústria alimentícia, a qual pode atuar como espessante, estabilizante, agente antimicrobica, inibidor da cristalização, entre outras propriedades. Recentemente, foi observado que as xiloglucanas obtidas do pó das sementes de *T. indica* submetidas à irradiação apresentaram diferenças quanto ao rendimento, massa molar, morfologia e atividade antioxidante (CHOI *et al.*, 2009).

Buckeridge e Dietrich (1990) relataram a presença de xiloglucanas nos cotilédones de *C. langsdorffii*. Em estudos posteriores foram comparados aspectos estruturais deste polissacarídeo obtido de sementes de regiões distintas (savana e floresta) com a xiloglucana do *T. indica*. Os autores constataram que a composição

monossacarídica é muito semelhante e os oligossacarídeos obtidos por digestão enzimática foram os mesmos para as amostras analisadas, porém em diferentes proporções para cada espécie e região (BUCKERIDGE *et al.*, 1992, 1997).

Estudos sobre as estruturas finas de xiloglucanas das espécies *T. indica* e *C. langsdorffii*, mostraram que estas apresentam um padrão estrutural semelhante formada pelas XXXG, XLXG, XXLG e XLLG em diferentes proporções (BUCKERIDGE *et al.*, 1992; MARRY *et al.*, 2003; REN *et al.*, 2005; OLIVEIRA JUNIOR *et al.*, 2006). Já, as xiloglucanas presentes nas sementes de *H. courbaril* apresentam cerca de 50% da sua estrutura composta por XXXXG e também foi caracterizado na sua estrutura o oligossacarídeo pertencente à série XXXXXG (BUCKERIDGE *et al.*, 1997; TINÉ; LIMA; BUCKERIDGE, 2003; FREITAS *et al.*, 2005; TINÉ *et al.*, 2006).

Teixeira (2005) isolou e caracterizou por metilação e espectroscopia de ressonância magnética nuclear, uma xiloglucana das sementes de *Mucuna sloanei* (mucuna). Outra espécie de *Mucuna*, *Mucuna flagellipes*, foi utilizada por Onweluzo, Ramesh e Tharanathan (2002) para obtenção de xiloglucanas. A farinha das sementes de *Mucuna sloanei*, *Mucuna flagellipes* e *Detarium senegalense* é utilizada na Nigéria e certos países da África como espessante em alimentos (AJIWE *et al.*, 1997; WANG *et al.*, 1996; ONWELUZO; RAMESH; THARANATHAN, 2002).

Ren *et al.* (2005) isolaram uma xiloglucana das sementes de *Azelia africana*, a qual apresentou a mesma composição dos oligossacarídeos de *T. indica*, porém em diferentes proporções. Neste estudo também foi determinada a viscosidade intrínseca do polímero, a qual se apresentou inferior ao valor determinado para a xiloglucana proveniente de *Detarium senegalense*.

Recentemente foi mostrado o efeito do tempo de extração nas propriedades das frações de xiloglucanas obtidas das sementes de *H. courbaril*. Neste estudo foi relatado que, quanto maior o tempo de extração utilizado, maior a contaminação por unidades de arabinose e por proteína. Com a utilização da técnica de espalhamento de luz dinâmico foi possível sugerir que o aumento do tempo de extração pode aumentar a agregação das xiloglucanas (KAI; PETKOWICZ, 2010).

Diferentes propriedades exibidas pelas xiloglucanas atraem estas moléculas para ambos os aspectos, reológicos e biológicos.

Sob condições específicas, as xiloglucanas podem formar soluções viscosas que encontram aplicação na indústria farmacêutica e alimentícia (SIMI; ABRAHAM, 2010). Já foi demonstrado que as xiloglucanas podem interagir com diversos compostos, como: tetraborato, álcool, quitosana, entre outros, resultando em formação de gel ou aumento da viscosidade da solução (MARTINS *et al.*, 2003; YUGUCHI *et al.*, 2004; SIMI; ABRAHAM, 2010).

Os aspectos reológicos da xiloglucana desgalactosilada extraídas das sementes de *H. courbaril* foram muito bem relatados por Busato *et al.* (2009). Quando submetidos à modificação por  $\beta$ -galactosidase, as xiloglucanas exibiram propriedades geleificantes e a temperatura transição de sol-gel varia de acordo com o grau de eliminação de galactose. Vários estudos têm mostrado que o gel obtido de xiloglucana desgalactosilada pode ser utilizado para a liberação controlada de fármacos, podendo ser administrado por via retal (MIYAZAKI *et al.*, 1998), intraperitoneal (SUISSA *et al.*, 1998), oral (KAWASAKI *et al.*, 1999), ocular (MIYAZAKI *et al.*, 2001) e pericutânea (TAKAHASHI *et al.*, 2002).

Na indústria farmacêutica, além das propriedades reológicas as xiloglucanas apresentam características mucoadesivas, biocompatibilidade, capacidade de aderir fármacos e alta estabilidade térmica (SUMATHI; RAY, 2002). Foi testado o comportamento de liberação de diversos fármacos associados à xiloglucanas, nestes estudos o polissacarídeo foi capaz de prolongar a ação e evitar a degradação do fármaco (SUMATHI; RAY, 2002; GHELARDI *et al.*, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2009; HIRUN; TANTISHAIYAKUL; PICHAYAKORN, 2010)

Oligossacarídeos de *T. indica* obtidos por digestão com celulase e administrados em ratos durante 35 dias mostraram efeitos no metabolismo de lipídios, diminuindo o nível sanguíneo de colesterol e triglicerídeos (YAMATOYA *et al.*, 1996), além de inibir a absorção de D-glucose (SONE; MAKINO; MISAKI, 1992).

Estudos realizados por Hensel e Meier (1999) sugerem que as xiloglucanas podem ser adicionadas em alimentos com a função de agentes antimutagênicos. A xiloglucana das sementes de *Tropaeolum majus* apresentou atividade antimutagênica, com inibição dose-dependente variando de 20-50% contra o agente mutagênico 1-nitropireno. Xiloglucanas de reserva mostraram ser eficientes na ativação de células do

sistema imune, efeito evidenciado pelo aumento na capacidade fagocítica em monócitos, neutrófilos, bem como em macrófagos da linhagem RAW 264.7 (SREELEKHA *et al.* 1993; PAULY; FREIS; PAULY, 1999; SILVEIRA, 2010). Além desta via de ativação, também foi verificada interferência na produção de NO\* em macrófagos oriundos da cavidade peritoneal e recrutamento de células para cavidade peritoneal de camundongos (ROSÁRIO *et al.*, 2008).

### 2.3 MACRÓFAGOS

Macrófagos são células que participam ativamente da resposta imunológica. Estas células pertencem ao sistema mononuclear fagocítico e representam a primeira linha de defesa do organismo, pois são as primeiras células a entrarem em contato com microorganismos ou toda e qualquer partícula invasora. Os macrófagos são originados a partir de monócitos circulantes presentes no sangue, os quais por sua vez são originados a partir de precursores na medula óssea. Quando os monócitos presentes na corrente sanguínea migram para os tecidos eles diferenciam-se em macrófagos. O monócito no sangue periférico é considerado uma célula intermediária que adquire sua maturidade funcional nos tecidos como macrófago (ADAMS, 1979; ABBAS; LICHTMAN, 2005; SILVA; HASHIMOTO; ALVES, 2009; GEISSMANN *et al.*, 2010).

Os macrófagos são amplamente distribuídos nos mais variados tecidos presentes em diferentes órgãos recebendo nomenclatura distinta dependendo da sua localização, como por exemplo, no fígado (células de Kupffer), pulmão (macrófagos alveolares), sistema nervoso central (microglias), ossos (osteoclastos) e na pele (células de Langerhans), sendo que macrófagos residentes apresentam funções e características específicas de acordo com o local em que se encontram (ABBAS; LICHTMAN, 2005; TAYLOR *et al.*, 2005; SILVA; HASHIMOTO; ALVES, 2009).

Estas células fagocitárias apresentam função crucial na imunidade inata, bem como na resposta imune adaptativa. Os macrófagos fagocitam e destroem agentes patológicos como: bactéria, vírus, fungos, protozoários e helmintos (HACKETT; 2003; ABBAS; LICHTMAN, 2005; FAIRWEATHER; CIHAKOVA, 2009). Além dos patógenos,

estas células reconhecem e fagocitam células mortas ou restos celulares de células em processo de apoptose, além de células neoplásicas (KLIMP *et al.*; 2002; FAIRWEATHER; CIHAKOVA, 2009). Um importante papel do macrófago durante a resposta imune inata é produzir citocinas, as quais promovem o recrutamento e ativação de mais macrófagos e outras células inflamatórias (BEUTLER, 2004; COMMINS; BORISH; STEINKE, 2010). Na resposta imune adaptativa os macrófagos processam e apresentam os antígenos para os linfócitos, os quais por sua vez, tornam-se capazes de produzir anticorpos (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Os receptores presentes na superfície de sua membrana plasmática estão diretamente relacionados com as funções dos macrófagos, como diferenciação, adesão, fagocitose, ativação e citotoxicidade. A habilidade destas células fagocíticas em reconhecer ligantes endógenos e exógenos e responderem apropriadamente é a função central dos macrófagos, seja na homeostase, ou na imunidade inata, imunidade adquirida, auto-imunidade, inflamação e imunopatologia (TAYLOR *et al.*, 2005).

No processo de fagocitose, os macrófagos reconhecem os agentes patológicos através dos receptores específicos presentes na superfície celular. Um dos receptores relacionados à fagocitose é o receptor para D-manose, o qual apresenta na sua estrutura domínios de lectina que reconhece especificamente unidades de carboidratos, às quais se ligam, permitindo assim, a internalização de polímeros constituídos por manose, L-fucose e N-acetilglucosamina (STAHL; SCHLESINGER, 1980; SHEPHERD *et al.*, 1981; TAYLOR *et al.*, 2005). Estes monômeros são encontrados na parede celular microbiana, o que permite os macrófagos reconhecerem diferentes microorganismos patogênicos (ABBAS; LICHTMAN, 2005). Além do receptor de D-manose, já foram descritos diversas classes de receptores presentes na membrana celular dos macrófagos, os quais apresentam funções distintas gerando diferentes respostas. Destacam-se: receptores “Toll like”, receptores “scavenger”, receptores com um único ou com múltiplos domínios lectinas e integrinas, neste último grupo destacam-se o CR3 (receptor para complemento), a superfamília Ig (imunoglobulina), dectina-1, entre outros (JOHNSON *et al.*, 2003; TAYLOR *et al.*, 2005; SCHEPETKINS; QUINN, 2006; AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006; VARIN; GORDON, 2009).

A interação de ligantes com receptores específicos permite que os macrófagos englobem grandes partículas como bactérias, leveduras e células mortas, formando uma vesícula chamada endossomo. A partir da endocitose, ocorre a formação inicial de um endossomo primário (early), o qual, posteriormente, se funde aos lisossomos, organelas envoltas por membrana celular ricas em enzimas hidrolíticas; nesta etapa, depois de fusionados aos lisossomos, os endossomos passam a ser chamados de endossomos secundários (late). Nesta etapa, a partícula ou microorganismo endocitado sofre ação das enzimas lisossomais, produzindo espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Em resposta a ligantes específicos os macrófagos também podem realizar outras funções efetoras, como a produção de citocinas, de fatores de crescimento, fatores angiogênicos e metaloproteinases. Além disso, fazem a degradação de proteínas e processamento de antígenos os quais são apresentados às moléculas do complexo principal de histocompatibilidade, para que as células T possam reconhecer as substâncias estranhas ao organismo (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Polissacarídeos variados podem ser ligantes efetivos em diferentes receptores de macrófagos podendo gerar respostas celulares envolvendo a modulação do sistema imune. Por este motivo, estas moléculas vêm sendo objeto de estudos nos diferentes processos de ativação dos macrófagos (JOHNSON *et al.*, 2003; TAYLOR *et al.*, 2005; SCHEPETKINS; QUINN, 2006; AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006; VARIN; GORDON, 2009).

Como modelo de estudo os macrófagos podem ser divididos em três grupos funcionais: 1) macrófagos residentes, que são derivados da cavidade peritoneal ou outro local sem estímulo prévio; 2) macrófagos elicitados, que são recrutados para a cavidade peritoneal por um agente inflamatório não-específico, como o tioglicolato de sódio; 3) macrófagos ativados, recrutados para a cavidade por uma infecção, como por exemplo, pelo *Bacillus Calmette Guerin* (BCG), o qual produz um exsudato rico em citocinas. Em cada um destes estágios ocorre a expressão de proteínas específicas de membrana e de produtos de secreção (COHN, 1978; MACKAY; RUSSELL, 1986; CRAWFORD *et al.*, 1987).

Os macrófagos ativados podem desencadear o *burst* respiratório e a produção de óxido nítrico ( $\text{NO}^*$ ), que são respostas bioquímicas de duas vias oxidativas diferentes (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999), as quais serão abordadas, a seguir.

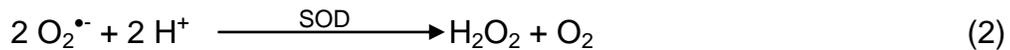
## 2.4 BURST RESPIRATÓRIO

Um dos mecanismos utilizados por células fagocíticas, como neutrófilos e macrófagos, para eliminar microorganismos invasores é o processo conhecido como *burst* respiratório (SEGAL, 2005; HALLIWELL, 2006; USHIO-FUKAI, 2009). O *burst* respiratório é caracterizado pelo acentuado aumento no consumo de oxigênio e liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Estes compostos podem ser divididos em dois grupos: os que apresentam elétrons desemparelhados (radical) como o ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) e o radical hidroxil ( $\text{HO}^*$ ); e o grupo que não apresenta elétrons desemparelhados, porém são agentes oxidantes e/ou facilmente convertido em radicais, tais como, peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), oxigênio molecular singlete ( $^1\text{O}_2$ ), peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), ozônio ( $\text{O}_3$ ), entre outros (HALLIWELL, 2006; WANG, 2009).

O *burst* respiratório pode ser estimulado no processo de fagocitose, devido à opsonização de microorganismos e peptídeos que mimetizam parte de alguma proteína bacteriana, como por exemplo, o *N*-formilmetionilleucilfenilalanina, bem como o lipopolissacarídeo (LPS). Esta via pode ainda ser estimulada pelo éster de forbol, acetato de forbol meristato (PMA), molécula amplamente utilizada como controle positivo nos experimentos que visam mensurar a produção de ROS (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006; HALLIWELL, 2006; WANG, 2009). O PMA, *in vitro*, aloja-se na membrana dos macrófagos e ativam a proteína quinase C, a qual pode ativar a NADPH oxidase através de uma cascata de fosforilação e desfosforilação (RYVES *et al.*, 1991). As ROS também são produzidas em resposta a fatores de crescimento, citocinas, interferon gama ( $\text{IFN-}\gamma$ ), agonistas dos receptores acoplados a proteína G ou estresse celular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006; USHIO-FUKAI, 2009; WANG, 2009).

A intensidade do *burst* respiratório em macrófagos depende de onde e como eles são obtidos: 1) macrófagos residentes ou 2) Macrófagos elicitados (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006). Os macrófagos obtidos de animais tratados com o tioglicolato ou PMA, como estímulo não-particulado, consomem três vezes mais oxigênio durante o processo de fagocitose, quando comparados a células obtidas de animais não tratados (COHEN *et al.*, 1981; JUN; MET; YUAN, 1993).

O mecanismo molecular do *burst* respiratório envolve a ativação do complexo enzimático NADPH oxidase que catalisa redução do oxigênio a ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) tendo como doador de elétrons o NADPH (reação 1). Em seguida o  $O_2^{\bullet-}$  é convertido a peróxido de hidrogênio pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD) (reação 2) (BABIOR, 1992; KLEBANOFF, 1992; ROTROSEN, 1992).



NADPH-oxidase é um complexo multicompetente, presente nas células fagocíticas, constituído por subunidades proteicas, as quais podem ser encontradas tanto no citosol como na membrana plasmática (Figura 5). Em macrófagos não ativados, a NADPH-oxidase está inativa, sendo rapidamente ativada quando estas células são estimuladas por agentes apropriados. A ativação da célula fagocítica gera uma mudança conformacional na flavocitocromo  $b_{558}$ , um heterodímero de membrana, que corresponde ao sítio ativo da enzima. Esta porção é composta por uma subunidade catalítica, denominada  $gp91^{\text{phox}}$  e por uma subunidade menor, com função regulatória, denominada  $p22^{\text{phox}}$  (Figura 5) (SEGAL; ABO, 1993; BABIOR, 1992; CROSS; SEGAL, 2004; WANG, 2009). Esta mudança conformacional parece ser dependente do contato entre a flavoproteína  $b_{558}$  e as subunidades citosólicas, denominadas  $p47^{\text{phox}}$ ,  $p67^{\text{phox}}$ ,  $p40^{\text{phox}}$  e GTPaseRac1 (VIGNAIS, 2002; CROSS; SEGAL, 2004; WANG; 2009). A flavoproteína  $b_{558}$  foi recentemente localizada tanto na membrana quanto no citoplasma dos macrófagos (CASBON *et al.*, 2009).



## 2.5 ÓXIDO NÍTRICO

O óxido nítrico ( $\text{NO}^\bullet$ ) é um radical livre permeável às membranas que pode ser produzido por diferentes tipos de células como: macrófagos, plaquetas, neutrófilos, células endoteliais, neurônios, células do trato respiratório, fibroblastos e hepatócitos (STUEHR; MARLETA, 1987; BILLIAR *et al.*, 1992; NUSSLER; BILLIAR, 1993; MAYER; HEMMENS, 1997). Como um radical livre, este gás é capaz de reagir rapidamente com vários compostos, principalmente espécies contendo elétrons desemparelhados, como o oxigênio e intermediários reativos. Esta reação pode formar outros radicais: ( $\text{NO}_2$ ), ânions moderadamente estáveis ( $\text{NO}^{-2}$ ), ânions muito estáveis ( $\text{NO}^{-3}$ ), óxidos altamente instáveis ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ) e peróxidos instáveis ( $\text{ONOO}^-$ ). Esta molécula também pode reagir com radical tiol produzindo compostos nitrosotióis ( $\text{RSNO}$ ). No meio biológico, a maioria destes subprodutos pode surgir em poucos segundos após a enzima óxido nítrico sintase tornar-se cataliticamente ativa (MACMICKING; XIE; NATHAN, 1997; BOGDAN, 2001; HALL; GARTHWAITE, 2009).

O  $\text{NO}^\bullet$  é uma molécula sinalizadora relatada como um mensageiro autócrino ou parácrino, geralmente regulando processos intracelulares ou atuando em células próximas do seu local de síntese e liberação (LUNDBERG; WEITZBERG, 2009). Foram descritos diversos efeitos do  $\text{NO}^\bullet$  e dos seus intermediários reativos na regulação de várias respostas fisiológicas e patofisiológicas no corpo humano (KORHONEN, 2005). O  $\text{NO}^\bullet$  atua no sistema imune como uma molécula efetora citostática e citotóxica, a qual inibe o crescimento de diversos agentes de doenças infecciosas como vírus, bactérias, protozoários, fungos e helmintos. Além disso, apresenta atividade antitumoral (através da morte e/ou inibição do crescimento da célula tumoral), reparo de dano tecidual (necrose e fibrose), possui ação antiinflamatória, efeito imunossupressor, modula a produção e função de citocinas e fatores de crescimento (MACMICKING; XIE; NATHAN, 1997; BOGDAN, 2001; KORHONEN, 2005; ORTEGA *et al.*, 2008; COULTER *et al.*, 2008; LUNDBERG; WEITZBERG, 2009).

Outros efeitos atribuídos ao radical óxido nítrico são as atividades antitrombótica e antiaterosclerótica, pois relaxa a musculatura lisa vascular, apresenta

efeito vaso protetor, modula a proliferação de células musculares lisas, inibe a adesão e migração de leucócitos através do endotélio vascular e é mediador na angiogênese (NASEEM, 2005). Entretanto, uma produção descontrolada de  $\text{NO}^\bullet$  pode levar a uma resposta tóxica, a qual pode resultar em uma série de doenças inflamatórias, bem como no desenvolvimento tumoral (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 1994; SCHMIDT; WALTER, 1994; ZHUANG; WOGAN, 1997; COULTER *et al.*, 2008; WEIGERT; BRUNE, 2008).

A síntese de  $\text{NO}^\bullet$  ocorre a partir do átomo de nitrogênio do grupo guanidino do aminoácido L-arginina, em uma reação catalisada por uma enzima, conhecida como óxido nítrico sintase (NOS) dependente de oxigênio molecular, como ilustrado na Figura 6 (MAYER; HEMMENS, 1997; STUEHR *et al.*, 2004). A NOS é uma enzima dimérica, formada por dois monômeros idênticos, os quais apresentam dois domínios catalíticos. O domínio N-terminal oxidase apresenta grupo heme ligado e um sítio para o cofator tetrahydrobiopterina. Esta região é responsável pela oxidação da L-arginina em L-citrulina na presença de oxigênio molecular (STUEHR *et al.*, 2004). O domínio C-terminal redutase contém distintos sítios de ligação para FAD, FMN e NADPH, e por apresentar homologia com citocromo P450 redutase, vem sendo estudada como alvo na terapia antitumoral (FITZPATRICK *et al.*, 2008).

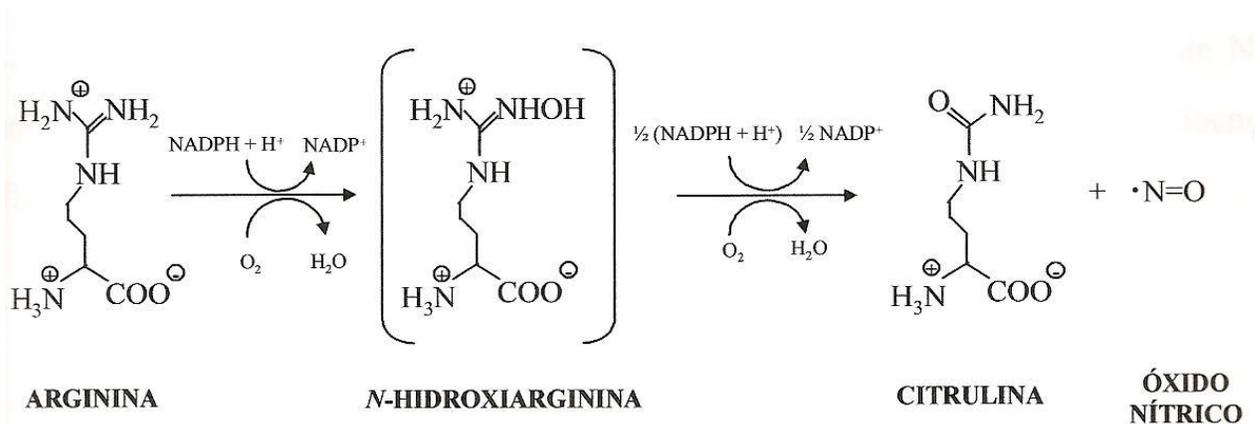


FIGURA 6 – ESQUEMA ILUSTRANDO A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO ( $\text{NO}^\bullet$ )  
 FONTE: MAYER; HEMMENS, 1997

A enzima NOS constitui uma família com três isoenzimas codificadas por genes distintos e denominadas como: endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e induzível (iNOS),

sendo a última, a forma presente em macrófagos (XIE *et al.*, 1992; NATHAN; XIE, 1994; MACKMICKING; XIE; NATHAN, 1997). Embora estas três isoformas catalisem a mesma reação, elas diferem na regulação, amplitude e duração da produção de NO<sup>•</sup>. As isoformas nNOS e eNOS são conhecidas como constitutivas, porque, diferentemente da iNOS, estas proteínas são expressas constitutivamente nas células. São reguladas primeiramente por elevada concentração de cálcio, que ativa a enzima a produzir NO<sup>•</sup> em pequena quantidade e por curto período de tempo (BOGDAN, 2001).

A iNOS possui uma molécula de calmodulina fortemente ligada, mantendo-a numa conformação ativa, mesmo em baixos níveis de cálcio, podendo ser denominada NOS - cálcio independente. Esta enzima pode produzir, constantemente, alta concentração de NO<sup>•</sup> por períodos prolongados (BREDET; SNYDER, 1990; MARLETTA, 1994; MAYER; HEMMENS, 1997).

A enzima iNOS é regulada positivamente ou negativamente pelo contato célula-célula (adesão ou moléculas co-estimulatórias), citocinas, complexos imunes, produtos microbianos e virais (proteínas, lipídeos e polissacarídeos), poliaminas, quantidade de oxigênio, pH do meio e diversos antibióticos (BOGDAN, 2001). Todas as formas de NOS podem ser inibidas por análogos de arginina N-substituídos, como a N<sup>G</sup>-monometil-L-arginina, a aminoguanidina ou a N-nitroarginina metil éster (JAMES, 1995).

O aumento da expressão do gene para a enzima iNOS se faz em resposta a diferentes estímulos, como as interleucinas IL-1, IL-2, IL-6, IL-10, interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), bactérias (por exemplo, BCG) ou produtos bacterianos (por exemplo, LPS), entre outros. Já, a inibição transcricional desta enzima pode ocorrer na presença de interleucinas IL-4, IL-8 e IL-10, fator de necrose tumoral  $\beta$  (TNF- $\beta$ ), entre outros (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1994; JAMES, 1995; MAYER; HEMMENS, 1997, KLEINERT 2004, KORHONEN, 2005).

Diversos polissacarídeos foram descritos como modificadores da resposta biológica devido à capacidade de induzir ou reprimir a produção de NO<sup>•</sup> em células do sistema imune (NOLETO *et al.*, 2002; 2004; KIM *et al.* 2004; YANG *et al.* 2007; 2008; ROSÁRIO *et al.*, 2008). Este efeito muitas vezes é acompanhado pelo aumento da produção de citocinas (MORETÃO *et al.*, 2003; SCHEPETKINS *et al.*, 2008; YANG *et al.* 2008; XIE *et al.* 2008; WANG *et al.* 2010)

## 2.6 CITOCINAS

As citocinas são proteínas sintetizadas e liberadas por células que participam da resposta imune inata e adaptativa, como fagócitos mononucleares e linfócitos. Estas moléculas estão envolvidas na primeira comunicação entre a resposta imune inata e a adaptativa, podendo agir no crescimento, diferenciação, ativação celular, atividade citolítica, apoptose, quimiotaxia na célula alvo, além de serem capazes de regular e determinar a natureza da resposta imune. A Figura 7 ilustra as diferentes vias de atividade, produção e liberação de diferentes citocinas, assim como, as células com potencial para exercer tais atividades e algumas das possíveis interrelações que ocorrem entre as células produtoras de citocinas. As citocinas podem ser produzidas por diferentes tipos celulares em resposta ao contato com microorganismos, antígenos, bem como, pela presença e reconhecimento de outras citocinas (BERCZI; SZENTIVANYI, 2003; KAISER *et al.*, 2004; ABBAS; LICHTMAN, 2005; COMMINS; BORISH; STEINKE, 2010).

Apesar de diversas citocinas terem sido caracterizadas por apresentarem características estruturais e funcionais diferentes, essas moléculas apresentam algumas características comuns. As citocinas transportam informações inter e intracelularmente, através de receptores específicos (MINTER; WESSELS; MOLDAWER, 2001). A ação destas moléculas geralmente é pleitrópica, ou seja, agem em diferentes tipos celulares, e podem influenciar na síntese e ação de outras citocinas (MINTER; WESSELS; MOLDAWER, 2001; ABBAS; LICHTMAN, 2005). As sinalizações das citocinas podem ocorrer de modo autócrino, justácrino, parácrino e endócrino (MINTER; WESSELS; MOLDAWER, 2001; BERCZI; SZENTIVANYI, 2003). A presença de citocinas e seu reconhecimento por células alvo podem levar a uma alteração da expressão gênica destas, levando-as a desenvolverem a capacidade de exercer novas funções, além de poderem induzir a proliferação descontrolada destas células (ABBAS; LICHTMAN, 2005).



citocina tipo I; receptores de citocina tipo II; receptores com domínio de imunoglobulina; receptores do TNF e receptores transmembrânicos de sete  $\alpha$ -hélices (BERCZI; SZENTIVANYI, 2003; ABBAS; LICHTMAN, 2005).

As citocinas  $TNF\alpha$ ,  $IL-1\beta$  e  $IL-6$ , denominadas citocinas pró-inflamatórias são proteínas que apresentam um importante papel iniciando e regulando a resposta imune inata e, posteriormente, regulam a resposta inflamatória, propagando a resposta imune adaptativa (MINTER; WESSELS; MOLDAWER, 2001; BERCZI; SZENTIVANYI, 2003). Por terem sido avaliadas neste estudo, a seguir será apresentada uma revisão sobre estas moléculas.

#### 2.6.1 Fator de Necrose Tumoral Alfa ( $TNF\alpha$ )

O fator de necrose tumoral (TNF) foi primeiramente identificado como uma substância presente no soro de animais estimulados por LPS capaz de causar a lise de células tumorais (ABBAS; LICHTMAN, 2005). O  $TNF\alpha$  pertence à superfamília TNF, a qual apresenta 19 membros e suas respostas são mediadas por 29 receptores diferentes. Estes ligantes regulam funções do sistema imune, hematopoiético e na morfogênese, induzem a proliferação, diferenciação e apoptose celular. Entretanto, também estão relacionados com tumorigêneses, rejeição de transplantes, choque séptico, replicação viral e doenças auto-imunes (AGGARWAL, 2003; VINAY; KWON, 2009).

O  $TNF\alpha$  é sintetizado por fagócitos mononucleares, neutrófilos, linfócitos, células NK, células endoteliais, mastócitos, entre outras (BERCZI; SZENTIVANYI, 2003; COMMINS; BORISH; STEINKE, 2010). Ele é processado como uma proteína de membrana (26 kDa), não glicosilada, homodímera, a qual é clivada na região C-terminal por uma metaloproteína associada à membrana, liberando um polipeptídeo solúvel de 17 kDa. A união de três cadeias de polipeptídeos forma uma proteína homotrímera (51 kDa) de formato piramidal. Ambas as proteínas, de membrana e solúvel, são efetivas para destruir a célula alvo (KLIMP, 2002; ABBAS; LICHTMAN, 2005; COMMINS;

BORISH; STEINKE, 2010). O mecanismo de ação destas proteínas envolve a ligação a dois receptores para  $TNF\alpha$  distintos, o receptor do tipo 1 (TNF-RI ou p75) e o do tipo 2 (TNF-RII ou p55). Ambos receptores estão presentes na maioria das células e tecidos e promovem a ativação de duas vias distintas de sinalização intracelular para transcrição gênica (ABBAS; LICHTMAN, 2005; BRANSCHA; BOSCHERT; KRIPPNER-HEIDENREICH, 2007; COMMINS; BORISH; STEINKE, 2010). Tartaglia *et al.* (1992 e 1993) relataram que a ligação de  $TNF\alpha$  ao receptor TNF-RI pode induzir a citotoxicidade, atividade antiviral, proliferação de fibroblastos e indução da NF- $\kappa$ B, e que a ligação ao receptor TNF-RII pode induzir timócitos e a proliferação de linfócitos T citotóxicos. Porém, estas funções não estão completamente esclarecidas (AGGARWAL, 2003)

Genericamente, TNF pode ser entendido como uma molécula pró-inflamatória com atividade estimulatória na maioria das células e tecidos. Já foram relatados diversos efeitos do  $TNF\alpha$ , incluindo, liberação de mediadores, indução da expressão gênica, inibição de crescimento e aumento na proliferação celular. Este polipeptídeo atua como co-estimulador em células natural killer, ativa linfócitos T e B e mostrou-se capaz de estimular o recrutamento de neutrófilos e monócitos para as regiões inflamatórias, além de ativá-los para erradicar os microorganismos infectantes (ABBAS; LICHTMAN, 2005; COMMINS; BORISH; STEINKE, 2010).

O  $TNF\alpha$  apresenta efeito estimulatório em células endoteliais, e induzindo a expressão de moléculas de adesão intracelular, moléculas de adesão vascular e selectina, que permitem o recrutamento de granulócitos ao local inflamatório, produzindo uma atividade pró-coagulante. Esta proteína também induz a liberação de quimiocinas em células endoteliais e macrófagos, o que permite o aumento da aderência, quimiotaxia e o recrutamento de leucócitos. Em várias células,  $TNF\alpha$  aumenta a expressão do complexo de histocompatibilidade, induz a expressão de uma série de genes que codificam citocinas e aumenta a síntese de colágeno, aspectos importantes no remodelamento tecidual. O  $TNF\alpha$  induz a imunidade antitumoral através de efeitos citotóxicos em células cancerosas, desencadear respostas imunes antitumorais, podendo ativar a apoptose em alguns tipos celulares (ABBAS;

LICHTMAN, 2005; BRANSCHA; BOSCHERT; KRIPPNER-HEIDENREICH, 2007; COMMINS; BORISH; STEINKE, 2010).

Por outro lado, a alta produção de  $TNF\alpha$  pode levar a efeitos sistêmicos, como, indução da proteólise em músculos e sua conseqüente perda de tônus, lipólise em adipócitos, distúrbios metabólicos, ação no hipotálamo, induzindo a febre devido ao aumento da síntese de prostaglandinas. Portanto, altos níveis de TNF podem levar à progressão para caquexia, injúria tecidual, choque irreversível e morte (MINTER; WESSELS; MOLDAWER, 2001; ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Muitas atividades do  $TNF\alpha$  são compartilhadas pela IL-1, outra importante citocina pró-inflamatória.

### 2.6.2 Interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ )

A IL-1, como o nome sugere, foi à primeira citocina descrita que apresenta diversas atividades biológicas. A família IL-1 é composta por 11 membros (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , receptor antagonista IL-1 (IL-1Ra), IL-18, IL-33 e IL-1F5 – IL-1F10) (SIMS; SIMTH; 2010; COMMINS; BORISH; STEINKE, 2010). Estas citocinas são principalmente sintetizadas por fagócitos mononucleares, mas também foi relatada a produção por células endoteliais, queratinócitos, células sinoviais, osteoblastos, células da glia entre outras (ABBAS; LICHTMAN, 2005; COMMINS; BORISH; STEINKE, 2010).

A IL-1 $\beta$  é sintetizada preferencialmente por monócitos e macrófagos, sendo produzida como um pró-peptídeo, o qual possui pró-domínios que são clivados por uma enzima específica, denominada de caspase-1. Esta enzima está contida dentro de um complexo intracelular, chamado de inflamossomo, que cliva a pró-citocina gerando a proteína biologicamente ativa (BERCZI; SZENTIVANYI, 2003; KAISER *et al.*, 2004; COMMINS; BORISH; STEINKE, 2010; SIMS; SIMTH; 2010).

Foram caracterizados dois receptores distintos para a IL-1 $\beta$ , o receptor do tipo I (IL-1RI) e o receptor do tipo II (IL-1RII), os quais são membros da superfamília das imunoglobulinas. O receptor do tipo I é expresso em quase todas as células e possui na

porção citoplasmática uma longa cadeia, com três domínios do tipo imunoglobulina, as quais participam da transdução de sinal. O receptor do tipo II é expresso em células B, monócitos e neutrófilos. Este receptor apresenta um domínio intracelular pequeno, o qual não induz resposta para IL-1, porém atua como “isca” que inibe competitivamente a ligação ao receptor do tipo I (BERCZI; SZENTIVANYI, 2003; COMMINS; BORISH; STEINKE, 2010; SIMS; SIMTH; 2010).

IL-1 é um mediador pleiotrópico da resposta do hospedeiro à infecção e injúria, o qual é capaz de coordenar a atividade de outras citocinas na resposta imune/inflamatória. Os efeitos biológicos da IL-1 são semelhantes ao TNF, estimulando diversas células como linfócitos T, células B, monócitos, neutrófilos e células dendríticas. IL-1 estimula células endoteliais e induz a expressão de moléculas de adesão o que permite o aumento da aderência, quimiotaxia e o recrutamento de leucócitos para o foco da inflamação. Ela ainda interage com o sistema nervoso central e induz a febre, letargia, sono e anorexia. A interação de IL-1 com hepatócitos estimula a síntese de peptídeo plasmático de fase aguda, como por exemplo, as proteínas que participam do sistema complemento. Em grandes quantidades, contribui para o choque séptico e hipotensão. Apesar da grande semelhança com os efeitos do TNF, devido à sinalização de proteínas homólogas e ativação dos mesmos fatores de transcrição a IL-1 não é capaz de induzir a morte apoptótica da célula (BERCZI; SZENTIVANYI, 2003; ABBAS; LICHTMAN, 2005; COMMINS; BORISH; STEINKE, 2010).

### 2.6.3 Interleucina-6 (IL-6)

A IL-6 é outra citocina pleiotrópica que atua na resposta imune inata e na adaptativa. A maior fonte deste polipeptídeo é obtida de fagócitos mononucleares, entretanto, também é produzido por vários tipos celulares, tais como: fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais e linfócitos B em resposta a injúria, inflamação, infecção, bem como a presença de outras citocinas como IL-1 e TNF. A forma funcional desta citocina é um homodímero, com as subunidades formadas por um domínio

globular com quatro  $\alpha$ -hélices (ABBAS; LICHTMAN, 2005; KISHIMOTO; 2005; COMMINS; BORISH; STEINKE, 2010).

Esta glicoproteína de 26 kDa liga-se a um receptor, o qual é formado por uma proteína que possui o sítio de ligação  $\alpha$ , que apresenta uma cadeia  $\alpha$  de 80 kDa. Esta cadeia interage com a cadeia  $\beta$  de 130 kDa (denominada gp130), que é a responsável pela transdução do sinal. Ambas as frações pertencem à família dos receptores de citocina do tipo I. Existem dois tipos de receptores, os presentes na membrana e aquele que circulam no sangue e líquido sinovial (BERCZI; SZENTIVANYI, 2003; MIMA; NISHIMOTO, 2006; COMMINS; BORISH; STEINKE, 2010). A ativação do receptor para IL-6 desencadeia uma cascata de sinalização que inclui a autofosforilação de JAKs ("*Janus activation kinases*"), que, por sua vez, podem ativar as proteínas STATs promovendo a fosforilação de outras quinases ou a migração das STATs para o núcleo para que atuem como fator de transcrição nuclear (ARA; DeCLERK, 2010).

A IL-6 possui diversas funções no sistema imune, tais como: estímulo do crescimento, proliferação e diferenciação das células T, influência na diferenciação final das células B para produção de anticorpos, indução da diferenciação de monócito a macrófago, exerce ação em queratinócitos, células do sistema hematopoiético e promove o desenvolvimento de osteoclastos. Esta interleucina possui algumas atividades comuns à IL-1 e TNF, como na indução da febre e produção de proteínas da fase aguda pelos hepatócitos (ABBAS; LICHTMAN, 2005; MIMA; NISHIMOTO, 2006; COMMINS; BORISH; STEINKE, 2010). Entretanto, a superprodução desta citocina pode levar a desordem imunológica e hematológica, inflamação crônica e aguda, destruição de osso e cartilagens e proliferação de células tumorais (MIMA; NISHIMOTO, 2006; NISHIMOTO; 2010).

## 2.7 ATIVIDADE BIOLÓGICA DE POLISSACARÍDEOS

Alguns polissacarídeos têm sido considerados moléculas farmacologicamente ativas por apresentarem atividade antiviral, anticoagulante e antitumoral (BOHN;

BeMILLER,1995). Estas moléculas isoladas de diferentes espécies são descritas como imunomoduladores ou modificadores da resposta biológica (BRM) por interagirem na resposta imunológica (TZIANABOS, 2000).

O mecanismo imunomodulatório, antitumoral e bactericida de diferentes polissacarídeos envolve principalmente a ativação de macrófagos (SCHEPETKINS; QUINN, 2006). Os polissacarídeos podem ativar macrófagos e desencadear nestas células diferentes respostas celulares, como mudanças na produção de ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ), alteração na síntese e liberação de citocinas, atividade elicitora de células para a cavidade peritoneal e alteração da capacidade fagocítica (Figura 8) (TZIANABOS, 2000; MORETÃO *et al.*, 2003; 2004; MELLINGER *et al.*, 2005; SCHEPETKINS *et al.*, 2008; YANG *et al.* 2008).

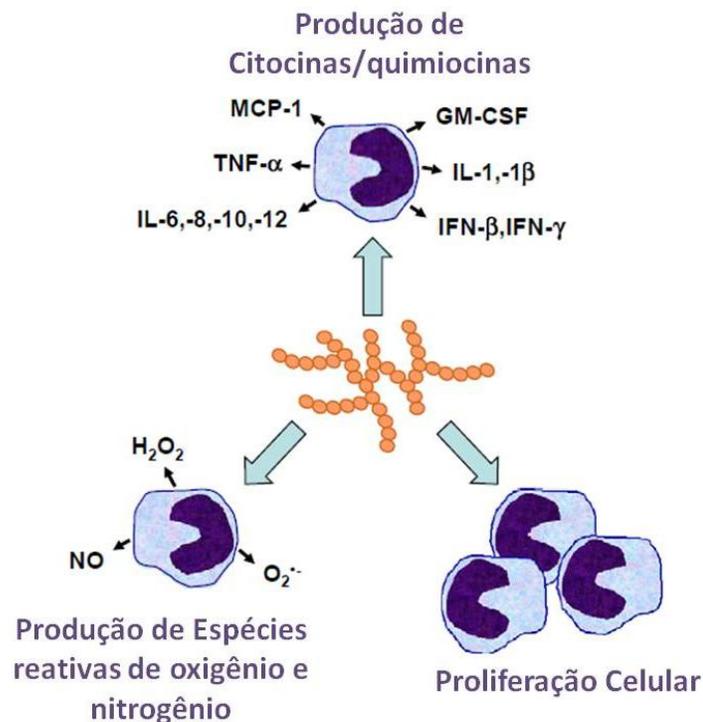


FIGURA 8 – RESPOSTAS DOS MACRÓFAGOS TRATADOS COM POLISSACARÍDEOS

FONTE: Adaptado de SCHEPETKINS; QUINN (2006)

NOTA: Abreviações: MCP-1, proteína quimiotática de monócitos-1; GM-CSF, fator estimulante de colônia de granulócitos e macrófagos; IL, interleucina; INF, interferon; TNF, fator de necrose tumoral e NO, óxido nítrico

Muitos estudos foram realizados com as glucanas  $\beta(1\rightarrow3)$  tanto na forma particulada como solúvel. Estes polímeros, isolados de parede celular de microorganismos, plantas e diversos fungos, possuem uma cadeia principal de unidades de D-glucose ligadas  $\beta(1\rightarrow3)$ , com ramificações de unidades D-glucose ligadas  $\beta(1\rightarrow6)$  (BOHN; BeMILLER, 1995; KRAUS; FRANZ, 1991). Diferentes respostas biológicas foram determinadas para estes polissacarídeos, tais como: atividade antitumoral, ativação do sistema de coagulação e ativação de macrófagos (SAITÔ *et al.*, 1991, ADACHI *et al.*, 1993; OHYA *et al.*, 1994; BOHN; BeMILLER, 1995; TZIANABOS, 2000)

Foi observado que macrófagos peritoneais de camundongos possuem receptores para  $\beta$ -glucana, podendo assim reconhecer e fagocitar este polissacarídeo, levando a ativação destas células, com produção e secreção de IL-1, IL-6,  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{NO}^{\bullet}$  e aumentada capacidade fagocítica (ABEL; CZOP, 1992; SAKURAI *et al.*, 1992; ADACHI *et al.*, 1993; OKASAKI *et al.*, 1996; AKRAMIENE *et al.*, 2007). Beyon *et al.* (2009) estudaram os efeitos da  $\beta$ -glucana isolada do cogumelo *Tricholoma matsutake* em macrófagos, monócitos e linfócitos esplênicos e observaram que este polissacarídeo ativou macrófagos RAW 264.7, devido ao aumento na produção de  $\text{NO}^{\bullet}$ ,  $\text{TNF-}\alpha$ , e da atividade fagocítica.

A  $\alpha$ -glucana, isolada do líquen *Ramalina celastri*, cuja estrutura principal é constituída por ligações (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 4) alternadas, na proporção 3:1, apresentou efeitos citotóxicos e alterações morfológicas em células HeLa (CARNEIRO-LEÃO, *et al.*, 1997). Quando injetado intraperitonealmente, este polissacarídeo foi capaz de elicitar e ativar macrófagos, promovendo o aumento da produção de peróxido de hidrogênio e da capacidade fagocítica em macrófagos peritoneais de camundongos (STUELP-CAMPELO *et al.*, 2002).

A manana extraída de *Saccharomyces cerevisiae* e a galactomanana isolada do líquen *Ramalina celastri*, assim como seus complexos com íon vanadilo mostraram efeitos sobre macrófagos peritoneais de camundongos. Estes polímeros, além de não ativarem a produção de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  em macrófagos *in vitro*, diminuiriam sua produção quando as células foram estimuladas por PMA. Ambos os polímeros aumentaram a produção

de NO<sup>•</sup> em 55% e 40%, respectivamente, quando comparada com o grupo controle (NOLETO *et al.*, 2002; 2004). Outro aspecto relevante refere-se ao efeito leishmanicida desse polissacarídeo *in vitro* exercido contra a forma amastigota de *Leishmania amazonensis*. Porém, somente a galactomanana complexada promoveu inibição do crescimento da forma promastigota *Leishmania amazonensis* (NOLETO *et al.*, 2002).

Estudos com outros polissacarídeos de origem vegetal demonstraram que estes são capazes de atuar como modificadores da resposta biológica (BRM) (NOLETO *et al.*, 2002; 2004; MORETÃO *et al.*, 2003; MELLINGER *et al.*, 2005; YANG *et al.* 2008; ROSÁRIO *et al.* 2008; WANG *et al.*, 2010). Isto foi observado com uma  $\beta$ -(1→4)-manana acetilada (acemanana) extraída da *Aloe vera* (babosa) cuja ativação dos macrófagos foi evidenciada pelo aumento na produção de NO<sup>•</sup> (RAMAMOORTHY *et al.*, 1996). Leung *et al.* (2004), estudaram o efeito imunomodulador de frações isoladas desta mesma espécie, e constataram que, além da produção de NO<sup>•</sup>, houve o aumento da produção de citocinas por células do sistema imune. Uma manana acetilada de *Aloe saponaria* (babosa), outra espécie pertencente ao mesmo gênero foi capaz de inibir a ativação e proliferação de células tumorais (SAMPEDRO *et al.*, 2004).

Arabinogalactanas isoladas de diferentes fontes também mostraram ser capazes de ativar macrófagos em diferentes vias. Moretão *et al.* (2003; 2004) mostraram que este polissacarídeo (ARAGAL) isolado da goma da *Anadenanthera colubrina* (angico branco), uma árvore leguminosa nativa do Brasil, ativou macrófagos tanto *in vitro* como *in vivo*. Os autores observaram um aumento da capacidade fagocítica, atividade elicitora de células para a cavidade peritoneal, produção de TNF- $\alpha$ , produção de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> e atividade antitumoral contra células do Sarcoma 180.

Outra arabinogalactana isolada da planta *Phyllanthus niruri* (quebra-pedra) induziu o *burst* respiratório, acarretando em uma alta produção de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Por outro lado, este polissacarídeo não alterou a produção de NO<sup>•</sup> (MELLINGER *et al.*, 2005). Estudos posteriores utilizando o mesmo polissacarídeo após tratamento com HCl, para mimetizar a ação gástrica demonstraram um menor aumento na produção de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, quando comparado com o polímero nativo (MELLINGER *et al.*, 2008).

A fração polissacarídica obtida a partir do chá de *Gynostemma Pentaphyllum* (cipó doce), utilizada tradicionalmente como chá pelos chineses, mostrou um

heteropolissacarídeo constituído por glucose, galactose, arabinose, ramnose, ácido galacturônico, xilose, manose e ácido glucurônico. Este heteropolímero ativou macrófagos provenientes da cavidade peritoneal quanto à produção de  $\text{NO}^*$ , ROS e TNF, além de se mostrar capaz de inibir a proliferação de carcinomas (YANG *et al.* 2008)

Xie *et al.* (2008) isolaram cinco frações das folhas de *Artemisia tripartita*, a qual é utilizada popularmente no tratamento de doenças como asma, artrite reumatóide e hepatite. Neste estudo foi observado que as frações resultantes da purificação do extrato aquoso eram constituídas principalmente de xilose, glucose, arabinose, galactose e galactosamina em proporções variadas. Todas as amostras induziram a ativação de macrófagos em diferentes intensidades, através da produção de  $\text{O}_2^*$ ,  $\text{NO}^*$ , IL-6 e IL-12, bem como  $\text{TNF}\alpha$ .

Um polissacarídeo ácido extraído do *Panax ginseng*, o qual apresenta em sua composição glucose, arabinose e ácido urônico, apresentou atividade citotóxica em três linhagens de células tumorais. Este efeito foi mediado pela ativação dos macrófagos, os quais aumentaram a produção de  $\text{NO}^*$ , IL-1, IL-6 e  $\text{TNF}\alpha$ , assim como, a atividade fagocítica (WANG *et al.*, 2010).

Frações provenientes do extrato aquoso do cacto *Opuntia poliacantha*, constituídas por galactose, ácido galacturônico, xilose, arabinose e ramnose, foram capazes de ativar macrófagos humanos e murinos. Esta resposta foi evidenciada através do aumento da produção de ROS, liberação de  $\text{NO}^*$ , IL-6 e  $\text{TNF}\alpha$  (SCHEPETKINS *et al.*, 2008).

A xiloglucana isolada de sementes de *T. indica*, promoveu o aumento da capacidade fagocítica em monócitos humanos e ativou o *burst* respiratório (PAULY; FREIS; PAULY, 1999). SREELEKHA *et al.* (1993) caracterizaram a atividade imunomoduladora deste polissacarídeo devido ao estímulo da capacidade fagocítica por neutrófilos, inibição da migração de leucócitos e inibição da proliferação celular. Xiloglucanas de tamarindo modificadas, apresentando diferentes graus de sulfatação, exibiram atividade antiviral contra o vírus da rubéola (MASTROMARINO *et al.*, 1997).

Recentemente, Silveira (2010) testou os efeitos da xiloglucana, proveniente de sementes de *H. courbaril*, em relação a capacidade fagocítica de macrófagos da

linhagem RAW 264.7 e observou que este polissacarídeo estimulou a fagocitose em até 106% quando comparado ao grupo controle.

Rosário *et al.* (2008) avaliaram os efeitos das xiloglucanas de reserva provenientes de sementes de *H. courbaril*, *C. langsdorffii* e *M. sloanei* e observaram que estes polímeros estimularam a atividade elicitora de macrófagos para cavidade peritoneal, além de promover o aumento da produção de NO<sup>•</sup>.

## 2.8 ESPÉCIES VEGETAIS UTILIZADAS PARA OBTENÇÃO DE XILOGLUCANAS

### 2.8.1 *Copaifera langsdorffii*

De acordo com Cronquist (1988), a espécie *C. langsdorffii* pertence à divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, ordem Fabales, família Caesalpiniaceae e gênero *Copaifera*. Esta espécie é conhecida popularmente como: copaíba, copaíba-vermelha, oleiro, copaíba-da-varzea, copaúba, cupiúva, óleo-vermelho, pau-de-óleo e podoi. É uma espécie encontrada em Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul, São Paulo e Paraná, principalmente na floresta latifoliada da bacia do Paraná. É uma árvore com aproximadamente 10 a 15 metros de altura, possui uma copa globosa densa com folhas compostas, sendo os seus folíolos alternados ou opostos. As flores são brancas, pequenas, hermafroditas, reunidas em panículas terminais. Os frutos são do tipo folículo com uma semente preta envolvida por um arilo de cor laranja (Figura 9). Este conjunto de características morfológicas do fruto indica uma planta dispersa por animais, principalmente aves. Sua madeira é empregada na construção civil, para confecções de artigos esportivos e em ferramentas (LORENZI, 1992; PEDRONI; SANCHEZ; SANTOS, 2002).

A seiva extraída mediante aplicação de furos no tronco até atingir o cerne fornece o bálsamo ou óleo de *C. langsdorffii*, um líquido transparente que possui diversas aplicações na área farmacêutica (LORENZI, 1992). O óleo obtido das sementes de *C. langsdorffii* é rico em coumarina e ácido linoléico (STUPP *et al.*, 2008).

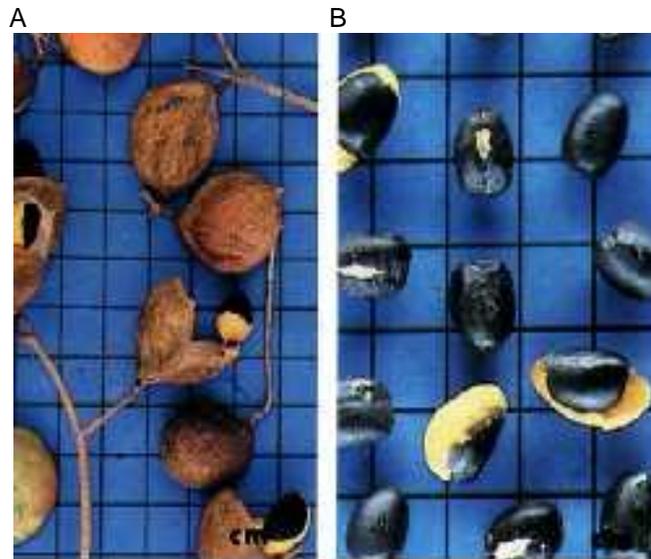


FIGURA 9 – (A) FRUTOS E (B) SEMENTES DE *C. langsdorffii* (COPAÍBA)  
 FONTE: LORENZI, H.; 1992.

### 2.8.2 *Hymenaea courbaril*

Segundo a classificação proposta por Cronquist (1988) a espécie *H. courbaril* pertence à divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, ordem Fabales, família Caesalpiniaceae e gênero *Hymenaea*. Esta espécie é conhecida popularmente como: jatobá, jataí, jataí-amarelo, jataí-peba, jataí-vermelho, jitaí, farinha, jataíba, burandã, imbiúva, jatobá-miúdo e jatobá-da-catinga. É uma espécie nativa do Piauí até o norte do Paraná na floresta semidecídua, tanto em solos de alta como média fertilidade. A altura da árvore varia de 15 a 20 metros, com tronco de até 1 metro de diâmetro. Sua madeira é empregada na construção civil, para confecções de utensílios esportivos e de ferramentas (LORENZI, 1992).

As folhas de coloração verde escura são compostas de dois folíolos brilhantes, de 6-14 cm de comprimento. As flores são pequenas, com pétalas brancas, pouco maiores do que o cálice. Seu fruto é uma vagem marrom avermelhada, medindo de 8 a 15 centímetros de comprimento por 3 a 5 centímetros de largura. Apresenta

consistência rígida, de forma arredondada e outras vezes achatada, contendo no seu interior de 3 a 6 sementes, as quais são envoltas por uma substância farinácea, compacta e comestível (Figura 10) (LORENZI, 1992; RIZZINI, 1978; CARVALHO, 1994).

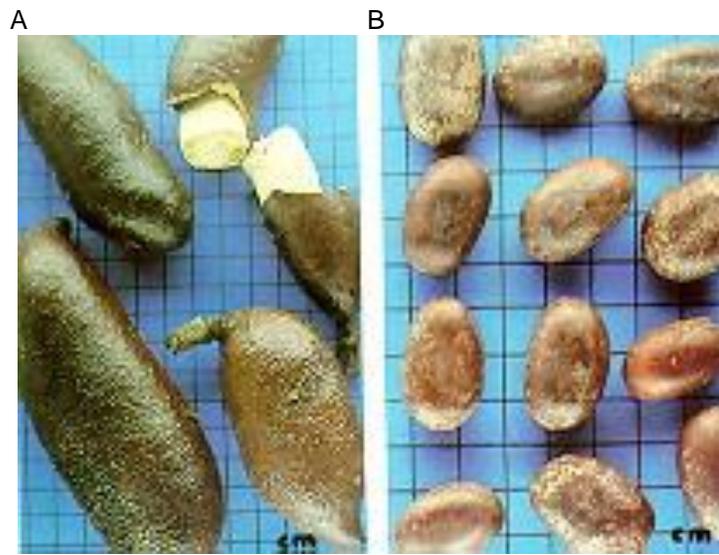


FIGURA 10 – (A) FRUTOS E (B) SEMENTES DE *H. courbaril* (JATOBÁ)  
FONTE: LORENZI, H., 1992.

### 2.8.3 *Tamarindus indica*

Segundo a classificação proposta por Cronquist (1988) a espécie *T. indica* pertence à divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, ordem Fabales, família Caesalpiniaceae e gênero *Tamarindus*.

Também conhecido como tamarineiro, ou somente por tamarindo, é uma espécie natural das savanas mais secas da África e da Ásia. A partir da Índia foi levado para todas as terras de domínio lusitano, inclusive para o Brasil. A espécie renova suas folhas na primavera; floresce no verão, forma seus frutos no inverno que amadurecem na entrada da primavera. A árvore de *T. indica* apresenta uma copa densa e volumosa, altura que ultrapassa 40m e a madeira de boa qualidade utilizada na marcenaria. Apresentam folhas alternadas regularmente; folíolos pequenos indefinidos quanto ao

número, flores em racemos terminais, branco amarelada, manchadas de vermelho. O fruto é uma vagem oblonga ou linear levemente curva apresentado 5 a 10 cm de comprimento, a casca de coloração pardo-escura, lenhosa e quebradiça, contendo 3 a 8 sementes envolvidas por uma polpa parda e ácida. As sementes são também achatadas, obovado-orbiculares, em número de 1 a 12 por legume e estão envolvidas por uma membrana (Figura 11) (DONADIO *et al.*, 1988; PEIXOTO, 2006).

A polpa é utilizada na forma de refresco, sorvetes e doces. Popularmente, o tamarindo é utilizado terapeuticamente por apresentar ação laxativa, suas folhas são utilizadas como vermífugo e a infusão das flores são indicadas para doenças hepáticas (GONSALVES, 2002).

O pó das sementes de *T. indica* é a única fonte utilizada comercialmente para obtenção de xiloglucanas, as quais encontram diversas aplicações industriais conforme abordado no item 2.2.2. (GONSALVES, 2002; KUMAR; BHATTACHARYA, 2008).

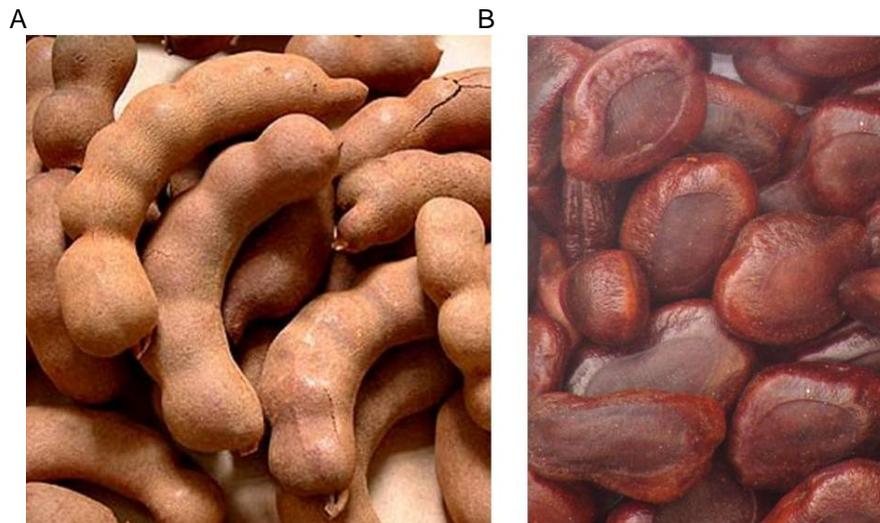


FIGURA 11 – (A) FRUTOS E (B) SEMENTES DA ESPÉCIE *T. indica* (tamarindo)

FONTE: As imagens foram retiradas dos sites abaixo, os quais foram acessados no dia 22 de junho de 2010

(A): [http://sacredorigin.com/images/tamarind\\_tamarindus\\_indica.jpg](http://sacredorigin.com/images/tamarind_tamarindus_indica.jpg)

(B): <http://product-image.tradeindia.com/00278409/b/0/Tamarind-Seeds-Tamarindus-Indica-.jpg>

### 3 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

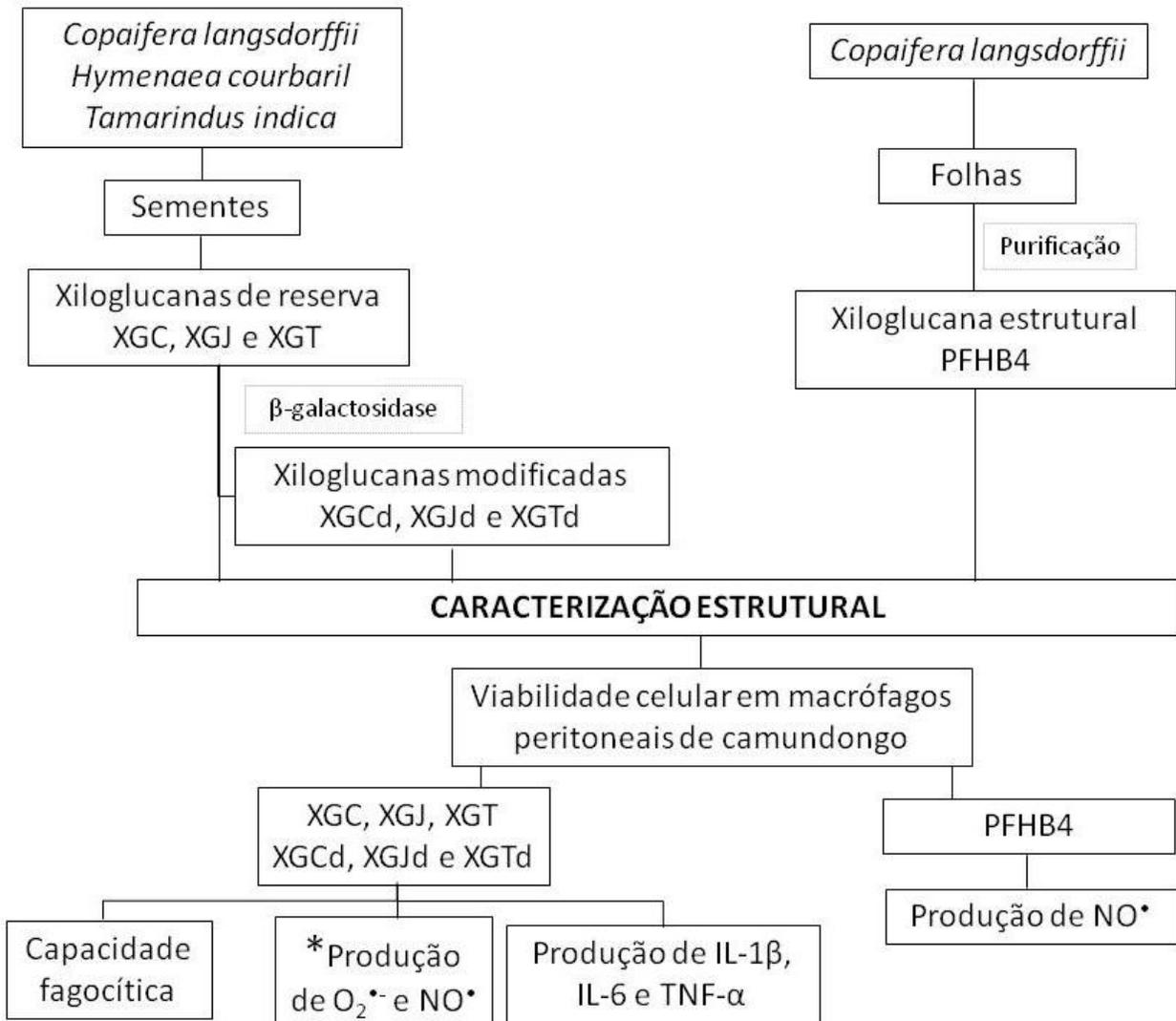


FIGURA 12 – ESTRATÉGIA ADOTADA PARA REALIZAÇÃO DO PRESENTE TRABALHO

FONTE: O autor (2010)

NOTA: (\*) Neste trabalho, a produção de  $O_2^{\bullet-}$  e  $NO^{\bullet}$  foi avaliada para as frações XGT, XGCd, XGJd e XGTd, pois, nestas vias foram anteriormente testadas para as frações XGC e XGJ (ROSÁRIO *et al.*; 2008).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 OBTENÇÃO DAS SEMENTES DE *H. courbaril*, *C. langsdorffii* E *T. indica*, E DAS FOLHAS *C. langsdorffii*

As sementes de *H. courbaril*, *C. langsdorffii* e *T. indica* foram adquiridas do IPEF (Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais - Piracicaba/SP). A mesma Instituição, gentilmente cedeu as folhas de *C. langsdorffii* que foram coletas em Abril de 2008.

### 4.2 ISOLAMENTO DOS COTILÉDONES DAS SEMENTES E INATIVAÇÃO ENZIMÁTICA

Sementes de *C. langsdorffii* (copaíba), *H. courbaril* (jatobá) e *T. indica* (tamarindo) foram submetidas à fervura por 30, 90 e 40 min, respectivamente. O tempo de fervura dependeu do inchaço das sementes. Após este processo, as sementes permaneceram por 12 h na água de fervura, a 4°C. Após esse tempo, os cotilédones foram separados manualmente do tegumento. Os cotilédones secos foram moídos no moinho WILLYE TE-650 utilizando peneira de 40 mesh, deslipidificados com tolueno-etanol (2:1), por aproximadamente 36 h, em aparelho extrator de Soxhlet e submetidos à extração com metanol-água (4:1) por 30 min em refluxo para inativação enzimática. O resíduo foi seco a temperatura ambiente, pesado e utilizado para posteriores extrações.

### 4.3 OBTENÇÃO DAS XILOGLUCANAS DE RESERVA

O material foi seco e submetido a extração aquosas a temperatura ambiente, por 1 h com agitação mecânica. Em seguida, as soluções foram centrifugadas no

equipamento SORVALL T6000D a 8000 rpm por 20 min, separando-se o extrato do resíduo. O polissacarídeo foi então precipitado utilizando dois volumes de etanol comercial. O material precipitado foi lavado 2 vezes com etanol absoluto e então seco em estufa a vácuo. Posteriormente, o material foi ressuspenso em água destilada e liofilizado. Para a obtenção das xiloglucanas modificadas e para os experimentos de atividade biológica foi utilizada a fração obtida na primeira extração aquosa de cada espécie, a qual foi denominada pela sigla XG (xiloglucana) além da letra inicial do nome comum da espécie da qual foi isolada, portanto para xiloglucanas obtidas das sementes de *H. courbaril* (jatobá), *C. langsdorffii* (copaíba) e *T. indica* (tamarindo), foram atribuídas às siglas XGJ, XGC e XGT, respectivamente.

#### 4.4 OBTENÇÃO DAS XILOGLUCANAS MODIFICADAS

Os polissacarídeos XGJ, XGC e XGT foram submetidos a um processo de desgalactosilação segundo protocolo modificado por Busato *et al.*, (2009). As soluções aquosas das xiloglucanas a 1% (p/v), previamente esterilizadas em capela de fluxo laminar por radiação de UV por 30 min, foram tratadas com a enzima  $\beta$ -D-galactosidase MEGAZYME (*A. niger*) na concentração final de 8 U/mL. A hidrólise enzimática foi realizada em agitador orbital, a 50 °C, 100 rpm, pH 6,8, durante 24 h. Para a inativação enzimática, os polissacarídeos foram mantidos em banho a 97 °C, durante 20 min. A seguir, XGJ, XGC e XGT foram precipitados com 2 volumes de etanol, mantidos por aproximadamente 15 h na geladeira, centrifugados e secos em estufa à vácuo. Foram obtidos os polissacarídeos modificados, XGJd, XGCd e XGTd, onde o “d” refere-se ao material desgalactosilado.

#### 4.5 OBTENÇÃO DA XILOGLUCANA ESTRUTURAL DAS FOLHAS DE *C. langsdorffii*

As folhas foram selecionadas, lavadas manualmente com solução de hipoclorito de sódio 1% e posteriormente com água corrente. Após secagem em estufa, o material foi moído (400 g) e despigmentado com etanol absoluto, seguido de extração em aparelho Soxhlet com acetona comercial, até total remoção do pigmento e então deslipidificação com tolueno: etanol (2:1).

Posteriormente o material foi deslignificado (50 g) utilizando solução contendo ácido acético glacial e clorito de sódio 40%, a 70°C, por 6 h, sob pressão reduzida. Este processo foi repetido até a deslignificação de todo material (400 g) (WISE *et al.*, 1946; GREEN, 1963).

As folhas deslignificadas e secas foram submetidas a uma extração aquosa, a 60°C, por 8 h, originando a fração FC1, seguida por três extrações seqüenciais com KOH 1M e então três extrações sequenciais com KOH 4M. O extrato aquoso foi precipitado com três volumes de etanol comercial e o precipitado separado por centrifugação foi lavado sucessivamente com etanol absoluto e seco em estufa a vácuo.

Todas as extrações alcalinas foram feitas a temperatura ambiente, por 8 h, na presença de borohidreto de sódio. Os extratos alcalinos foram tratados com solução de ácido acético 50% (v/v) até pH 5,0, o que resultou na precipitação das frações denominadas hemicelulose A (HA), as quais foram separadas por centrifugação, lavadas sucessivamente com etanol absoluto e secas em estufa a vácuo. Para a identificação da fração utilizou-se o número correspondente a ordem da extração após a sigla HA, gerando as frações HA1, HA2, HA3, HA4, HA5 e HA6. Após precipitação da hemicelulose A, os sobrenadantes foram dialisados por 72 h, contra água corrente, concentrados em evaporador rotatório em temperatura inferior a 50°C, e então, tratados com 3 volumes de etanol comercial, para precipitação das frações denominadas hemicelulose B, que foram separadas por centrifugação, lavadas sucessivamente com etanol absoluto e secas em estufa a vácuo. O mesmo padrão de nomenclatura acima descrito foi atribuído aos precipitados correspondentes a hemicelulose B (HB1, HB2,

HB3, HB4, HB5 e HB6). O fluxograma de extração das folhas está resumido na Figura 13.

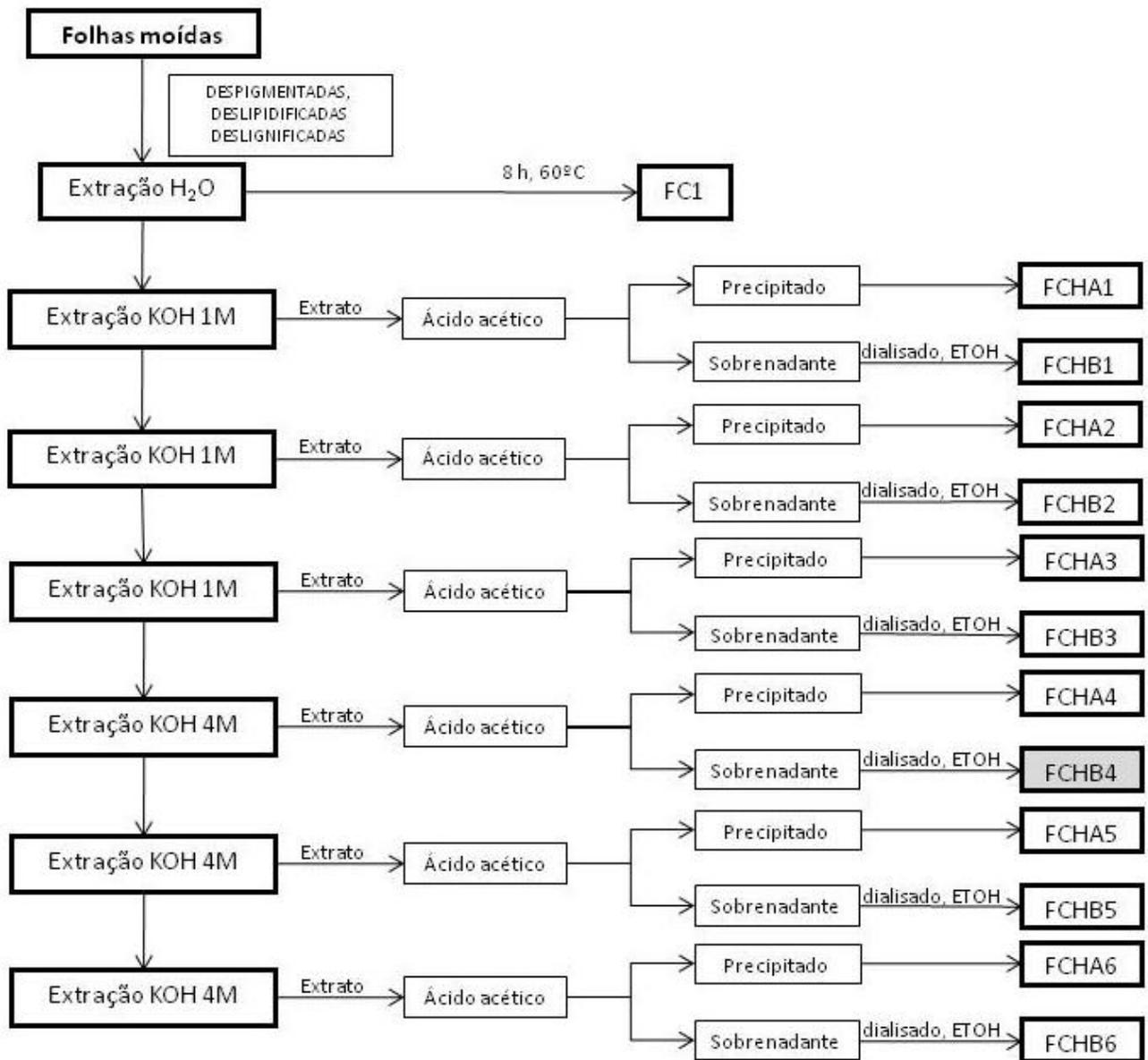


FIGURA 13 – FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS PROVENIENTES DAS FOLHAS DE *C. langsdorffii* (item 4.5)  
 FONTE: O autor (2010)

Diferente do observado para as outras hemiceluloses B, a primeira fração obtida com KOH 4M, apresentava em sua solução, material em suspensão, proveniente da fração HA4. Portanto, este material foi submetido à centrifugação a 12.000 rpm, em

centrífuga de eppendorf, e o sobrenadante obtido foi dialisado em água corrente, seguido de diálise fechada com água MilliQ. A fração retida na membrana de diálise foi filtrada em membrana de 0,45  $\mu\text{m}$ . Após a redução de volume, o material foi precipitado com três volumes de etanol a 4°C e mantido por 15 h sob resfriamento (4°C). O precipitado foi centrifugado e lavado com gradiente de etanol (70, 80 e 90 %). A fração HB4 foi ressuspensa em água destilada, dialisada e liofilizada.

#### 4.6 CROMATOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA

A fração HB4 (1 g) foi solubilizado em 200 mL de tampão fosfato 0,5M, pH 7,3 e submetida à cromatografia em coluna de troca-iônica. A coluna de vidro (22 cm x 5,5 cm d.i.) contendo DEAE-SEPHACEL (Pharmacia Biotech) foi eluída com aproximadamente 2 L de tampão fosfato (0,5M e pH 7,3), utilizando fluxo de aproximadamente 1 mL/min, conforme mostrado na Figura 14 (página 62). A fração obtida foi dialisada (contra água corrente e posteriormente água MilliQ), o volume foi reduzido e o material foi liofilizado, originando a fração FCHB4DS. Após a eluição da solução tampão, o gel foi eluído com solução de NaCl 4M (FCHB4NaCl), a fração removida foi dialisada e liofilizada.

Após a recuperação do gel de troca iônica (segundo protocolo do fabricante), a fração FCHB4DS foi recromatografada com solução tampão fosfato, seguindo o mesmo protocolo acima descrito, obtendo-se a fração FCHB4DS2. O fracionamento do material foi monitorado pelo método de fenol – ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956).

#### 4.7 PRECIPITAÇÃO COM SOLUÇÃO DE FEHLING

A fração FCHB4DS foi tratada com solução de Fehling (JONES; STOODLEY, 1965). Esta solução é formada por duas soluções A e B (1:1 v/v). A solução A é composta por 173 g de tartarato de potássio e sódio, 125 g de KOH e quantidade de

água destilada suficiente para completar o volume de 500 mL. A solução B é composta por 55,7 g de sulfato de sódio pentaidratado e quantidade de água destilada suficiente para completar o volume de 500 mL.

Adicionou-se à fração FCHB4DS solubilizada em água o mesmo volume da solução de Fehling (A+B) e após vigorosa agitação o material foi mantido sob refrigeração por 12 h. Após este período, o precipitado formado foi separado por centrifugação (9000 rpm, 15 min a 25°C). O sobrenadante foi neutralizado com ácido acético e dialisado contra água corrente por 72 h. O precipitado formado foi ressuspensão em água destilada, deionizado por resina Dowex na forma catiônica, concentrado em evaporador rotatório e então liofilizado, obtendo-se a fração PFHB4.

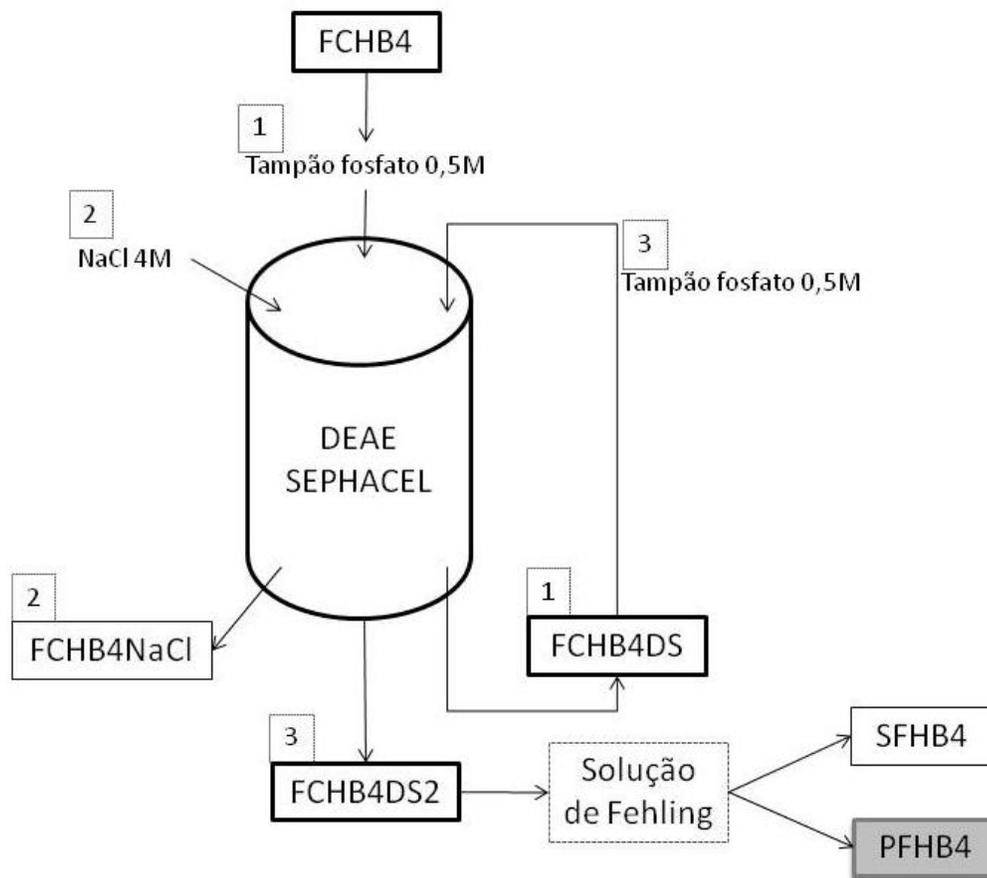


FIGURA 14 – ESQUEMA DOS PROCESSOS DE PURIFICAÇÃO ADOTADOS PARA OBTENÇÃO DA XILOGLUCANA ESTRUTURA DAS FOLHAS DE *C. langsdorffii*.

FONTE: O autor (2010).

NOTA: Referente aos itens 4.6 e 4.7.

#### 4.8 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ARABINOGALACTANA-PROTEÍNAS

Para detecção e quantificação de arabinogalactana-proteína a fração FCHB4NaCl foi solubilizada em uma solução de NaCl a 0,25 M ( 5 a 100 mg/mL) para difusão radial em gel de agarose Tipo C a 1% (Calbiochem) contendo 0,02 mg/mL do reagente  $\beta$ -glucosyl Yariv, por 24 h em temperatura ambiente. O reagente  $\beta$ -glucosyl Yariv foi sintetizado como descrito por Yariv, Rapport e Graf (1962). Goma arábica (Sigma Chem.Co., St. Louis, USA) foi usada como padrão a 0,25; 0,5; 1; 2 e 3  $\mu$ g. A presença de arabinogalactana-proteína (AGP) foi avaliada devido a difusão da amostra no gel e formação de um halo de coloração castanho-avermelhada, característico da formação do complexo AGP-Yariv. O diâmetro interno (d.i) do halo foi medido com a utilização de paquímetro e, a partir da curva padrão foi calculado a porcentagem de AGP na amostra.

#### 4.9 DOSAGENS COLORIMÉTRICAS

As dosagens de açúcar total foram realizadas pelo método de fenol - ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956), utilizando padrão de glucose em concentrações de 20-100  $\mu$ g/mL. As amostras foram solubilizadas a 50  $\mu$ g/mL, posteriormente foi adicionado 500  $\mu$ L de solução de fenol a 5% e 2,4 mL de ácido sulfúrico Merck®. Após o resfriamento a temperatura ambiente, foram realizadas as leituras de absorvância em 490 nm. As dosagens de proteína foram realizadas pelo método de Hartree (1972), que consiste na adição de 0,9 mL do reagente A (2 g de tartarato duplo de sódio e potássio e 100 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> em 500 mL de NaOH 1M dissolvidos em 1000 mL de água destilada q.s.p.) em 1 mL de amostra. A solução permaneceu em “banho-maria” a 50 °C durante 10 min, e então foi resfriada até temperatura ambiente. Posteriormente, adicionou-se 0,1 mL do reagente B (2 g de tartarato duplo de sódio e potássio e 1 g de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O dissolvidos em 90 mL de água destilada, sobre os quais se adicionam 10 mL de NaOH

1M), após agitação em vortex, a solução permaneceu em repouso por 10 min à temperatura ambiente. Adicionou 3 mL do reagente C (1 mL de reagente de Folin Ciocalteu 2 N diluído em 15 mL de água destilada), seguido de aquecimento em banho-maria a 50 °C durante 10 min. Após o resfriamento até temperatura ambiente, a absorbância foi lida em 650 nm. Utilizou-se como padrão albumina bovina nas concentrações de 20-100 µg/mL.

A quantificação de ácidos urônicos foi determinada pelo método de Filisetti-Cozzi e Carpita, (1991), sendo as leituras de absorbância efetuadas em 520 nm, utilizando como padrão ácido glucurônico, em concentrações de 20-100 µg/mL. Em 400 µL de amostra foram adicionados 40 µL de solução de ácido sulfâmico-sulfamato de potássio 4 M (pH 1,6). A mistura foi aquecida em banho fervente por 20 min. Após resfriamento em gelo, 80 µL de *m*-hidroxibifenil (0,15% p/v em NaOH 0,5% p/v) foram adicionados e a coloração tornou-se aparente após 5-10 min, sendo estável até 1 h após sua formação.

#### 4.10 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA

##### 4.10.1 Hidrólises ácidas totais

As hidrólises ácidas foram realizadas por dois métodos:

- ✓ TFA 1 M, durante 5 h a 100 °C. Ao término da hidrólise o excesso de ácido foi removido por evaporação (ADAMS, 1965; BIERMANN, 1989).
- ✓ H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72% (p/p), durante 1 h, em banho de gelo, seguido de diluição para 8%, a 100 °C por aproximadamente 6 h. Ao final da hidrólise o ácido foi neutralizado com carbonato de bário e o sal resultante removido por filtração (BIERMANN, 1989).

#### 4.10.2 Redução e acetilação dos produtos resultantes do processo de hidrólise

Os monossacarídeos resultantes das hidrólises foram reduzidos com boroidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ), por aproximadamente 12 h, em meio aquoso, a 25 °C (WOLFROM; THOMPSON, 1963 a). Após a redução, o material foi tratado com resina catiônica (forma  $\text{H}^+$ ) para a remoção do cátion sódio ( $\text{Na}^+$ ) e decomposição do excesso do agente redutor. Em seguida, o material foi filtrado e evaporado até a secura. Foram realizadas três lavagens sucessivas com aproximadamente 2 mL metanol para a remoção do ácido bórico remanescente por co-destilação com metanol, na forma de borato de trimetila. Após completa secura, os alditóis foram acetilados com anidrido acético e piridina na proporção 1:1 v/v, durante 12 h a temperatura ambiente (25 °C) (WOLFROM; THOMPSON, 1963 b). Este processo foi interrompido com a adição de gelo picado e os acetatos de alditóis foram extraídos com clorofórmio. A piridina residual na fase clorofórmica foi eliminada com sucessivas lavagens com sulfato de cobre 5% e água de forma intercalada. A fase clorofórmica foi lavada diversas vezes com água destilada, evaporada a 25°C para posterior análise por cromatografia líquido-gasosa (GLC) ou por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GLC-MS) (SLONEKER, 1972).

#### 4.11 CROMATOGRAFIA LÍQUIDO-GASOSA (GLC) E CROMATOGRAFIA LÍQUIDO-GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA (GLC-MS)

Para as análises de GLC foi utilizado um cromatógrafo TRACE GC ULTRA (Thermo), com detector de ionização de chama (FID) a 300 °C e injetor a 250 °C, utilizando hélio como gás de arraste, em coluna capilar de sílica fundida (30 m X 0,25 mm d.i.) DB-225, marca J.W. As análises cromatográficas para acetatos de alditóis foram realizadas a 220 °C.

As análises por GLC-MS foram realizadas em cromatógrafo gasoso, modelo VARIAN 3800 equipado com coluna capilar de sílica fundida DB-225MS (Durabond) (30 m x 0,25 mm d.i.), e um espectrômetro de massa do tipo *Ion Trap*, marca Varian Saturn

2000R. As injeções nas colunas foram feitas partindo-se de 50°C (mantida por 1 min), seguindo-se um aumento gradual de 40°C/min até 220°C, sendo mantida isotermicamente até o final da análise. Foi utilizado hélio ultra puro como gás de arraste a um fluxo de 1 mL/min

#### 4.12 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA DE ALTA PRESSÃO (HPSEC) ACOPLADA A DETECTORES DE ESPALHAMENTO DE LUZ LASER MULTI ÂNGULOS (MALLS), ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RI) E ULTRAVIOLETA (UV).

As amostras foram solubilizadas em água MilliQ ou solução de NaNO<sub>2</sub> 0,1 M contendo 200 ppm de NaN<sub>3</sub> para obter como concentração polissacarídica final 1 mg/mL e então filtradas através de membranas de acetato de celulose de 0,2µm. As análises foram efetuadas em um cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC), equipado com um detector de índice de refração (RI) diferencial WATERS modelo 2410, detector de ultravioleta Pharmacia LKB, Unicord, modelo VW 2251 (UV) e detector de espalhamento de luz laser em multiângulos (MALLS) WYATT TECHNOLOGY modelo DAWN DSP com 18 canais. Foram utilizadas quatro colunas de gel permeação WATERS em série, com limites de exclusão de  $7 \times 10^6$ ,  $4 \times 10^5$ ,  $8 \times 10^4$  e  $5 \times 10^3$ . O eluente utilizado foi uma solução de NaNO<sub>2</sub> 0,1 M contendo NaN<sub>3</sub> 200 ppm, com fluxo de 0,6 mL/min.

A taxa de variação do índice de refração com a concentração ( $dn/dc$ ) foi determinada para as amostras homogêneas, sendo que para cada amostra foram utilizadas 5 concentrações. Para isto, foi preparada uma solução na concentração 1 mg/mL em NaNO<sub>2</sub> 0,1 M contendo NaN<sub>3</sub> (200 ppm), filtrada em membrana de 0,2 µm, sendo então diluída nas concentrações de 0,2, 0,4, 0,6 e 0,8 mg/mL.

#### 4.13 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

As análises de ressonância magnética nuclear  $^{13}\text{C}$  foram realizadas em espectrômetro da marca BRUKER, modelo DRX 400, série Avance, em tubos de 5 mm de diâmetro, em temperatura de 70°C. Os deslocamentos químicos, expressos em  $\delta$  (ppm), foram determinados utilizando acetona como padrão interno para as análises de  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$  31,45). As amostras foram dissolvidas em  $\text{D}_2\text{O}$ , em uma concentração de ~40 mg/mL.

#### 4.14 SOLUÇÕES E MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS NOS PROCEDIMENTOS UTILIZANDO MACRÓFAGOS

##### 4.14.1 Solução das xiloglucanas estudadas

Para os testes de atividade biológica, as frações das xiloglucanas de reserva, isoladas dos cotilédones das sementes de *H. courbaril* (XGJ), *C. langsdorffii* (XGC), *T. indica* (XGT) e as xiloglucanas modificadas, XGJd, XGCd e XGTd, foram solubilizadas em solução de PBS pH 7,4 na concentração de 10 mg/mL. As soluções foram esterilizadas em autoclave (Fanen) a 120°C, durante 30 min e posteriormente foram diluídas em meio de cultura ou solução salina balanceada de Hanks (HBSS) estéril nas concentrações adequadas para cada experimento.

##### 4.14.2 Solução salina tamponada (PBS)

A solução salina tamponada (PBS) em pH 7,4 foi preparada como solução estoque 5 vezes concentrada, sendo constituída por:  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  40,5 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  7,3 mM

e NaCl 680 mM. Esta solução concentrada foi esterilizada em autoclave (Fanen) a 120°C, durante 30 min e armazenada a 4°C. Para o uso, a solução foi diluída com água MilliQ estéril.

#### 4.14.3 Solução salina balanceada de Hanks (HBSS)

A solução salina balanceada de Hanks (HBSS) (HANKS; WALLACE, 1949) foi preparada através da mistura de duas soluções A e B, as quais foram preparadas na forma de soluções estoque 20 vezes concentradas. A solução A era constituída por NaCl 2,737 mM, KCl 104 mM, CaCl<sub>2</sub> 19,7 mM e MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 16,2 mM e a solução B apresentava como constituintes Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,4 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 8,7 mM, glucose 100 mM. As duas soluções foram misturadas e diluídas em água bidestilada ou água MilliQ e seu pH ajustado para 7,4. A solução resultante foi esterilizada por filtração em membrana estéril com poros de 0,22µm em câmara de fluxo laminar (VECO).

#### 4.14.4 Meio de cultura

O meio mínimo essencial (MEM) (EAGLE, 1959) foi reconstituído em água MilliQ e esterilizado por filtração sob pressão com membrana de acetato de celulose estéril com poro de 0,22µm. Este meio foi suplementado com HEPES 10 mM estéril, 5% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 50 µg/mL de gentamicina e seu pH foi ajustado para 7,4 com solução estéril de bicarbonato de sódio 0,1 M.

#### 4.15 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS

Os macrófagos peritoneais foram obtidos de camundongos albinos Swiss fêmeas (*Mus musculus*) com aproximadamente 30 g e dois meses de idade. Estes animais foram mantidos no biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, sendo mantidos em ciclos de 12 h de luz e 12 h de escuro, alimentados com ração apropriada e água a vontade. Os animais foram utilizados com a autorização do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas, segundo protocolo número 329 do processo 23075.039393/2008-39 (em anexo).

Para a obtenção dos macrófagos, os camundongos foram eutanasiados com éter etílico em câmara de vidro. Após assepsia com álcool iodado e exposição do peritônio, 10 mL de PBS resfriado foi injetado na cavidade peritoneal com auxílio de seringa e agulha estéreis. Após massagem vigorosa da região abdominal, as células do exsudato peritoneal foram aspiradas e transferidas para um tubo plástico estéril, sendo mantidas em banho de gelo. Posteriormente, as células foram centrifugadas a 2000 rpm por 10 min a 4°C em centrífuga HITACHI CR21E. O sobrenadante foi desprezado, o “pellet” foi ressuspenso em meio MEM e as células foram contadas em câmara de Neubauer. Posteriormente as células foram plaqueadas em placa de cultura estéril em densidades variadas, de acordo com cada condição experimental, e deixadas para aderir durante 1 h a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

Em seguida, a monocamada de células aderentes foi lavada 2 vezes com PBS a 37°C. Por este procedimento acima 90% do total de células aderidas são macrófagos, não havendo necessidade de purificação (ADAMS, 1979; HAWORTH; GORDON, 1998). 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)

#### 4.16 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

Para determinação da viabilidade celular utilizou o método descrito por Reilly *et al.* (1998), onde o MTT (brometo de (3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio) avalia o estado funcional da cadeia respiratória. As células metabolicamente ativas reduzem o sal de tetrazólio formando cristais de formazan solúveis em DMSO com uma coloração roxa característica.

Para esta avaliação, foram incubados  $5 \times 10^5$  macrófagos/poço aderidos em placas de 96 poços, foram incubados com meio MEM contendo os polissacarídeos nas concentrações de 10, 25, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$  e incubados por 2 e 48 h. Em seguida, removeu-se o meio e adicionou-se 180  $\mu\text{L}$  de HBSS com 20  $\mu\text{L}$  de solução de MTT em HBSS (5 mg/mL), obtendo uma concentração final em MTT de 500  $\mu\text{g/mL}$ . A placa foi incubada por mais 3 h a 37 °C em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ . Ao término da incubação o excesso de MTT foi removido e os cristais de formazan foram dissolvidos em DMSO. A absorbância das amostras foi medida em leitor de microplacas TECAN INFINITE M200, utilizando comprimento de onda de 550 nm, sendo o branco o DMSO. Os resultados foram expressos estipulando como viabilidade de 100% os macrófagos incubados somente com meio MEM, e a partir disso, foi determinado proporcionalmente à viabilidade celular das células tratadas com as diferentes concentrações dos polissacarídeos.

#### 4.17 PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ )

Para avaliar a produção de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  pelos macrófagos foi utilizado um protocolo baseado no descrito por Sasada *et al.*, 1983. Neste procedimento, a presença de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  foi medida através da redução extracelular do citocromo c. Para a dosagem de  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $5 \times 10^5$  macrófagos/poço aderidos em placas de 96 poços foram incubados com o meio de reação composto por citocromo c (80  $\mu\text{M}$ ) em HBSS mais os polissacarídeos, nas

concentrações finais de 25, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$ . Como controle positivo, os macrófagos foram incubados na presença de PMA (1 $\mu\text{g/mL}$ ).

Após 2 h de incubação a 37 °C em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ , o meio de reação foi transferido cuidadosamente para outra placa de 96 poços e a absorbância foi medida a 550 nm, em leitor de microplacas, utilizando como branco HBSS + citocromo c. As concentrações de  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , correspondente à concentração de citocromo c reduzido, foram determinadas utilizando o coeficiente de extinção molar ( $C_{\text{oxid.red.}\Delta\epsilon} = 2,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) :  $C = A/\epsilon$  (JOHNSTON *et al.*, 1978) e os resultados foram expressos como a produção de ânion superóxido em  $\mu\text{mol}/ 5 \times 10^5$  células.

#### 4.18 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO ( $\text{NO}^\bullet$ )

Como o  $\text{NO}^\bullet$  possui um tempo de meia vida muito curto, a determinação da produção deste radical por macrófagos pode ser mensurada pela formação do nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), um produto de degradação estável. Neste estudo, a dosagem de nitrito foi realizada pelo método de Griess, no qual o princípio da reação é baseado na formação de um azo composto, conforme esquematizado na Figura 15. 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, cuja absorbância pode ser determinada em comprimento de onda de 550 nm (GREEN *et al.*, 1982; SUN *et al.*, 2003).

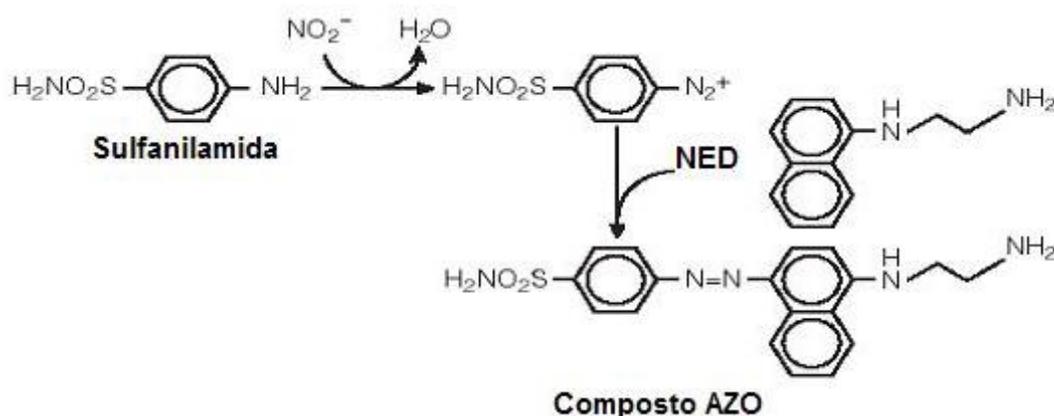


FIGURA 15 – REAÇÃO DE DOSAGEM DE NITRITO COM O REAGENTE DE GRIESS

FONTE: PROMEGA. Technical Bulletin Griess Reagent System – instruction for use of product G2930.

Disponível em: [www.promega.com/tbs](http://www.promega.com/tbs) Acesso em: 05 abril 2010

Abreviação: NED: N-naftil-etilenodiamina

Para a dosagem de nitrito o reagente de Griess foi preparado pela mistura de duas soluções na proporção 1:1, imediatamente antes do uso. A primeira solução era constituída por naftiletilenodiamino 0,1% (p/v) em ácido orto-fosfórico 5% (v/v) e a outra solução por sulfonamina *p*-aminobenzeno 1% (p/v) em ácido fosfórico 5% (v/v) (GREEN *et al.*, 1982).

Para a avaliação da produção de NO<sup>•</sup> os macrófagos isolados da cavidade peritoneal foram plaqueados na densidade de  $5 \times 10^5$  células por poço em placas de cultura de 96 poços; a monocamada de células aderentes foi inubada com diferentes concentrações das xiloglucanas modificadas e não modificadas dissolvidas em meio nas concentrações 10, 25 e 50 µg/mL. Como controle positivo da ativação da produção de NO<sup>•</sup> foi utilizado lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli* (0110:B4 – SIGMA) na concentração de 100 ng/mL.

Os macrófagos foram incubados na presença das xiloglucanas por 48 h a 37 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, 100 µL do sobrenadante foi transferido para outra placa de 96 poços onde 100 µL do reagente de Griess foram adicionados. Após a incubação por 10 min, a absorbância foi medida em 550 nm, em leitor de microplacas Bio-RAD modelo Benchmark, utilizando como branco meio mais o reativo de Griess. As concentrações de nitrito foram determinadas utilizando uma curva padrão de NaNO<sub>2</sub> (10 – 100 µg/mL) e os resultados foram expressos em µmol/  $5 \times 10^5$  células.

#### 4.19 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE IL-1BETA, IL-6 E TNF- ALFA

Os níveis de IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  produzidos por macrófagos na presença de xiloglucanas modificadas e não modificadas foram dosados utilizando-se kits, fabricados pela empresa eBioscience, baseados na metodologia ELISA (“enzyme immunoassay”). Cada kit era composto por duas placas de 96 poços, anticorpo de captura (anticorpos anti-IL-1 $\beta$ , anti-IL-6 ou anti-TNF- $\alpha$  de camundongos), anticorpo de detecção (anticorpos anti-IL-1 $\beta$ , anti-IL-6 ou anti-TNF- $\alpha$  de camundongo biotinilado), diluente, enzima de detecção (estreptavidina-HRP), tampão, solução de substrato (tetrametilbenzidina) e padrão correspondente para cada kit (IL-1 $\beta$ , IL-6 ou TNF- $\alpha$  recombinante murino). Foram utilizados para lavagem, solução de TWEEN 20 a 0,05% e como solução de parada, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N.

Em placas de 24 poços, 1 x 10<sup>6</sup> células/poço foram aderidas como descrito no item 4.15. A seguir, as células foram incubadas por 24 h com 1 mL de soluções de xiloglucanas modificadas e não modificadas diluídas em meio MEM, nas concentrações de 10, 25 e 50  $\mu$ g/mL. Após incubação, o sobrenadante foi centrifugado e aliqotado (300  $\mu$ L) em tubos de eppendorf estéreis devidamente identificados e armazenados em freezer à -70°C até a utilização. Foram realizados dois experimentos independentes para cada dosagem, cada um em duplicata.

Utilizou-se o protocolo do fabricante para a dosagem das citocinas. As placas foram inicialmente sensibilizadas com anticorpo de captura (anticorpos anti-IL-1 $\beta$ , anti-IL-6 ou anti-TNF- $\alpha$  de camundongos) (100  $\mu$ L) e mantidas a 4°C por 15 h. Após sucessivas lavagens, adicionou-se 100  $\mu$ L do padrão ou da amostra em cada poço. Para realização da curva padrão foi utilizado quatro concentrações de padrão (IL-1 $\beta$ , IL-6 ou TNF- $\alpha$  recombinante murino) (10 – 500 pg/mL) e um branco (PBS). Após 2 h de incubação à temperatura ambiente, o sobrenadante foi removido, a placa foi lavada 3 vezes com tampão específico e foi adicionado 100  $\mu$ L de anticorpo de detecção (anticorpos anti-IL-1 $\beta$ , anti-IL-6 e anti-TNF- $\alpha$  de camundongo biotinilado).

Posteriormente, a placa foi incubada por 1h a temperatura ambiente, lavada 5 vezes e 100  $\mu$ L de solução de estreptoavidina-HRP conjugada foram adicionados em cada poço. Após 30 min a temperatura ambiente, 100  $\mu$ L de solução de substrato contendo tetrametilbenzidina foram adicionados aos poços para o desenvolvimento da cor, após 15 min, 100  $\mu$ L de solução de parada foi adicionada e a densidade óptica foi determinada em 450 nm usando um leitor de microplacas. Os resultados foram expressos como produção da citocina em  $\text{pMol}/1 \times 10^6$  células.

#### 4.20 CAPACIDADE FAGOCÍTICA DE MACRÓFAGOS

Para avaliar a capacidade fagocítica, foram utilizadas leveduras obtidas a partir de fermento biológico, as quais foram submetidas a 3 lavagens consecutivas em PBS estéril, pH 7,4 e mantidas a 4°C até utilização. Macrófagos peritoneais foram plaqueados a  $5 \times 10^5$  células/poço em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro estéreis. Após a aderência, o meio foi removido e as células foram lavadas com solução de PBS. Posteriormente, adicionaram-se os polissacarídeos diluídos em meio, nas concentrações de 10, 25 e 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e as placas foram incubadas por 48 h a 37°C em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ . Após a incubação, o sobrenadante foi descartado, as placas contendo as lamínulas com as monocamadas de macrófagos foram lavadas 2 vezes com PBS, posteriormente adicionaram-se 10 leveduras para cada macrófago. Após 1 h de incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS, para retirada das leveduras não fagocitadas e as lamínulas processadas para microscopia óptica. Primeiramente, as células foram fixadas com solução de Bouin (30 mL de solução saturada de ácido pícrico, 10 mL de formaldeído e 2 mL ácido acético glacial) por 5 min, lavadas 2 vezes com álcool 70% e mais 2 vezes com água destilada. As lamínulas foram então coradas com Giemsa por 1h e montadas com Entellan. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico (BEL Photonics) e os resultados foram expressos como o número de leveduras fagocitadas por macrófagos.

#### 4.21 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos testes de atividade biológica *in vitro* foram submetidos à análise de variância ANOVA (fator duplo ou fator único) e teste de Tukey, para comparação das médias. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão (média  $\pm$  EP) de no mínimo três experimentos, cada um em triplicata. Foram considerados estatisticamente significativos os valores comparados ao nível de significância de  $p \leq 0,01$ ; 0,02 ou 0,05.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS XILOGLUCANAS DE RESERVA DE SEMENTES DE *H. courbaril*, *C. langsdorffii* E *T. indica*

As frações XGJ, XGC e XGT, obtidas com 1h de extração, apresentaram rendimentos semelhantes, correspondendo a aproximadamente 15% dos cotilédones deslipidificados (Tabela 1). Resultado similar foi anteriormente observado para XGJ (ROSÁRIO *et al.*, 2008). Todas as frações foram analisadas quanto ao teor de açúcar total, proteína e composição monossacarídica, e os resultados estão mostrados na Tabela 1. As frações obtidas apresentaram alta porcentagem de carboidratos e teores de proteínas inferiores a 4%. Utilizando as mesmas condições de extração, Kai e Petkowicz (2010) observaram a mesma quantidade de proteína na fração obtida das sementes de *H. courbaril*. Neste estudo os autores relataram a influência do tempo de extração nas propriedades das xiloglucanas e constataram que, quanto maior o tempo de extração, maior a contaminação por proteínas (KAI; PETKOWICZ; 2010).

A análise da composição monossacarídica das frações obtidas mostraram a presença de glucose como componente majoritário, seguido de xilose e galactose, confirmando a presença de xiloglucanas. Pequenas quantidades de arabinose também foram observadas. A presença deste monossacarídeo em frações polissacarídica contendo xiloglucana de reserva é bastante comum (LIMA *et al.*, 1993; LIMA *et al.*, 1995; ONWELUZO, RAMESH, THARANATHAN, 2002; FREITAS *et al.*, 2005; JO *et al.*, 2009; KAI, PETKOWICZ, 2010).

TABELA 1 – RENDIMENTO, CONTEÚDO DE AÇÚCAR TOTAL E PROTEÍNAS E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DAS SEMENTES DE *H. courbaril*, *C. langsdorffii* E *T. indica*

Frações	Rendimento (%) <sup>a</sup>	Açúcar total (%) <sup>b</sup>	Proteína (%) <sup>c</sup>	Composição monossacarídica <sup>d</sup> (%)			
				Ara	Xyl	Gal	Glc
XGJ	15,9	96,8	2,7	2,3	34,3	13,3	50,1
XGC	15,2	91,4	3,5	3,7	29,5	19,5	47,4
XGT	14,0	99,5	0,0	2,0	33,6	13,8	50,4

FONTE: O autor (2010).

(a): em relação às sementes deslipidificadas.

(b): Método de Dubois *et al.*, (1956)

(c): Método de Hartree (1972)

(d): Açúcares neutros analisados por GLC, na forma de acetatos de alditóis.

A fração XGJ, proveniente das sementes de *H. courbaril* apresentou a razão de Glc: Xyl: Gal de 3,8: 2,6: 1,0, reproduzindo o resultado obtido anteriormente por Rosário *et al.*, (2008). Proporções semelhantes foram determinadas por Lima *et al.*, (1993) (3,6: 2,6: 1,0), Buckeridge *et al.*, (1997) (3,3: 2,8: 1,0) e Kai e Petkowicz (2010) (3,9: 3,0: 1,0) para xiloglucana isolada da mesma espécie. Para a xiloglucana obtida das sementes de *C. langsdorffii* (XGC), foi obtida proporção de Glc: Xyl: Gal de 2,4: 1,5: 1,0, resultado este, igual ao relatado na literatura (ROSÁRIO *et al.*, 2008). Resultado similar também foi descrito por Buckeridge *et al.*, (1992), que caracterizaram estruturalmente as xiloglucanas de *C. langsdorffii* e obtiveram uma proporção Glc: Xyl: Gal de 2,7: 1,9: 1,0 e 2,4: 1,6: 1,0, dependendo da procedência das sementes. No estudo realizado por Jo *et al.* (2009), a composição monossacarídica para XGC apresentou maior quantidade de unidades de xilose, resultando na proporção de Glc: Xyl: Gal de 2,4: 2,1: 1.

XGT apresentou composição monossacarídica característica de xiloglucana, com proporção dos componentes majoritários de Glc: Xyl: Gal de 3,6: 2,4: 1,0. Na análise feita por Freitas *et al.*, (2005) a proporção obtida (Glc: Xyl: Gal de 1,7: 1,6: 1,0) apresenta quantidade inferior de glucose, entretanto, isto pode ser consequência de uma hidrólise ácida incompleta do polissacarídeo. O resultado obtido difere do que foi anteriormente descrito na literatura, os quais mostraram uma razão similar à obtida para xiloglucana de sementes de *C. langsdorffii* (BUCKERIDGE *et al.*, 1992; JO *et al.* 2009).

As xiloglucanas foram analisadas quanto à homogeneidade e massa molar por HPSEC-MALLS/RI (Figura 16). Todos os polissacarídeos analisados apresentaram perfis de eluição homogêneos. Foram determinados os valores de  $dn/dc$  para os

polissacarídeos e foi obtido para XGC o valor de 0,109 mL/g, para XGJ 0,129 mL/g e XGT apresentou um valor de 0,132 mL/g. A partir dos valores de  $dn/dc$  e dos perfis de eluição foram determinados os valores de massa molar ponderal média ( $M_w$ ). Os valores de  $M_w$  encontrados para os polissacarídeos XGC, XGJ e XGT foram  $9,6 \times 10^5$ ,  $9,1 \times 10^5$  e  $7,3 \times 10^5$  g/mol respectivamente.

Os valores de  $M_w$  obtidos para os polissacarídeos são similares aquele determinado por Kai e Petkowicz (2010), quando se compara com a xiloglucana obtida de *H. courbaril* utilizando o mesmo tempo de extração ( $9,4 \times 10^5$  g/mol). Neste trabalho, os autores sugerem que, quanto menor o tempo utilizado para extração deste polissacarídeo, menor o valor para  $M_w$ , indicando que, nestas condições, as xiloglucanas estão menos susceptíveis a formação de agregados moleculares (KAI, PETKOWICZ, 2010). Para minimizar a agregação dos polissacarídeos em solução aquosa, Freitas *et al.*, (2005) demonstraram que, alterações nas condições de preparo das soluções de xiloglucana de *H. courbaril*, tais como um aquecimento a 85°C seguido de resfriamento, resultavam em drástica redução nos valores de  $M_w$ , de  $1,5 \times 10^6$  para  $8,7 \times 10^5$  g/mol. Yuguchi; Hirotsu e Hosokawa (2005) obtiveram resultados semelhantes de  $M_w$ , de  $8,65 \times 10^5$  para xiloglucanas de *T. indica* de origem comercial.

As xiloglucanas de *C. langsdorffii*, *H. courbaril* e *T. indica* foram analisadas por ressonância magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$ . As análises de RMN de  $^{13}\text{C}$  confirmaram a presença de xiloglucanas nas frações XGC, XGJ e XGT. A Figura 15 é uma representação esquemática de um oligossacarídeo de xiloglucana. Na parte superior desta figura as indicações das letras “a”, “b” e “c” referenciam a posição do monossacarídeo que foi utilizado para atribuição dos sinais, que estão indicados na Tabela 2. Os espectros obtidos foram similares entre si e podem ser observados nas Figuras 16A, 17A e 18A e a atribuição dos sinais da região anomérica e de carbonos do tipo  $-\text{CH}_2$  de cada polímero estão indicados na Tabela 2. Os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  das xiloglucanas XGC, XGJ e XGT apresentam três sinais na região de carbono anomérico ( $\delta$  110 - 90).

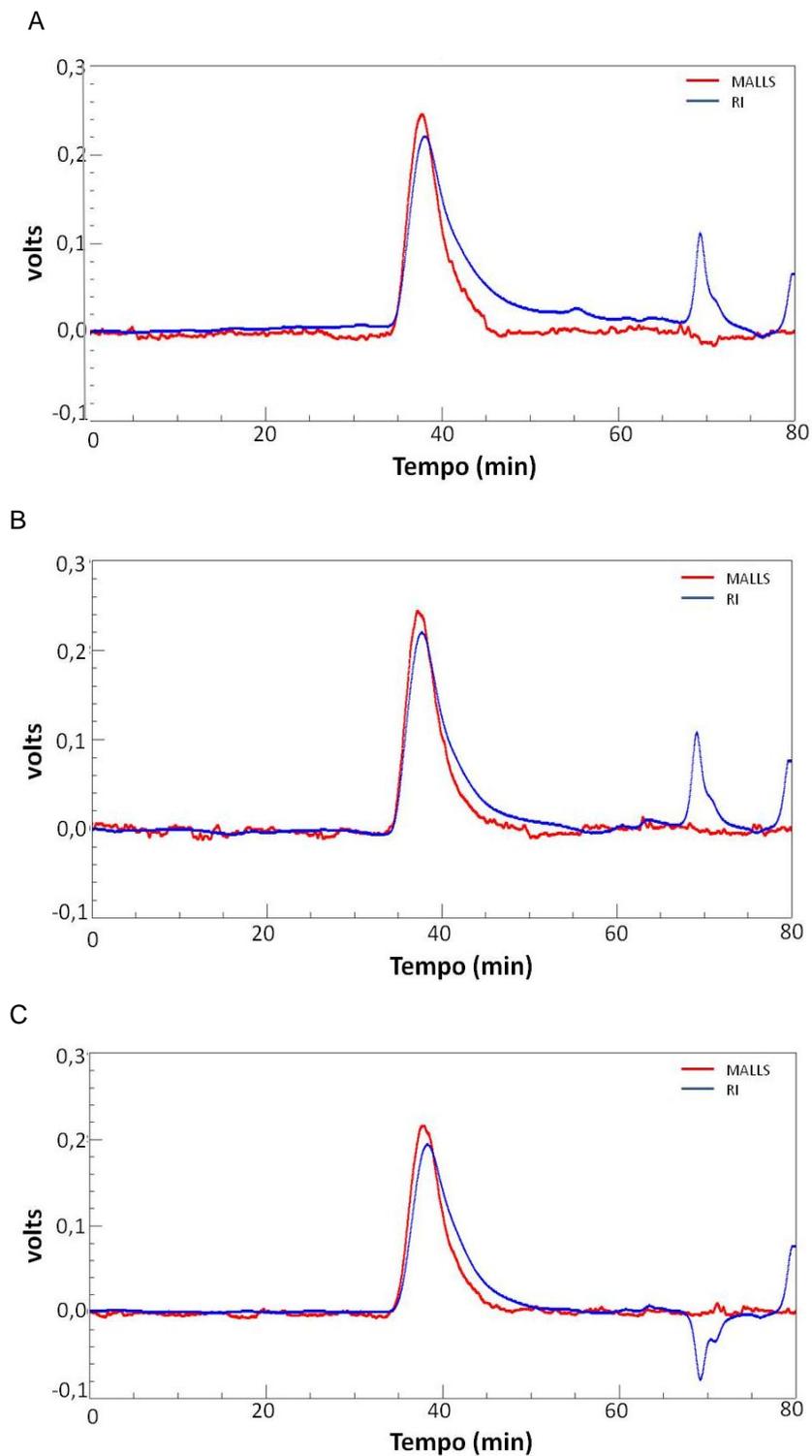


FIGURA 16 – PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC-MALLS/RI PARA AS XILOGLUCANAS OBTIDAS DAS SEMENTES DE (A) *C. langsdorffii* (XGC), (B) *H. courbaril* (XGJ) E (C) *T. indica* (XGT)

FONTE: O autor (2010).

NOTA: RI- detector diferencial de índice de refração indicado em azul; MALLS- detector de espalhamento de luz laser em multiângulos-ângulo, 90° indicado em vermelho (fase móvel:  $\text{NaNO}_2$  0,1M e 200 ppm  $\text{NaN}_3$ ; fluxo: 0,6 mL/min).

Os sinais em aproximadamente  $\delta$  104, 102 e 98 referem-se às unidades  $\beta$ -D-Galp;  $\beta$ -D-Glcp e  $\alpha$ -D-Xylp, respectivamente (YORK *et al.*, 1993; LIMA *et al.*, 1995; FREITAS, 2000; BUSATO; VARGAS-RECHIA; REICHER, 2001; SUMATHI; RAY 2002). Na região de  $\delta$  67-61 dos espectros das xiloglucanas, os sinais em aproximadamente,  $\delta$  66,4 e  $\delta$  66,8 puderam ser atribuídos ao C-6 de unidades de  $\beta$ -D-Glcp substituídas e em  $\delta$  60,3 para C-6 de unidades de  $\beta$ -D-Galp livres. A partir dos dados da literatura, os sinais em  $\delta$  61,1, 61,3, e 61,6 podem ser atribuídos ao C-5 de  $\alpha$ -D-Xylp, nas posições b, c e a, as quais estão representadas e indicadas na Figura 17 (YORK *et al.*, 1993; LIMA *et al.*, 1995; FREITAS, 2000; BUSATO; VARGAS-RECHIA; REICHER, 2001).

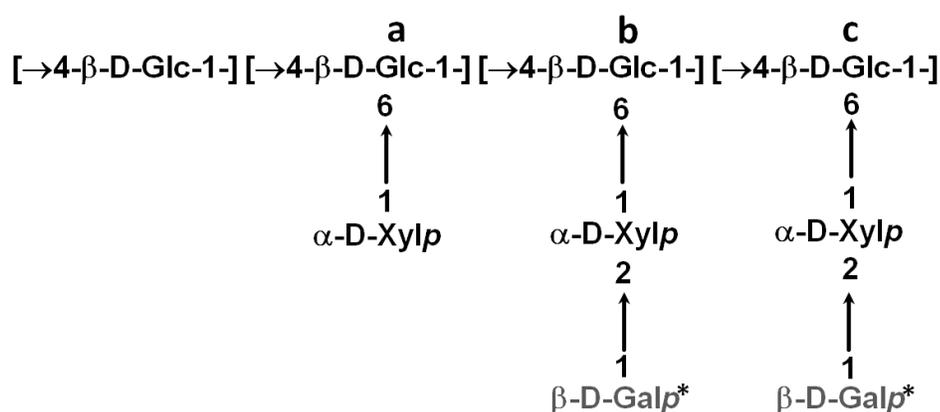


FIGURA 17 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DE UM OLIGOSSACARÍDEO DE XILOGLUCANA.

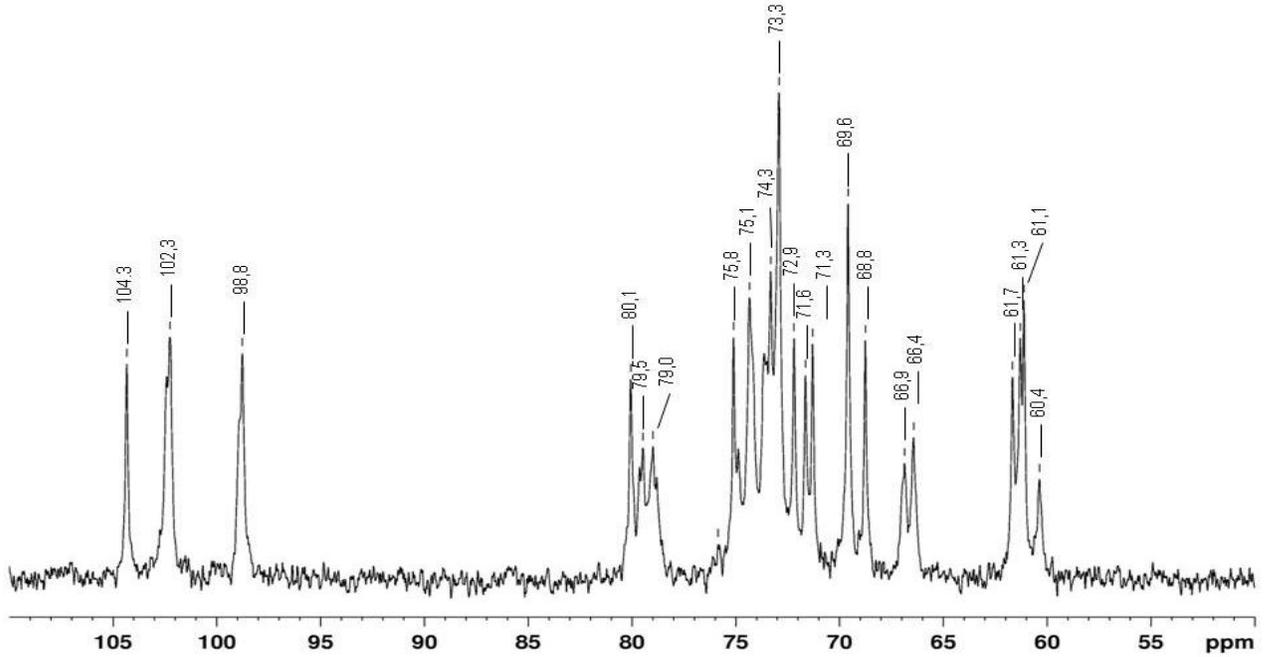
FONTE: O autor 2010

TABELA 2 – ATRIBUIÇÃO DOS SINAIS DO ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C PARA AS XILOGLUCANAS DE *H. courbaril*, *C. langsdorffii* E *T. indica*.

Monossacarídeo	$\delta$ (ppm)					
	C-1			-CH <sub>2</sub>		
	XGC	XGJ	XGT	XGC	XGJ	XGT
$\beta$ -Glc <sub>p</sub> <sup>a</sup>	102,26	102,29	102,28	66,44	66,43	66,45
$\beta$ -Glc <sub>p</sub> <sup>b</sup>	102,26	102,29	102,28	66,87	66,85	66,94
$\alpha$ -Xyl <sub>p</sub> <sup>a</sup>	98,78	98,90	98,85	61,67	61,65	61,69
$\alpha$ -Xyl <sub>p</sub> <sup>b</sup>	98,78	98,90	98,85	61,12	61,11	61,16
$\alpha$ -Xyl <sub>p</sub> <sup>b</sup>	98,78	98,90	98,85	61,29	61,30	61,34
$\beta$ -Gal <sub>p</sub>	104,34	104,34	104,35	60,37	60,32	60,41

FONTE: O autor (2010).

A



B

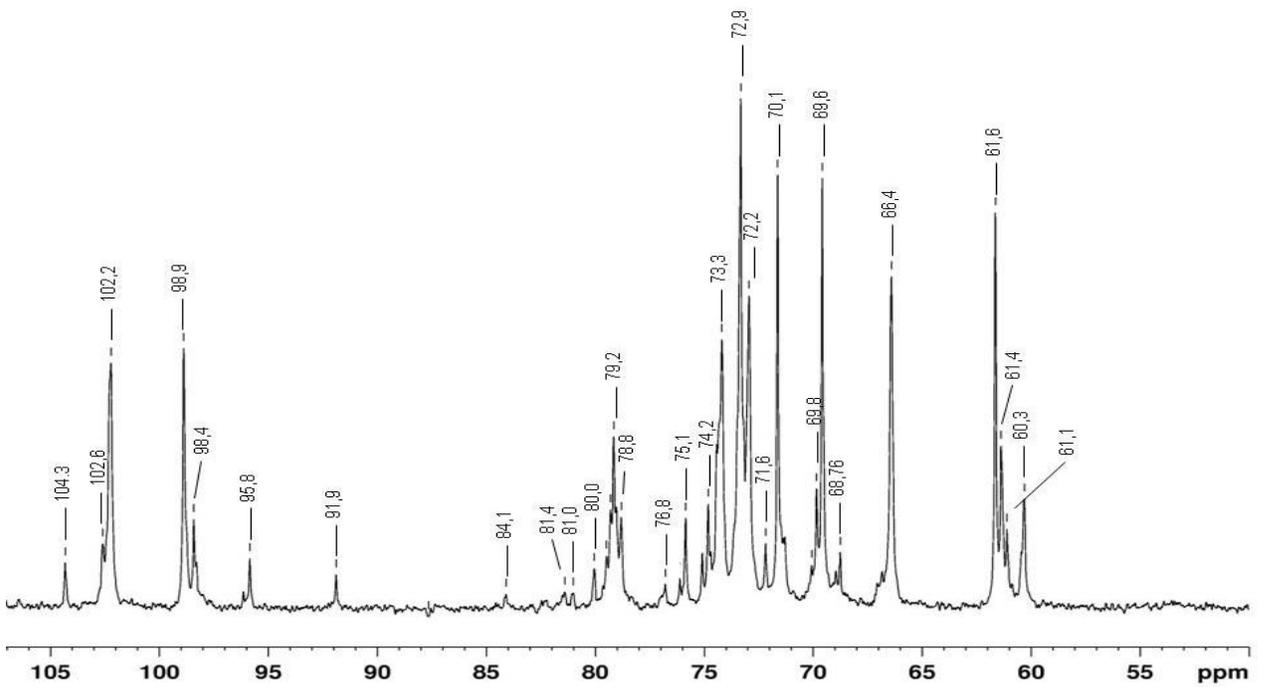
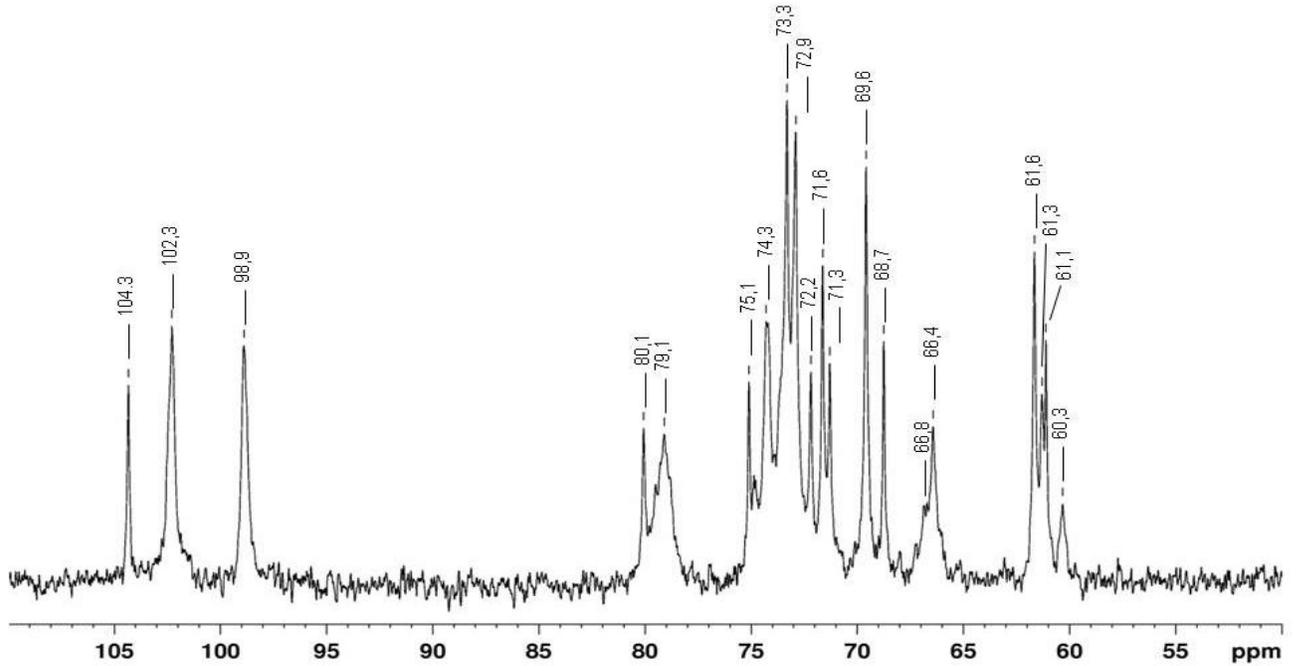


FIGURA 18 – ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DAS XILOGLUCANAS OBTIDAS DE SEMENTES DE *C. langsdorffii* SOLUBILIZADAS EM  $\text{D}_2\text{O}$  E ANALISADAS A  $70^\circ\text{C}$  (A) XILOGLUCANA NATIVA E (B) XILOGLUCANA MODIFICADA.

FONTE: O autor (2010)

A



B

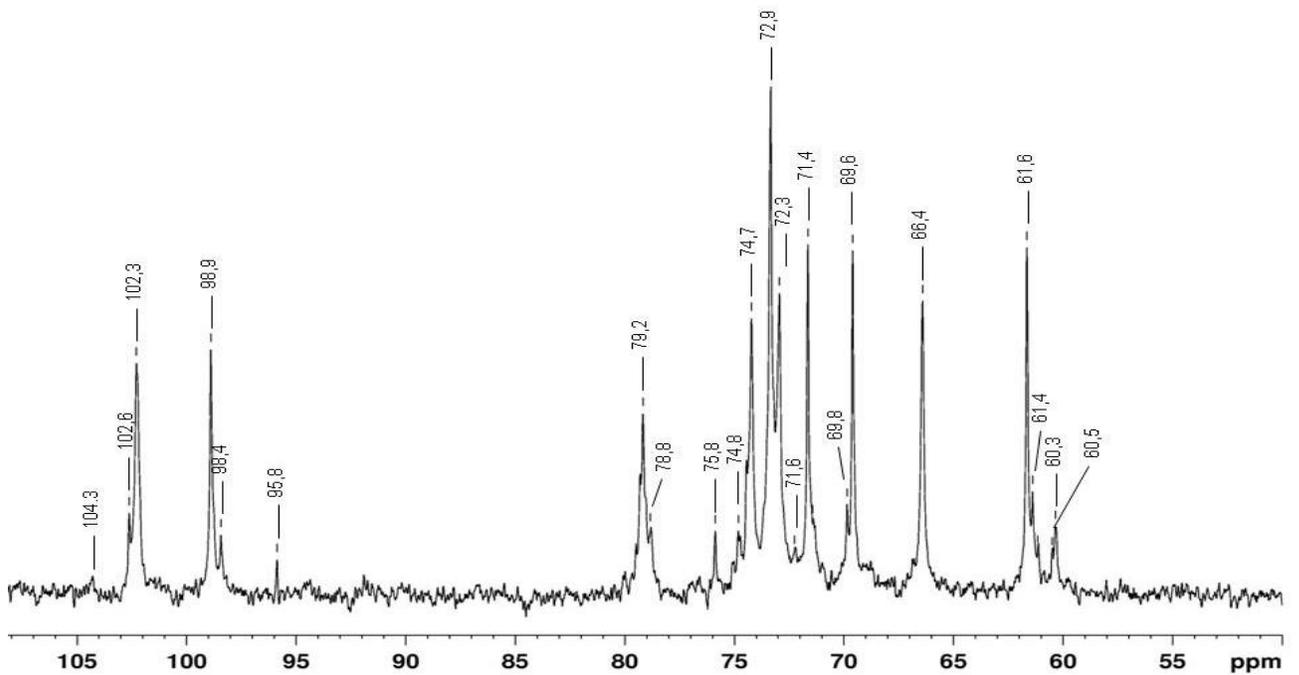
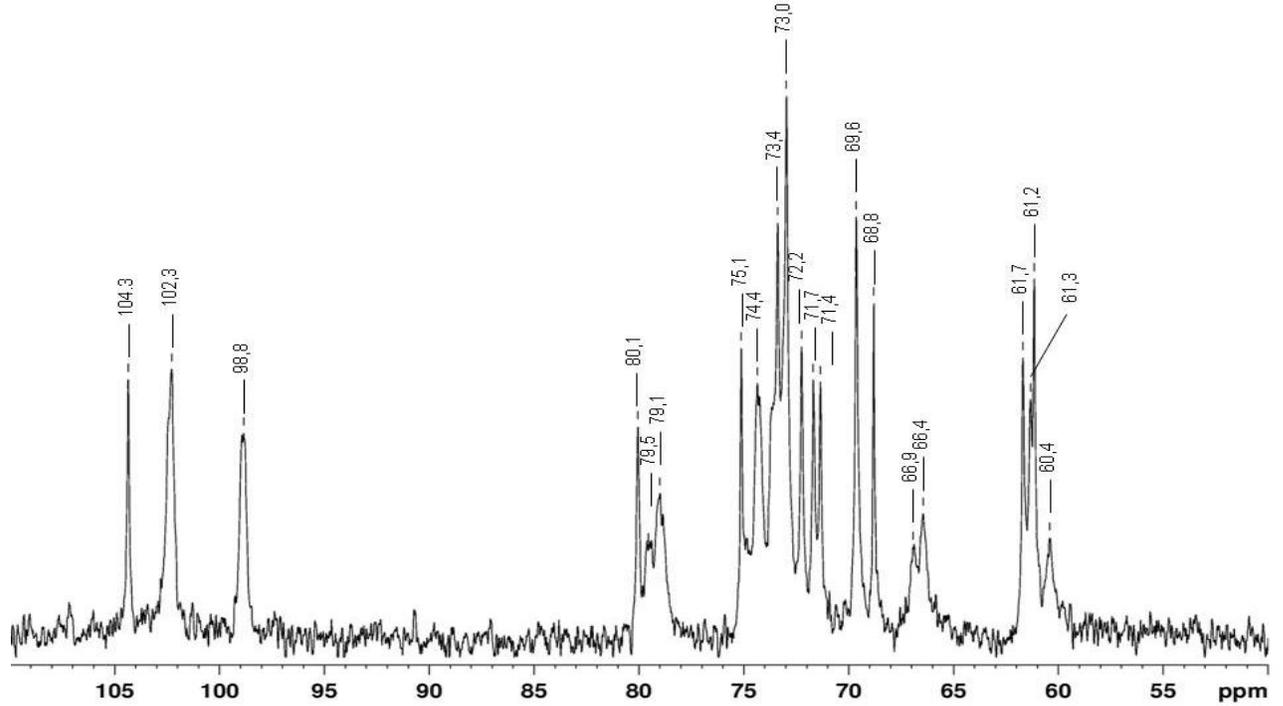


FIGURA 19 – ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DAS XILOGLUCANAS OBTIDAS DE SEMENTES DE *H. courbaril* SOLUBILIZADAS EM  $\text{D}_2\text{O}$  E ANALISADAS A  $70^\circ\text{C}$  (A) XILOGLUCANA NATIVA E (B) XILOGLUCANA MODIFICADA.

FONTE: O autor (2010)

A



B

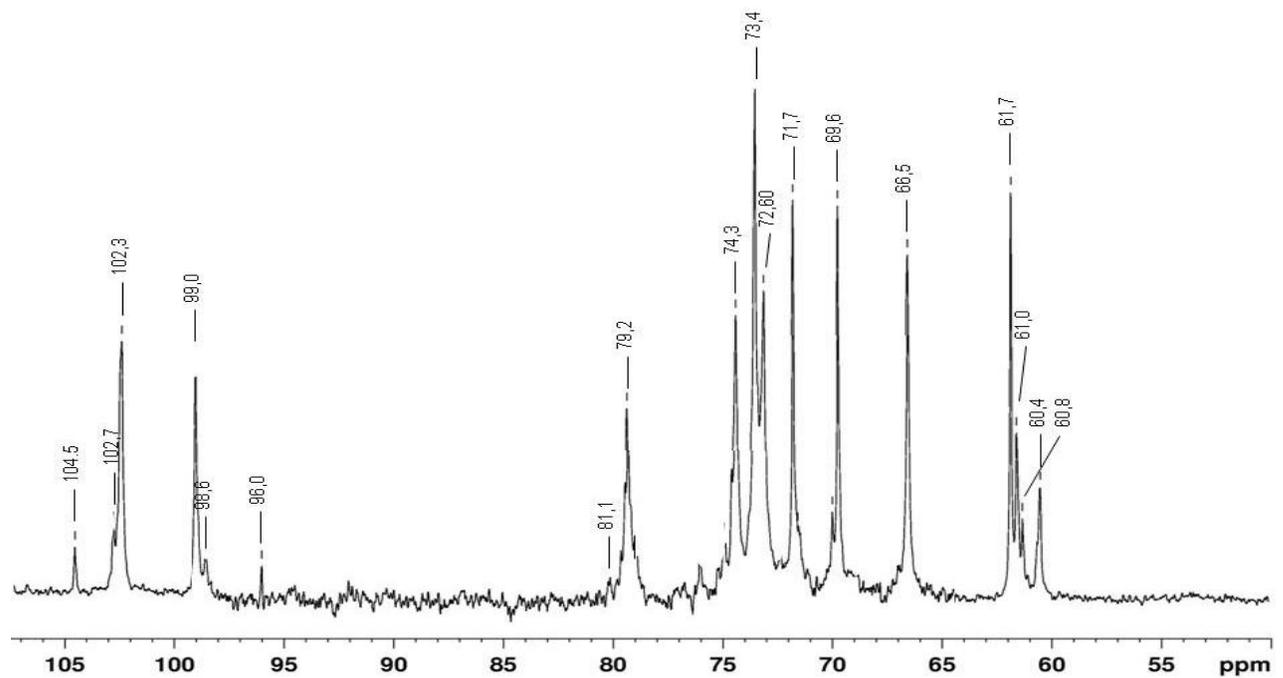


FIGURA 20 – ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DAS XILOGLUCANAS OBTIDAS DE SEMENTES DE *T. indica* SOLUBILIZADAS EM  $\text{D}_2\text{O}$  E ANALISADAS A  $70^\circ\text{C}$  (A) XILOGLUCANA NATIVA E (B) XILOGLUCANA MODIFICADA

FONTE: O autor (2010)

Parte das xiloglucanas XGC, XGJ e XGT foram submetidas à modificação enzimática para remoção das unidades de galactose e também foram reservadas para a utilização nos experimentos de atividade biológica em macrófagos peritoneais de camudongo.

## 5.2 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS XILOGLUCANAS DESGALACTOSILADAS

Muitos estudos têm sido realizados com a utilização de xiloglucanas parcialmente degradadas como veículos para liberação controlada de fármacos, com diversas formas de administração (MIYAZAKI *et al.*, 1998; SUISHA *et al.*, 1998; KAWASAKI *et al.*, 1999; MIYAZAKI *et al.*, 2001; TAKAHASHI *et al.*, 2002). Nestes trabalhos, estes polissacarídeos foram modificados através da remoção de unidades de galactose, o que resultou em um polímero com propriedades geleificantes satisfatórias para a sua aplicação farmacológica. Entretanto, os efeitos biológicos destas xiloglucanas desgalactosiladas não foram reportados na literatura.

Com o intuito de realizar modificações nas xiloglucanas de reserva para avaliar a influência destas alterações no perfil de atividade biológica usando macrófagos peritoneais de camundongo, as frações nativas XGC, XGJ e XGT foram submetidas a um processo de desgalactosilação, com a enzima  $\beta$ -galactosidase, as quais foram denominadas, respectivamente, XGCd, XGJd e XGTd, onde “d” refere-se ao material desgalactosilado. As xiloglucanas modificadas foram analisadas quanto ao rendimento, teor de açúcar total, proteína e composição monossacarídica (Tabela 3).

A partir dos dados da Tabela 3 pode-se observar que as frações modificadas permaneceram com alto teor de carboidratos totais e baixos valores de proteína. Conforme esperado, ao analisar a composição monossacarídica, os polissacarídeos obtidos a partir do tratamento enzimático apresentaram redução na quantidade de unidades de galactose em relação aos polímeros nativos, em aproximadamente 70%, 76% e 60% para as frações XGJd, XGCd e XGTd, respectivamente. A utilização do protocolo modificado, no qual se utilizou uma quantidade superior de enzima mostrou-

se satisfatório. De acordo com a literatura, a utilização do método proposto por SHIRAKAWA, YAMATOYA, NISHINARI (1998), promove a remoção 35–40% de unidades de D-galactose, resultado este inferior ao obtido para os polissacarídeos XGJd, XGCd e XGTd utilizando o protocolo proposto por Busato *et al.* (2009).

TABELA 3 – RENDIMENTO, CONTEÚDO DE CARBOIDRATOS E PROTEÍNAS E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS XILOGLUCANAS DE *H. courbaril*, *C. langsdorffii* E *T. indica* APÓS TRATAMENTO COM  $\beta$ -GALACTOSIDASE.

Frações	Rendimento (%) <sup>a</sup>	Açúcar total (%) <sup>b</sup>	Proteína (%) <sup>c</sup>	Composição Monossacarídica <sup>d</sup>			
				Ara	Xyl	Gal	Glc
XGJd	57,1	98,5	1,2	1,4	42,6	2,9	52,8
XGCd	55,9	90,2	4,2	2,2	43,3	4,7	49,3
XGTd	59,0	94,5	3,9	2,3	40,4	5,5	51,9

FONTE: O autor (2010).

(a): em relação ao polissacarídeo nativo.

(b): Método de DUBOIS *et al.*, (1956)

(c): Método de HARTREE (1972)

(d): Açúcares neutros analisados por GLC, na forma de acetatos de alditóis.

As análises de ressonância magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  para as frações XGCd, XGJd e XGTd corroboram com os resultados obtidos na composição monossacarídica. Pode-se comparar o efeito da remoção das unidades de galactose nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$ , os quais estão demonstrados na Figura 16B, 17B e 18B. Na região de carbono anomérico, a redução na intensidade dos sinais em  $\delta$  104,3 confirma a remoção de unidades de  $\beta$ -D-Galp nas frações XGCd, XGJd e XGTd. De acordo com a literatura (YORK *et al.*, 1996), pode-se atribuir os sinais em  $\delta$  102,6 para o C-1 de unidades de  $\beta$ -D-Glcp substituídas em O-6 por unidades de  $\alpha$ -D-Xylp não substituídas das xiloglucanas desgalactosiladas de *C. langsdorffii*, *H. courbaril* e *T. indica*. O aparecimento dos sinais em  $\delta$  99,4,  $\delta$  99,4 e  $\delta$  99,6, para os polissacarídeos XGCd, XGJd e XGTd, respectivamente, provavelmente se referem ao C-1 de terminais não redutores de  $\alpha$ -D-Xylp.

Pode-se observar que os sinais atribuídos para os C-5 unidades de  $\alpha$ -D-Xylp apresentaram intensidades reduzidas nos espectros de XGCd, XGJd e XGTd, quando comparado com os das xiloglucanas nativas. Pode-se observar para os polissacarídeos desgalactosilados a diminuição da intensidade dos sinais em  $\delta$  61,1, os quais se

referem às unidades de xilose substituídas por galactose, bem com, o aumento da intensidade do sinal em  $\delta$  61,7, sendo este atribuído as unidades de xilose que estão presentes como terminais não redutores (BUSATO, 2004).

### 5.3 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA XILOGLUCANA ESTRUTURAL DAS FOLHAS DE *C. langsdorffii*

Após a obtenção das xiloglucanas de reserva nativas e modificadas das sementes de *C. langsdorffii*, *H. courbaril* e *T. indica*, partiu-se para o isolamento de xiloglucana estrutural das folhas de *C. langsdorffii* para avaliar efeito deste polímero na resposta biológica de macrófagos peritoneais quanto a produção de NO<sup>•</sup>.

Conforme já ilustrado no fluxograma (página 60), após a remoção de pigmentos, lipídeos e lignina, as folhas selecionadas foram submetidas a uma extração aquosa, fornecendo a fração FC1 e a extrações alcalinas sequenciais (KOH 1M e KOH 4M) obtendo-se as frações de hemicelulose A (FCHA1, FCHA2, FCHA3, FCHA4, FCHA5 e FCHA6) e hemicelulose B (FCHB1, FCHB2, FCHB3, FCHB4, FCHB5 e FCHB6).

Como já foi relatado na literatura, xiloglucanas fucosiladas podem ser obtidas da parede celular vegetal a partir da purificação das frações de hemicelulose B extraídas com KOH 4M (FRY, 1989; VIERHUIS *et al.*, 2001; BUSATO; VARGAS-RECHIA; REICHER, 2001). Para garantir que o sobrenadante, referente à fração FCHB4, não apresentasse hemicelulose A em suspensão, o material foi submetido à centrifugação e filtração em membrana de 0,45  $\mu$ m. Após a redução de volume, o sobrenadante foi precipitado com etanol, ressuspendido em água destilada, dialisado e liofilizado.

Ao avaliar a composição monossacarídica (Tabela 4) das frações correspondentes as hemiceluloses observaram-se a presença de glucose, xilose, galactose e fucose, sugerindo a ocorrência de xiloglucanas em diferentes frações. A fração de hemicelulose B, obtida na primeira extração com KOH 4M (FCHB4) foi escolhida para isolamento da xiloglucana estrutural, devido ao seu rendimento de 2,6%

e por apresentar maior proporção de Glc, Xyl, Gal e Fuc, o que caracterizaria a presença de xiloglucanas provenientes de parede celular (HAYASHI, 1989, CARPITA; Mc CANN, 2000, BUSATO; VARGAS-RECHIA; REICHER, 2001). A presença de manose, arabinose, ácido urônico e elevados percentuais de xilose nesta fração sugerem a presença de outros polissacarídeos, além da xiloglucana. As extrações alcalinas que permitem a solubilização de xiloglucanas resultam também na extração de outros polissacarídeos como as arabinanas, arabinogalactanas, galacturonanas e xilanas ácida (CARPITA; McCANN, 2000, COSGROVE, 2005; SCHELLER; ULVSKOV; 2010).

TABELA 4 – RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DAS FOLHAS DE *C. langsdorffii*

Frações	Rendimento <sup>b</sup>	Composição Monossacarídica (%) <sup>a</sup>							
		Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	AU <sup>c</sup>
FC1	0,3	4,7	-	24,8	5,9	11,6	22,5	30,5	nd
FCHA1	4,1	3,0	-	18,0	40,4	10,9	12,0	15,8	nd
FCHB1	1,3	4,9	-	28,1	35,8	7,3	18,5	5,4	nd
FCHA2	3,6	0,6	-	10,7	54,7	12,7	9,3	12,0	nd
FCHB2	1,3	4,5	-	27,0	39,2	6,9	15,5	7,0	nd
FCHA3	1,6	1,7	-	10,0	63,2	5,5	5,1	14,5	nd
FCHB3	2,9	2,5	-	18,7	54,0	4,2	11,0	9,6	nd
FCHA4	3,0	1,1	-	4,3	85,6	3,3	2,8	2,8	nd
<b>FCHB4</b>	<b>2,6</b>	<b>1,0</b>	<b>2,7</b>	<b>17,4</b>	<b>36,0</b>	<b>3,4</b>	<b>12,0</b>	<b>17,5</b>	<b>10,0</b>
FCHA5	1,7	1,3	-	8,8	75,4	4,3	4,5	5,7	Nd
FCHB5	2,2	2,5	1,5	26,0	44,0	1,8	7,8	13,0	3,4
FCHA6	1,4	1,7	-	12,4	69,6	5,2	6,2	4,9	Nd
FCHB6	1,9	2,4	0,9	26,7	40,2	2,9	9,2	9,3	8,4

FONTE: O autor (2010)

(a): Açúcares neutros analisados por GLC, na forma de acetatos de alditóis.

(b) Em relação às folhas deslignificadas

(c): Dosagem colorimétrica (FILISETTI-COZZI; CARPITA, 1991)

nd: não determinado

AU: Ácido urônico

A fração FCHB4 foi analisada por HPSEC-MALLS/RI/UV. Um perfil de eluição multimodal foi obtido, como mostrado na Figura 21. O detector de espalhamento de luz apresenta um pico com um “ombro”, observado no tempo de eluição entre 35 a 45 min. O perfil de eluição obtido pelo índice de refração sugere a presença de três famílias de

polímeros. O detector de ultravioleta ( $\lambda$  280 nm) mostrou um pico pronunciado, no tempo de eluição entre 40 a 60 min, provavelmente devido à presença de proteína na amostra. Este resultado está de acordo com os dados de dosagem colorimétrica que indicaram que a amostra apresenta 9,8% de proteínas.

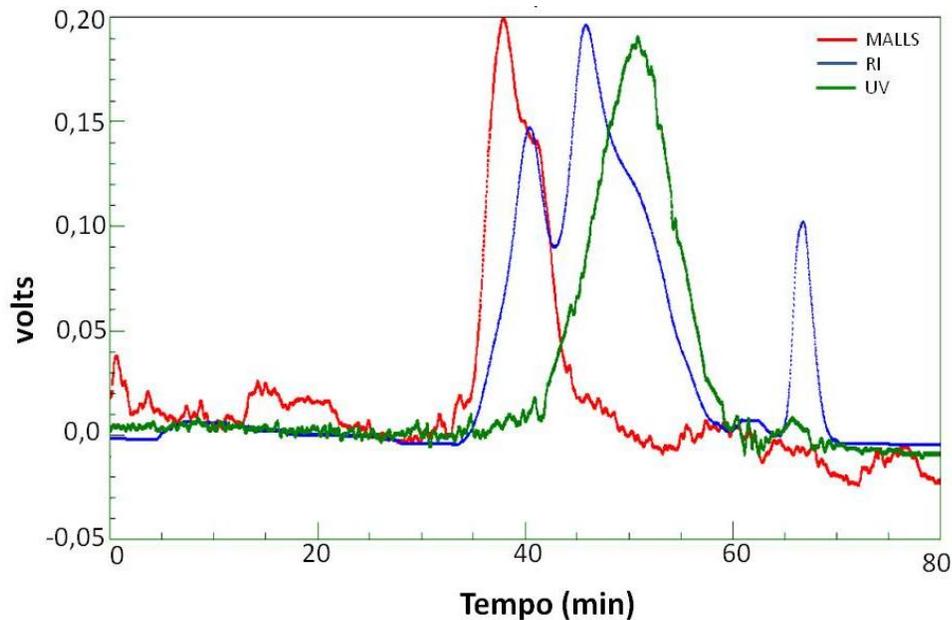


FIGURA 21– PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC-MALLS/RI/UV DA FRAÇÃO FCHB4 OBTIDA DAS FOLHAS DE *C. langsdorffii*

FONTE: O autor (2010)

NOTA: RI- detector diferencial de índice de refração indicado em azul; MALLS- detector de espalhamento de luz laser em multiângulos-ângulo, 90° indicado em vermelho; UV- detector de ultravioleta indicado em verde (fase móvel: NaNO<sub>2</sub> 0,1M e 200 ppm NaN<sub>3</sub>; fluxo: 0,6 mL/min).

Para purificação da xiloglucana estrutural a partir da fração FCHB4, utilizou-se o procedimento já ilustrado no fluxograma da Figura 14 (página 62).

A cromatografia de troca iônica é o processo de purificação mais usual para obtenção de xiloglucana estrutural (VINCKEN *et al.*, 1996; VIERHUIS *et al.*, 2001; BUSATO; VARGAS-RECHIA; REICHER, 2001; DING *et al.*, 2003, LI; SAKURAI; NEVINS, 2009). Para remoção de proteínas, pigmentos e polissacarídeos ácidos presentes na amostra, a fração FCHB4 foi submetida à cromatografia de troca iônica em gel de celulose de fraca troca iônica, DEAE-SEPHACEL (Pharmacia Biotech), que apresenta como grupo trocador o íon dietilaminoetil. A fração obtida por eluição com tampão foi denominada FCHB4DS e obteve-se rendimento de 38% em relação à fração

FCHB4. Posteriormente o gel foi eluído com uma solução de NaCl 4M para a remoção da fração ligada, denominada FCHB4NaCl, a qual apresentou rendimento de 58% em relação à fração FCHB4. As frações obtidas foram avaliadas quanto ao conteúdo de açúcar total e proteína e composição monossacarídica (Tabela 5).

A análise da composição monossacarídica da fração FCHB4DS indica que, o processo de troca iônica foi eficiente, pois esta fração apresentou aumento na proporção de glucose, xilose e fucose, quando comparada à fração nativa, enquanto que a fração eluída com NaCl 4M (FCHB4NaCl) apresentou maior conteúdo de unidades de arabinose e ácido urônico.

TABELA 5 – RENDIMENTO, CONTEÚDO DE CARBOIDRATOS, PROTEÍNAS E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS APÓS PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO FCHB4 OBTIDA DAS FOLHAS DE *C. langsdorffii*

Frações	Rendimento (%)	Açúcar total <sup>c</sup> %	Proteína <sup>d</sup> %	Composição Monossacarídica (%) <sup>a</sup>							
				Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	AU <sup>b</sup>
FCHB4	2,6 <sup>e</sup>	81,1	9,8	1,0	2,7	17,4	36,0	3,4	12,0	17,5	10,0
FCHB4DS	38,0 <sup>f</sup>	98,5	1,5	1,0	5,0	1,9	41,7	1,6	9,6	36,5	3,4
FCHB4NaCl	57,8 <sup>f</sup>	41,3	10,0	4,5	-	51,9	14,8	1,5	10,0	8,0	9,4
FCHB4DS2	33,0	Nd	Nd	tr	5,6	2,0	47,0	1,1	8,6	32,9	2,1
SFHB4	6,7 <sup>f</sup>	Nd	Nd	1,7	0,5	11,2	27,9	1,2	19,3	38,2	Nd
<b>PFHB4</b>	<b>16,7<sup>f</sup></b>	<b>98,0</b>	<b>1,0</b>	<b>-</b>	<b>4,6</b>	<b>1,3</b>	<b>34,2</b>	<b>2,0</b>	<b>13,5</b>	<b>44,3</b>	<b>Tr</b>

FONTE: O autor (2010).

(a): Açúcares neutros analisados por GLC, na forma de acetatos de alditóis.

(b): Dosagem colorimétrica (FILISSETTI-COZZI; CARPITA, 1991)

(c): Método de DUBOIS *et al.*, (1956)

(d): Método de HARTREE (1972)

(e): Em relação às folhas deslipidificadas

(f): Em relação à fração FCHB4

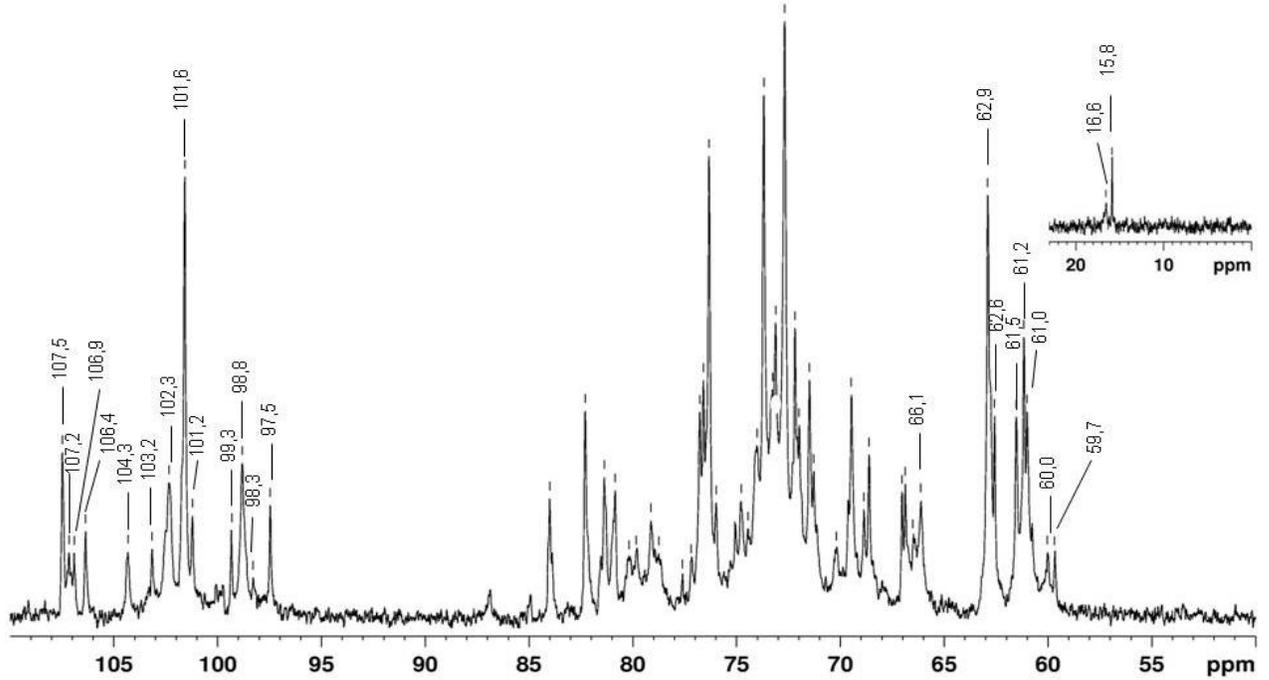
tr: traços

nd: não determinado

AU: Ácido urônico

No espectro de RMN de <sup>13</sup>C (Figura 22A), a fração FCHB4 apresenta sinais em δ 107,5-107,2 ppm, os quais podem ser atribuídos ao C-1 de unidades de arabinose furanosídicas (HÖIJE *et al.*, 2006). Entretanto, estes sinais não estão presentes na fração FCHB4DS, corroborando com resultado obtido na composição monossacarídica, no qual se verifica a redução de 89% do teor de arabinose da fração FCHB4 (17,4%) para fração FCHB4DS (1,9%).

A



B

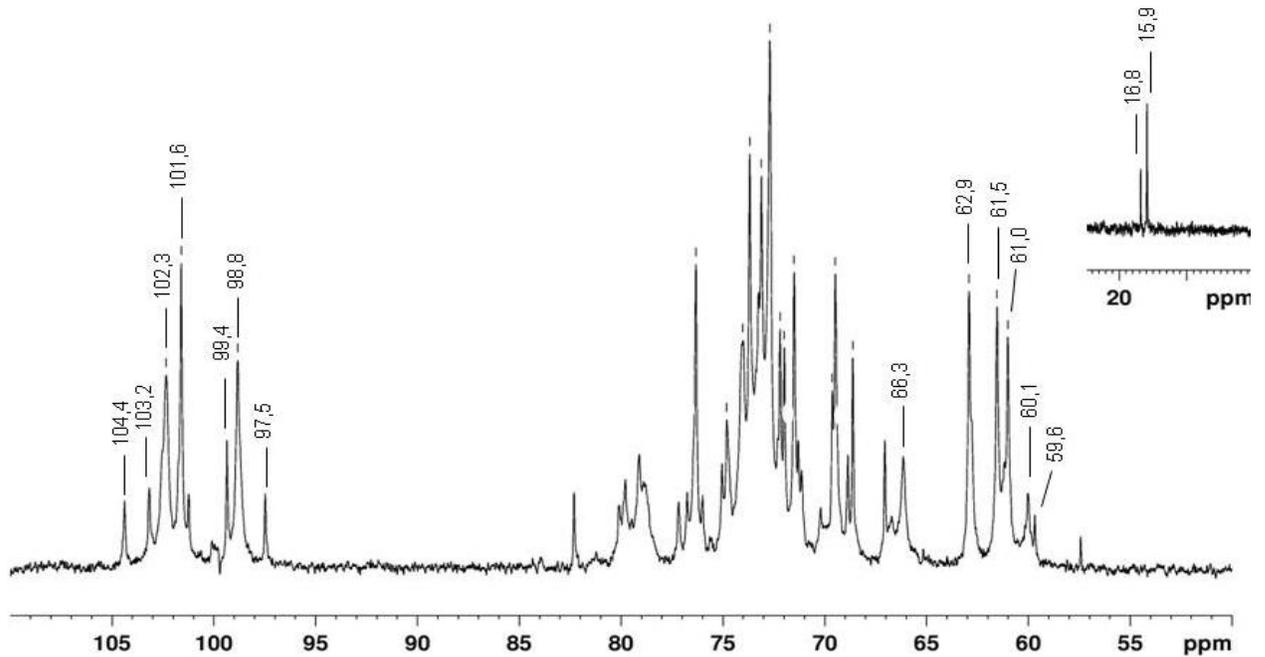


FIGURA 22 – ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DAS FRAÇÕES (A) FCHB4 E (B) FCHB4DS OBTIDAS DAS FOLHAS DE *C. langsdorffii* SOLUBILIZADAS EM  $\text{D}_2\text{O}$  E ANALIZADAS A  $70^\circ\text{C}$   
 FONTE: O AUTOR (2010)

Baseados na literatura foram atribuídos os sinais da região anomérica para fração FCHB4DS (Tabela 6), os quais se apresentaram característicos de uma xiloglucana estrutural (BUSATO; VARGAS-RECHIA; REICHER, 2001; KAI, 2009; PAREDES, 2009). Em campo alto pode-se atribuir sinais em  $\delta$  16,8 ppm e  $\delta$  15,9 ppm, para o grupo metil das unidades de ramnose e fucose respectivamente (Figura 22B).

TABELA 6 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS ( $\delta$ ) DA REGIÃO ANOMÉRICA DA XILOGLUCANA PRESENTE NA FRAÇÃO FCHB4DS E PFHB4 OBTIDAS DAS FOLHAS DE *C. langsdorffii*

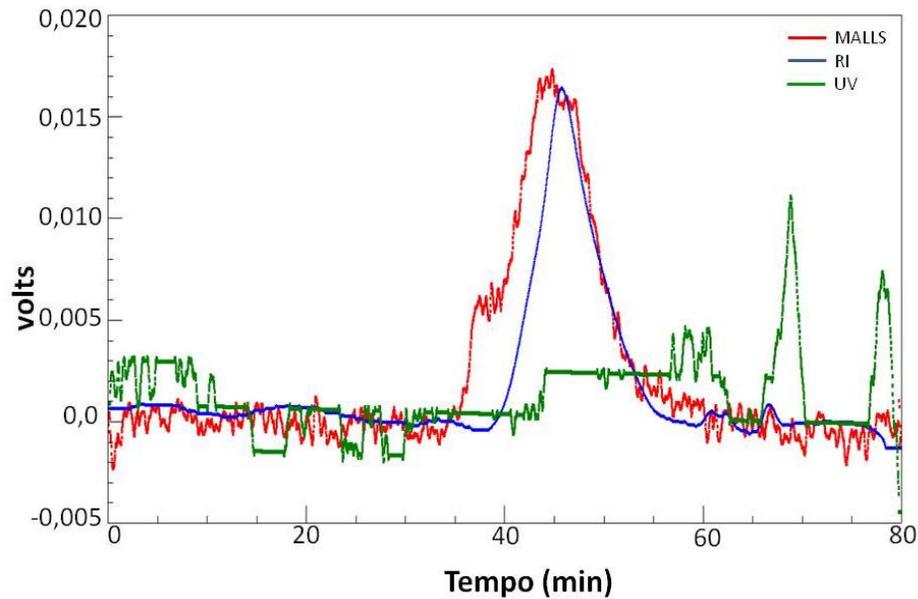
Unidade monossacarídica	$\delta$ (ppm)	
	FCHB4DS	PFHB4
$\beta$ -D-Galactose terminal	104,4	104,8
$\beta$ -D-Galactose substituída	103,2	103,2
$\beta$ -D-Glucose	102,3	102,2
$\beta$ -D-Glucose substituída	101,6	101,4
$\alpha$ -L-Fucose	99,4	100,0
$\alpha$ -D-Xilose terminal	98,4	98,8
$\alpha$ -D-Xilose substituída	97,5	97,5

FONTE: O autor (2010).

Além das atribuições nos carbonos anoméricos, foi possível assinalar alguns sinais de  $-\text{CH}_2$  característicos de xiloglucanas, com base no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT onde estes sinais aparecem invertidos (BUSATO; VARGAS-RECHIA; REICHER, 2001). Os sinais em  $\delta$  66,2,  $\delta$  60,2,  $\delta$  61,5 e  $\delta$  61,0 ppm podem ser atribuídos aos C-6 das unidades de glucose, galactose substituída, galactose terminal e para o C-5 das unidades de xilose, respectivamente.

O perfil de eluição por HPSEC-MALLS/RI/UV da fração FCHB4DS está mostrado na Figura 23A. Verifica-se a presença de um pico principal detectado pelo RI, com a base bastante alargada, o qual é parcialmente coincidente com o sinal do detector MALLS. Este apresenta um pico com um pequeno “ombro”, o que sugere a presença de duas famílias de polímeros de alta massa molar. O perfil obtido pelo detector de ultravioleta ( $\lambda$  280 nm) mostra que não há quantidade significativa de proteínas nesta fração, este dado corrobora com o obtido na dosagem colorimétrica (1,5%). No entanto, a fração que ficou retida no gel e que foi obtida após eluição com solução de NaCl (FCHB4NaCl) apresentou como monossacarídeo majoritário a arabinose, além de um alto teor de proteína, dado confirmado pelo detector de ultravioleta ( $\lambda$  280 nm) (Figura 23B e Tabela 5).

A



B

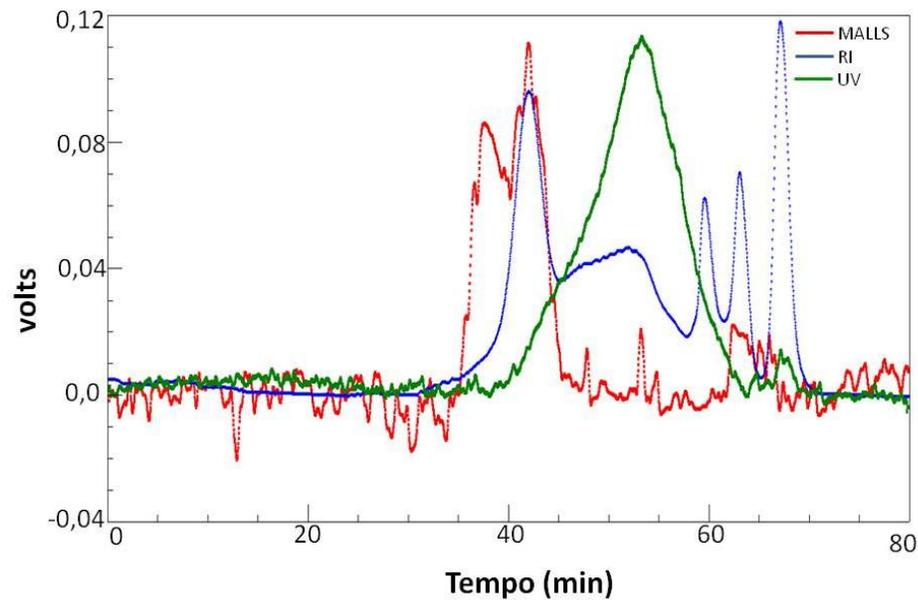


FIGURA 23 – PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC-MALLS/RI PARA AS FRAÇÕES OBTIDAS DAS FOLHAS DE *C. langsdorffii* POR CROMATOLOGRAFIA DE TROCA IÔNICA (A) FCHB4DS E (B) FCHB4NACL

FONTE: O autor (2010).

NOTA: RI- detector diferencial de índice de refração indicado em azul; MALLS- detector de espalhamento de luz laser em multiângulos-ângulo, 90° indicado em vermelho; UV- detector de ultravioleta indicado em verde (fase móvel:  $\text{NaNO}_2$  0,1M e 200 ppm  $\text{NaN}_3$ ; fluxo: 0,6 mL/min).

Este resultado pode sugerir a presença de arabinogalactana-proteína (AGP). A análise por difusão radial em gel de agarose na presença do reagente de Yariv ( $\beta$ -

glucosil), que reage com AGP indicou a presença de 1,5% deste polímero na fração analisada (Figura 24). Outros estudos já relataram a presença deste polímero em frações extraídas de parede celular vegetal (POPPER; FRY, 2008; ARNOUS; MEYER, 2009; BOUGHANMI et. al; 2010). MOORE *et al.* (2006) utilizaram a técnica de imunocitoquímica para localizar AGPs em folhas de *Myrothamnus flabellifolius* (MOORE *et al.*, 2006).

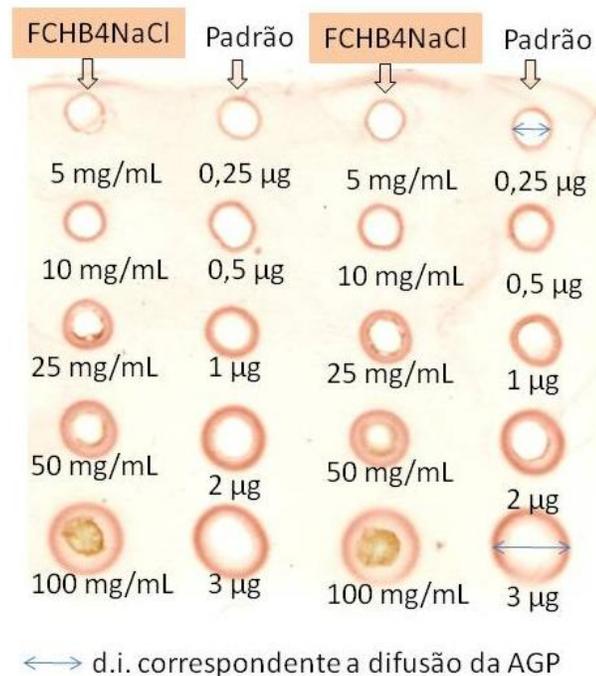


FIGURA 24 – GEL DE AGAROSE COM O REAGENTE  $\beta$ -GLUCOSIL YARIV PARA A DETECÇÃO DE ARABINO GALACTANA-PROTEÍNAS DA FRAÇÃO FCHB4NaCl OBTIDA DAS FOLHAS DE *C. langsdorffii*

FONTE: O Autor (2010)

NOTA: Foi utilizado como padrão a goma arábica (Sigma) nas massas indicadas

Embora o método de troca iônica tenha sido eficiente na remoção de pigmentos e proteína, a amostra resultante não se apresentou homogênea e exibe ainda ácido urônico e elevado conteúdo de xilose, o que sugere a presença de xilana ácida (Tabela 5). Este polissacarídeo já foi amplamente descrito na literatura por estar presente na parede celular de vegetais superiores (RAY *et al.*, 2004; COSGROVE, 2005; POPPER; FRY *et al.*, 2008; YORK; O'NEILL; 2008; SCHELLER; ULVSKOV; 2010).

Na tentativa de eliminar o polissacarídeo ácido presente na fração FCHB4DS e obter a xiloglucana pura, esta foi novamente eluída em gel de troca iônica DEAE

Sephacel. Entretanto, a repetição deste método foi ineficiente, pois, a fração resultante FCHB4DS2, apresentou xilose como monossacarídeo majoritário.

A fração FCHB4DS2 foi tratada com solução de Fehling (JONES; STOODLEY, 1965). Este procedimento forneceu duas frações, a fração precipitada com o reativo de Fehling (PFHB4) e o sobrenadante (SFHB4).

De acordo com a composição monossacarídica obtida (Tabela 5), pode-se observar que o método foi eficiente no fracionamento dos polissacarídeos presentes na fração FCHB4DS2. Ambas as frações apresentam composições que indicam a presença de xiloglucanas. Entretanto, a fração PFHB4 apresentou maior rendimento (16,7% em relação a FCHB4), maior percentual de fucose e menor de arabinose e manose quando comparada com a fração SBHB4 (rendimento de 6,7% em relação a FCHB4). Busato, Vargas-Rechia e Reicher (2001) isolaram e caracterizaram uma xiloglucana estrutural das folhas de *H. courbaril* e também observaram a presença destes monossacarídeos em pequenas proporções.

Na Figura 25 pode-se observar o perfil de eluição da fração PFHB4, onde se pode observar um pico proeminente detectado pelo RI, a detecção por espalhamento de luz, a qual pode indicar o tamanho da molécula, não se mostrou nítida, sugerindo que o polissacarídeo seja pequeno, impossibilitando assim, uma boa resolução na detecção.

Pode-se atribuir, através do espectro de  $^{13}\text{C}$  (Figura 26), os sinais da região anomérica para fração PFHB4 (Tabela 6), os quais se apresentaram característicos de xiloglucana estrutural (BUSATO; VARGAS-RECHIA; REICHER, 2001; KAI, 2009; PAREDES, 2009). A atribuição dos sinais no espectro de  $^{13}\text{C}$  foi semelhante ao realizado para fração FCHB4SD, entretanto, em campo alto, observou somente um sinal em  $\delta$  16,0 ppm, referente ao grupamento metil das unidades de fucose, e não foi observado sinal referente à ramnose. Este dado corrobora com a composição monossacarídica obtida para esta fração, como observado na Tabela 5, mostrando que a utilização de solução de Fehling foi eficiente para purificação da amostra.

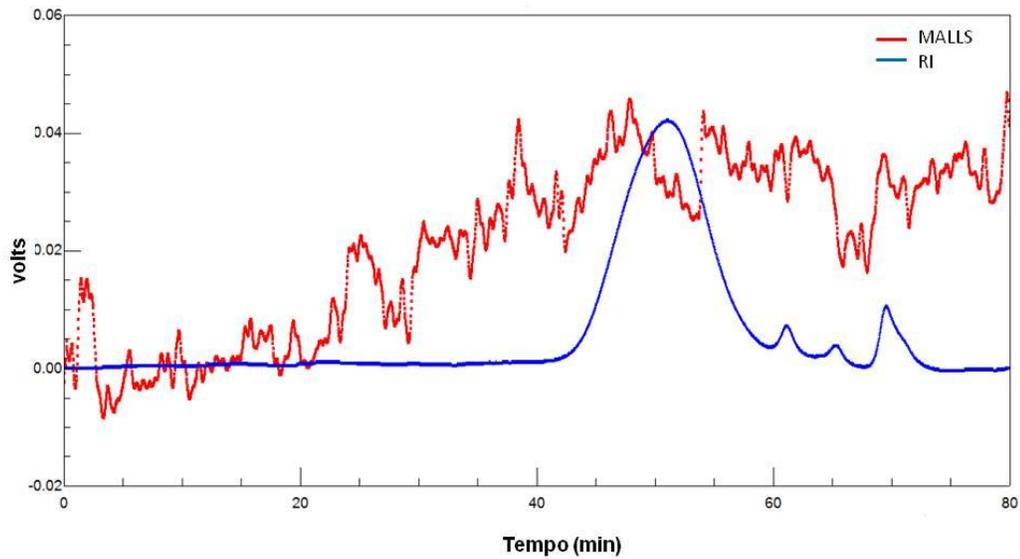


FIGURA 25– PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC MALLS/RI PARA A FRAÇÃO PFHB4, OBTIDA PELA PRECIPITAÇÃO DA FRAÇÃO FCHB4DS2 COM REATIVO DE FELHING  
 FONTE: O autor (2010).

NOTA: RI- detector diferencial de índice de refração indicado em azul; MALLS- detector de espalhamento de luz laser em multiângulos-ângulo, 90° indicado em vermelho (fase móvel: NaNO<sub>2</sub> 0,1M e 200 ppm NaN<sub>3</sub>)

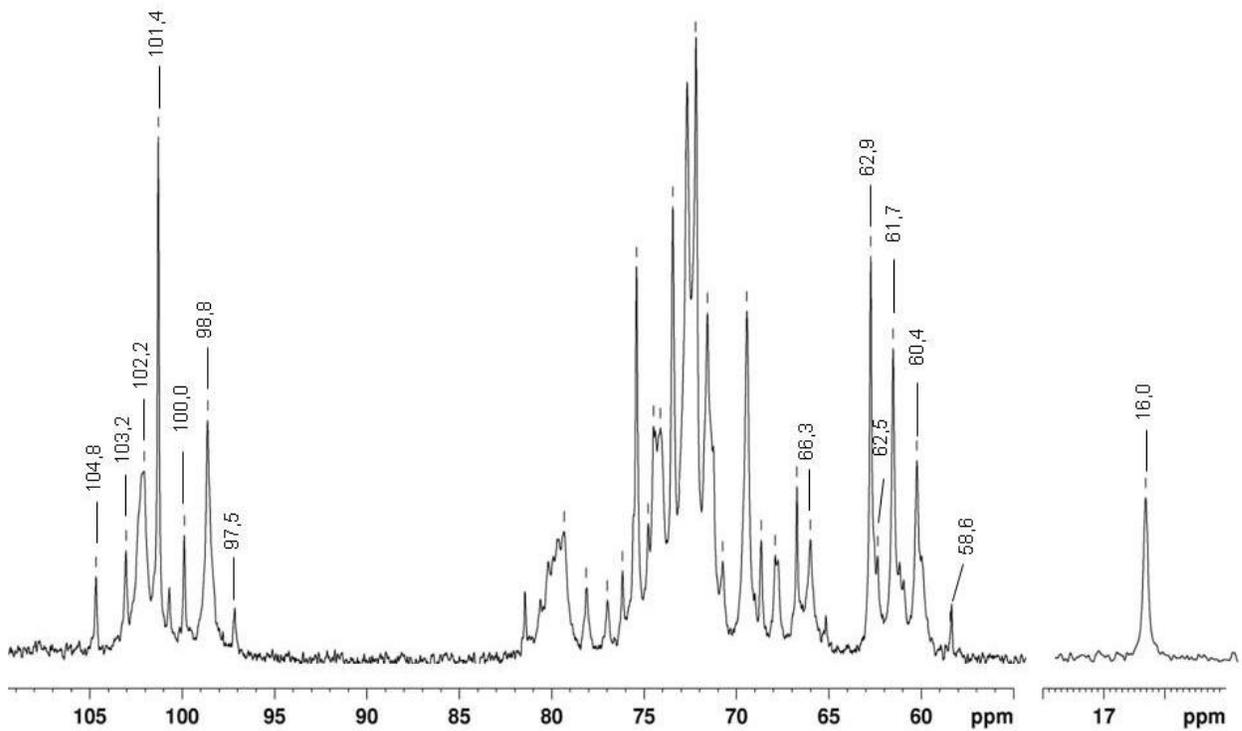


FIGURA 26 – ESPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup>C DAS FRAÇÕES PFHB4 OBTIDAS DAS FOLHAS DE *C. langsdorffii* SOLUBILIZADAS EM D<sub>2</sub>O E ANALIZADAS A 70°C  
 FONTE: O autor (2010).

O polissacarídeo PFHB4 foi utilizado para teste *in vitro* em macrófagos, quanto seu efeito na viabilidade celular e na produção de NO<sup>•</sup>. A Tabela 7 compila as informações as frações de xiloglucanas obtidas, as quais foram utilizadas em testes *in vitro* de atividade biológica em macrófagos peritoneais de camundongos.

TABELA 7 – COMPILAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DAS FRAÇÕES DE XILOGLUCANAS UTILIZADAS NOS TESTES DE ATIVIDADE BIOLÓGICA

Espécie utilizada	Fonte da xiloglucana	Característica da xiloglucana	Sigla	Proporção Monossacarídica			
				Glc	Xyl	Gal	Fuc
<i>C. langsdorffii</i>	Cotilédones	Reserva	XGC	4	: 2,5	: 1,6	: 0
		Modificada	XGCd	4	: 3,5	: 0,4	: 0
<i>H. courbaril</i>	Cotilédones	Estrutural	PFHB4	4	: 3,1	: 1,2	: 0,4
		Reserva	XGJ	4	: 2,7	: 1,1	: 0
<i>T. indica</i>	Cotilédone	Modificada	XGJd	4	: 3,2	: 0,2	: 0
		Reserva	XGT	4	: 2,7	: 1,1	: 0
		Modificada	XGTd	4	: 3,1	: 0,4	: 0

FONTE: O autor (2010)

#### 5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DAS XILOGLUCANAS ISOLADAS

As xiloglucanas provenientes das sementes de *C. langsdorffii*, *H. courbaril* e *T. indica*, denominadas respectivamente, XGC, XGJ, XGT e suas respectivas frações desgalactosiladas, XGCd, XGJd e XGTd, bem como, a xiloglucana estrutural proveniente das folhas de *C. langsdorffii* (PFHB4) foram avaliadas quanto à capacidade de atuarem como modificadores da resposta biológica (BRM). Portanto, fez-se necessário avaliar primeiramente a viabilidade celular de macrófagos tratados com as xiloglucanas em diferentes concentrações, para determinar doses não tóxicas utilizadas nos experimentos posteriores.

#### 5.4.1 Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi determinada em períodos de incubação de 2 e 48 h, de acordo com os experimentos propostos. Como a viabilidade celular para XGC e XGJ já havia sido previamente determinada (ROSÁRIO *et al.*, 2008), no presente estudo, foi avaliada a viabilidade celular para XGT nas concentrações 10 - 100 µg/mL.

Pode-se observar na Figura 27 que em todas as concentrações testadas XGT não exibiu citotoxicidade em macrófagos quando incubados por 2 e 48 h. Surpreendentemente, este polissacarídeo indicou aumentos significativos na viabilidade, atingindo aproximadamente 20% na máxima concentração testada (100 µg/mL). Este aumento na viabilidade pode ser explicado pela utilização do método MTT, já que macrófagos ativados interferem nesta metodologia causando uma superestimação do número de células. Já foi descrito que macrófagos ativados são capazes de produzir mais azul de formazan a partir de sais de NBT quando comparados a células não ativadas, além disso, macrófagos ativados modificam seu metabolismo, quando comparados aos macrófagos quiescentes, e expressam em maior proporção iNOS (óxido nítrico sintase induzível), a qual está envolvida na redução do MTT (POZZOLINI *et al.*, 2003).

Os resultados sugerem certa “proteção” das células pelo XGT, uma vez que a interferência química do polímero no método é descartada, considerando que, estruturalmente, esta molécula não é capaz de fornecer elétrons para redução do MTT a formazana. Esta reação resultaria no aumento da absorbância e consequentemente seria evidenciado o aumento na viabilidade celular

A análise da viabilidade celular de macrófagos da cavidade peritoneal na presença dos polissacarídeos desgalactosilados, está ilustrada nos gráficos na Figura 28. Pode-se observar que, no tempo de incubação de 2 h, na máxima concentração testada, os polissacarídeos XGCd e XGJd apresentaram citotoxicidade ocasionando decréscimo de aproximadamente 10% na viabilidade celular (Figura 28A).

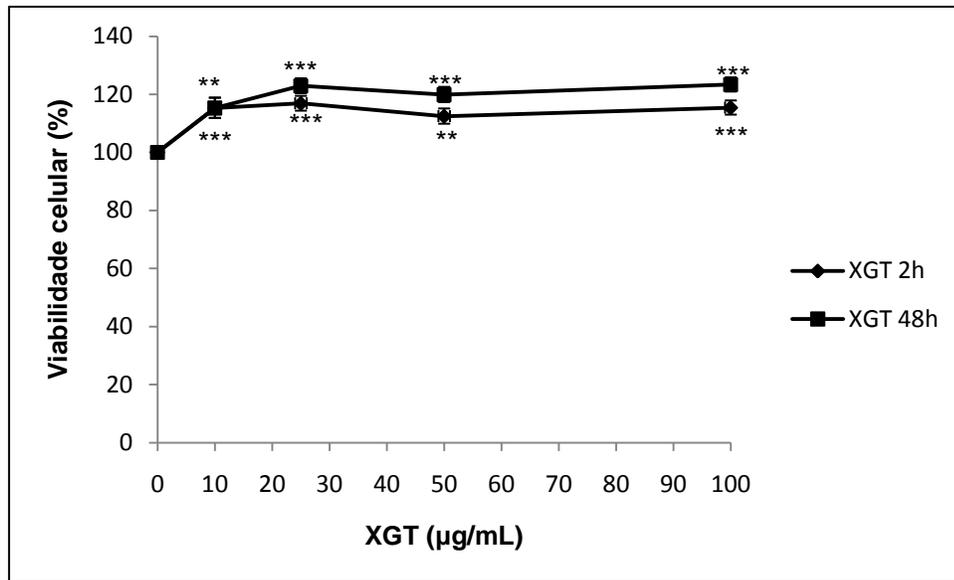


FIGURA 27 – EFEITO DA XILOGLUCANA XGT PROVENIENTE DAS SEMENTES DE *T. indica* SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE MACRÓFAGOS.

FONTE: O Autor (2010)

NOTA: Viabilidade celular determinada pelo teste do MTT. Macrófagos aderentes foram incubados por 2 h (A) e por 48 h (B) na presença da xiloglucana XGT nas concentrações indicadas. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EP de três experimentos independentes, cada um em triplicata. Após a incubação o MTT foi removido e adicionou-se DMSO. A absorbância foi medida em 550 nm. 100% de viabilidade corresponde à viabilidade determinada para as células incubadas em meio MEM. \*\* e \*\*\* Diferença significativa do meio MEM: ( $p \leq 0,02$ ) e ( $p \leq 0,01$ ), respectivamente.

Esta pequena alteração na viabilidade foi semelhante ao observado com os polissacarídeos nativos (ROSÁRIO *et al.*, 2008). Porém, comparando o efeito no tempo de incubação de 48 h (Figura 28B) observa-se que os polissacarídeos XGJd e XGTd mostraram-se citotóxicos para as células a partir da menor concentração testada, diminuindo a viabilidade celular em torno de 20%, atingindo aproximadamente 40% quando tratados com 100 µg/mL.

A citotoxicidade exibida por XGJd foi semelhante à observada para o polímero nativo XGJ, que diminuiu a viabilidade celular em 40% na concentração de 100 µg/mL (ROSÁRIO *et al.*, 2008). Diferentemente de XGT, a fração XGTd apresentou-se citotóxica para os macrófagos, sugerindo que a remoção das unidades de galactose deste polímero são determinantes para este efeito. Entretanto, o polímero XGCd não mostrou-se ser citotóxico nas concentrações e condições testadas, resultado semelhante ao obtido para fração nativa (ROSÁRIO *et al.*, 2008).

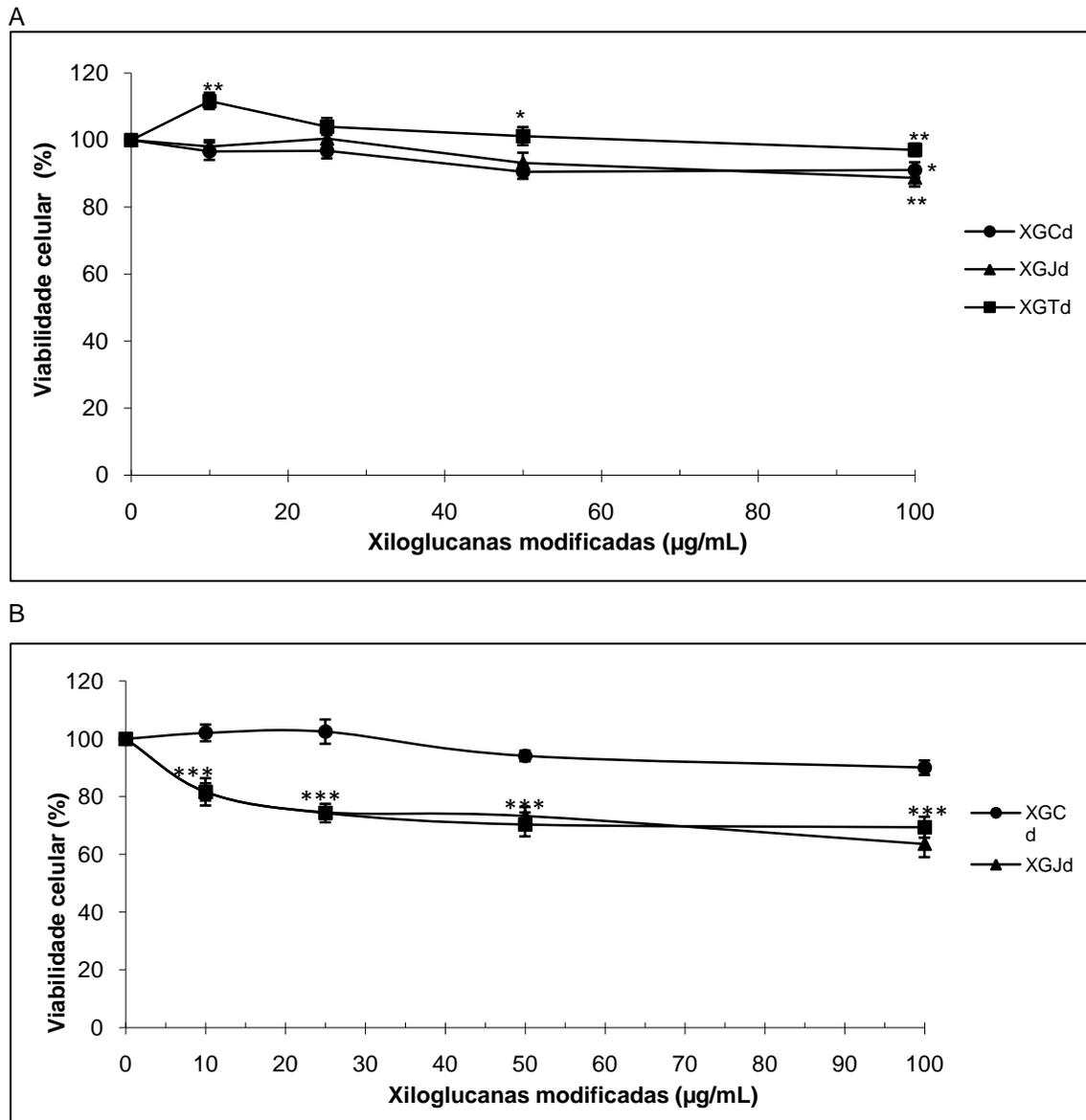


FIGURA 28 – EFEITOS DAS XILOGLUCANAS DESGALACTOSILADAS XGCD, XGJD E XGTD PROVENIENTES DAS SEMENTES DE *C. langsdorffii*, *H. courbaril* E *T. indica* SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE MACRÓFAGOS NO PERÍODO DE INCUBAÇÃO DE (A) 2 H E (B) 48 H  
 FONTE: O autor (2010).

NOTA: Viabilidade celular determinada pelo teste do MTT. (A) Macrófagos aderentes foram incubados por 2 h na presença das xiloglucanas XGCd, XGJd e XGTd nas concentrações indicadas. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  DP de três experimentos independentes, cada um em quadruplicata. (B) - Macrófagos aderentes foram incubados por 48 h na presença das xiloglucanas XGCd, XGJd e XGTd nas concentrações indicadas. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  DP (n = 10) de três experimentos independentes, dois em triplicata e um em quadruplicata. Após a incubação o MTT foi removido e adicionou-se DMSO. A absorbância foi medida em 550 nm. 100% de viabilidade corresponde à viabilidade determinada para as células incubadas em meio MEM. \*, \*\*, \*\*\* Diferença significativa do meio MEM: ( $p \leq 0,05$ ), ( $p \leq 0,02$ ), ( $p \leq 0,01$ ) respectivamente.

Os resultados de viabilidade celular de macrófagos tratados com a xiloglucana estrutural extraída das folhas de *C. langsdorffii* nas concentrações 10-100 µg/mL, incubadas por 48 h, estão mostrado na Figura 29. Pode-se observar no gráfico a redução da viabilidade celular de aproximadamente 23% na máxima concentração testada.

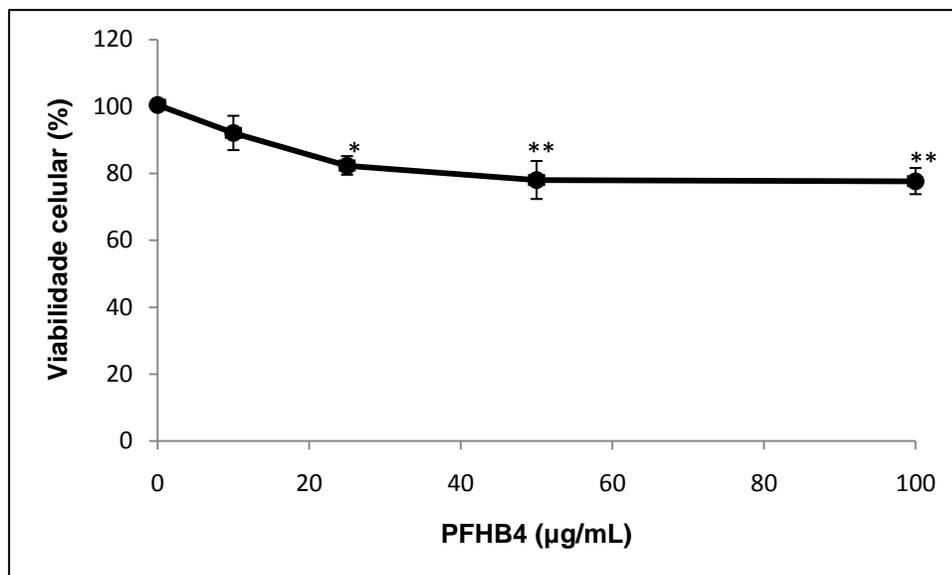


FIGURA 29 – EFEITO DA XILOGLUCANA PFHB4 OBTIDA DAS FOLHAS DE *C. langsdorffii* SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE MACRÓFAGOS NO PERÍODO DE INCUBAÇÃO DE 48 H.

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Viabilidade celular determinada pelo teste do MTT. Macrófagos aderentes foram incubados por 48 h na presença da xiloglucana PTHB4 nas concentrações indicadas. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  DP (n = 09) de três experimentos independentes em triplicata. Após a incubação o MTT foi removido e adicionou-se DMSO. A absorbância foi medida em 550 nm. 100% de viabilidade corresponde à viabilidade determinada para as células incubadas em meio MEM. \* e \*\* Diferença significativa do meio MEM: ( $p \leq 0,05$ ) e ( $p \leq 0,02$ ) respectivamente.

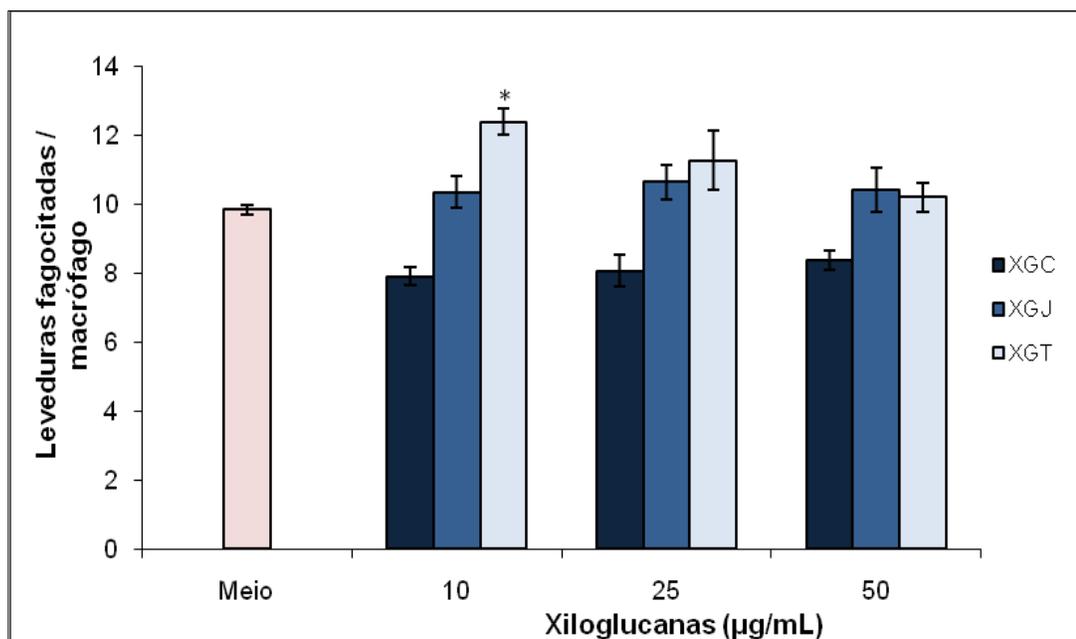
Para os testes subsequentes, foram utilizadas as concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL, para o tempo de incubação de 2 h, para as frações XGC, XGJ, XGT e suas respectivas frações desgalactosiladas. Para o tempo de incubação de 48h, foram testadas as concentrações de 10, 25 e 50 µg/mL para todas as frações.

#### 5.4.2 Atividade fagocítica

A fagocitose é o primeiro passo na resposta de macrófagos à invasão de microorganismos. O processo de ativação destas células pode desencadear o aumento deste mecanismo de defesa. Para verificar este parâmetro, macrófagos peritoneais de camundongos, aderentes em lamínulas de vidro, foram tratados com os polissacarídeos nativos e modificados, em diferentes concentrações. Após 48h, as células foram incubadas com leveduras na proporção de 10 leveduras para cada macrófago, por 1 h. Nas lamínulas coradas foram contados 200 macrófagos e o número de leveduras fagocitadas, os resultados foram expressos pela razão do número de leveduras fagocitadas por macrófago. Na Figura 30 pode-se verificar que o polissacarídeo XGT foi capaz de ativar essa via na menor concentração testada, aumentando a fagocitose em 26%.

Este aumento na atividade fagocítica por xiloglucana proveniente de sementes de *T. indica* também foi obtido por Pauly; Freis; Pauly (1999). Neste trabalho os autores trataram monócitos humanos com este polissacarídeo, na concentração de 160 µg/L e observaram aumento de 58 % na fagocitose. Corroborando com o resultado obtido neste trabalho, a xiloglucana de *T. indica* (5 µg/mL) também aumentou a atividade fagocítica em neutrófilos coletados de pacientes que apresentavam leucemia linfoblástica aguda (SREELEKHA *et al.*, 1993). Neste experimento utilizando células tratadas com xiloglucanas foi observado um índice de fagocitose de ~1,3, valor que expressa o número de leveduras fagocitadas por 100 neutrófilos tratados com polissacarídeos em relação ao número de leveduras fagocitadas por neutrófilos não tratados (SREELEKHA *et al.*, 1993).

A



B

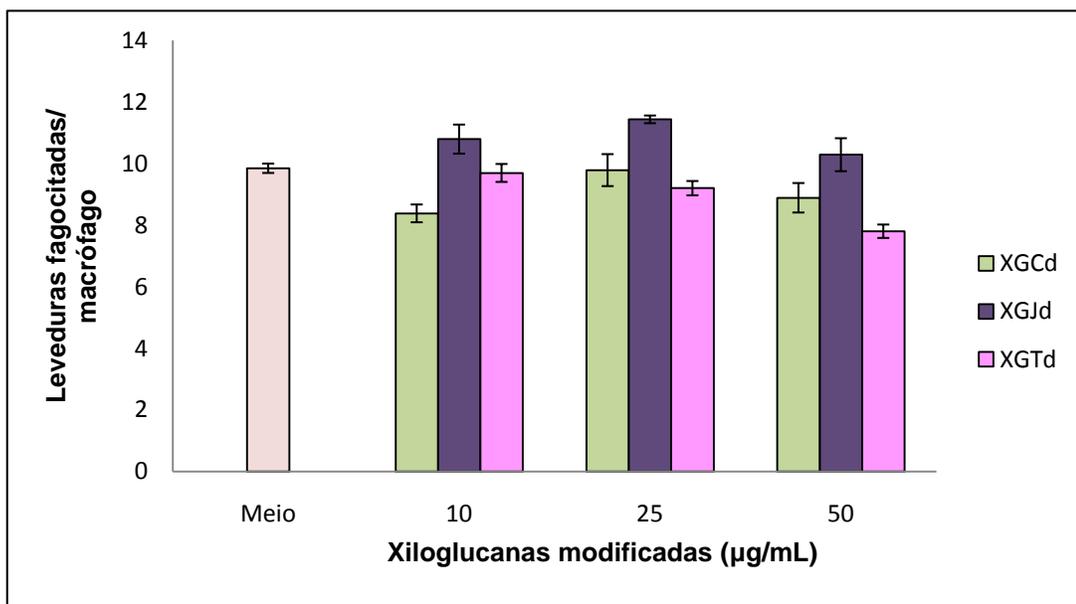


FIGURA 30 – ATIVIDADE FAGOCÍTICA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS EXPOSTOS ÀS XILOGLUCANAS NATIVAS (A) E MODIFICADAS(B) OBTIDAS DAS SEMENTES DE *C. langsdorffii*, *H. courbaril* E *T. indica*.

FONTE: O autor (2010).

NOTA: Atividade fagocítica. Macrófagos peritoneais de camundongos foram expostos por 48 h a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> aos polissacarídeos (A) XGC, XGJ e XGT e (B) XGCd, XGJd e XGTd nas concentrações indicadas e, em seguida, incubados por 1 h com leveduras na proporção 5:1. O número de leveduras fagocitadas/ macrófago foi obtido por contagem em microscópio óptico. Como controle negativo foi utilizado apenas meio de cultura MEM. Os resultados estão expressos como média. EP (n = 2, sendo cada experimento em triplicata). \* Diferença significativa do meio MEM: (p ≤ 0,05).

As xiloglucanas obtidas a partir de sementes de *C. langsdorffii* e *H. courbaril*, nativas (XGC e XGJ) e modificadas (XGCd e XGJd), não se mostram capaz de aumentar significativamente a atividade fagocítica de macrófagos tratados, quando comparado com o controle.

Resultado diferente foi obtido recentemente por SILVEIRA (2010) para a mesma xiloglucana XGJ, que nas concentrações de 10-200 µg/mL estimulou a atividade fagocítica em macrófagos da linhagem RAW 264.7, após 24 h de tratamento. Na maior concentração testada Silveira (2010) observou 100% de aumento da atividade fagocítica quando comparada ao grupo controle.

Atividade fagocítica pronunciada em macrófagos foi descrita por MORETÃO *et al.* (2003) que avaliaram o efeito da ARAGAL, uma arabinogalactana extraída da goma da árvore *Anadenanthera colubrina*, na capacidade fagocítica de macrófagos peritoneais de camundongo. Neste estudo, os autores determinaram o aumento do índice endocítico em 35 a 66% nas células tratadas quando comparado ao grupo controle.

Macrófagos obtidos de camundongos tratados intraperitonealmente com 200 mg/kg de α-glucana isolada do líquen *Ramalina celastri* apresentaram atividade fagocítica aumentada em 70% após 7 dias de tratamento quando comparado ao grupo controle (STUELP-CAMPELO *et al.*, 2002).

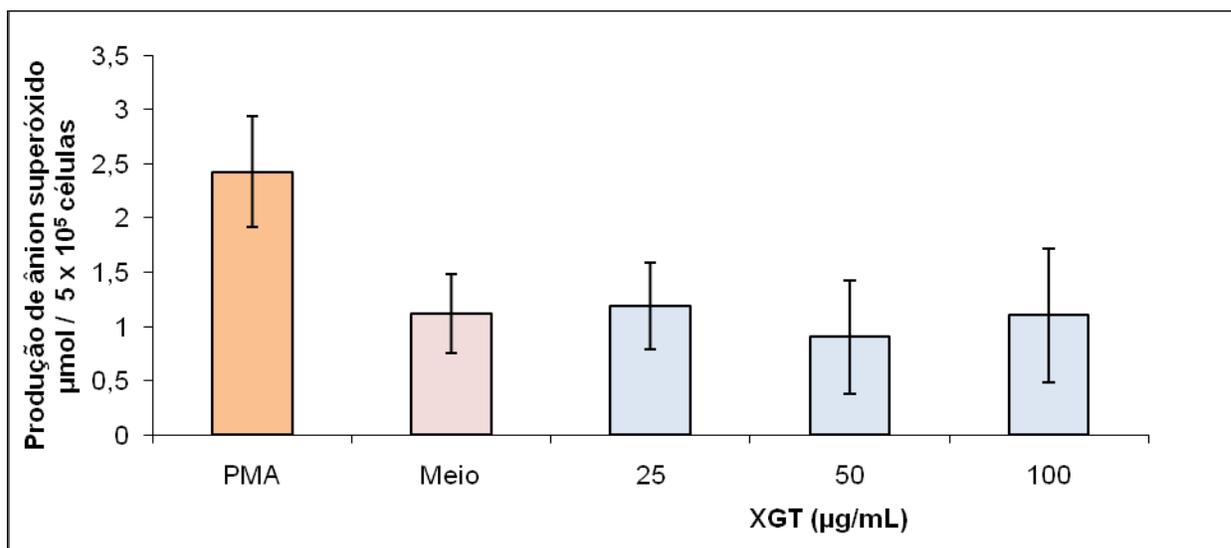
O aumento da capacidade fagocítica, na presença de galactomananas obtidas por extrações aquosas e alcalinas das sementes de *Trigonella foenum graecum* foi relatada por Ramesh, Yamaki e Tsushida (2002). Estes autores utilizaram um protocolo diferente do adotado neste trabalho, no qual foi medida a fluorescência das células fagocíticas tratadas com os polissacarídeos e, posteriormente, incubadas com fluoresceína isotiocianato (FITC) “zymozan”. A intensidade do aumento da atividade fagocítica mostrou-se diferente para as duas frações de galactomananas estudadas, na concentração de 10 µg/mL, a amostra obtida por extração alcalina estimulou a fagocitose em 40%, em quanto que, o polissacarídeo obtido por extração aquosa estimulou esta via em 20%.

### 5.4.3 Produção de $O_2^{\bullet-}$ na presença e na ausência de PMA

Macrófagos em presença de determinadas substâncias como o PMA são capazes de responder ao estímulo através da produção e liberação de ROS, processo também conhecido como *burst* respiratório. Neste trabalho foi avaliada a interferência da xiloglucana nativa XGT, e das frações desgalactosiladas XGCd, XGJd e XGTd na produção de  $O_2^{\bullet-}$ . Foram utilizadas duas condições experimentais: células incubadas com os polissacarídeos na ausência e na presença de PMA, sendo este, um agente conhecido por seu efeito estimulador desta via (JUN *et al.*, 1993; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006). A produção de  $O_2^{\bullet-}$  foi quantificada através da redução extracelular do citocromo c (SASADA *et al.*, 1983).

A Figura 31A mostra o efeito da xiloglucana nativa XGT sobre a produção de  $O_2^{\bullet-}$  na ausência de PMA. Pode-se observar que este polissacarídeo, bem como, sua fração desgalactosilada XGTd correspondente (Figura 31B) não foram capazes de estimular esta via. As xiloglucanas modificadas XGCd e XGJd, também não promoveram aumento estatisticamente significativo na produção de  $O_2^{\bullet-}$  quando comparadas ao grupo controle. Resultados similares, quanto à produção de  $O_2^{\bullet-}$ , foram obtidas para as frações nativas XGC e XGJ (ROSÁRIO *et al.*, 2008). Diferente do observado para as xiloglucanas, diversos estudos relataram a interferência de diferentes polissacarídeos, como estimuladores da produção de  $O_2^{\bullet-}$ . Um dos principais polissacarídeos considerado como potente estimulador do *burst* oxidativo em células fagocíticas é o zimosana, polímero constituído por uma mistura de manana e glucana (BADWAY; KARNOVSKY, 1980; KARNOVSKY; BADWAY, 1986; BERTON; GORDON, 1983; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006).

A



B

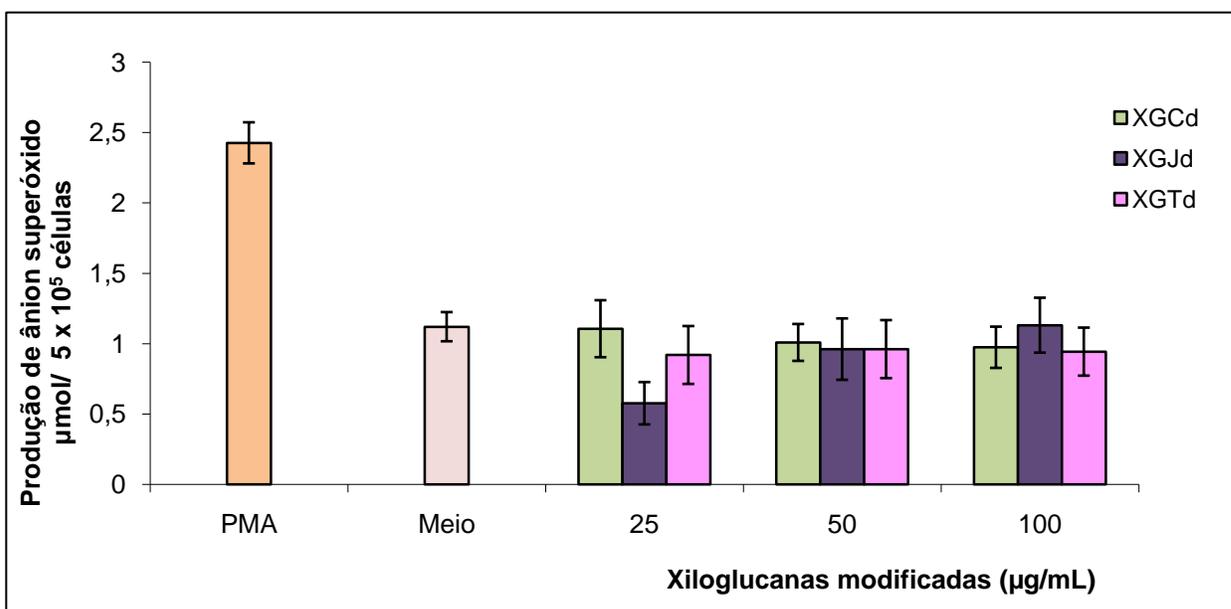


FIGURA 31 – EFEITO DAS XILOGLUCANAS NATIVAS OBTIDAS DAS SEMENTES DE *T. indica* (A) E MODIFICADAS OBTIDAS DAS SEMENTES DE *C. langsdorffii*, *H. courbaril* E *T. indica*. (B) SOBRE A PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO POR MACRÓFAGOS

FONTE: O autor (2010).

NOTA: Macrófagos aderentes foram incubados em meio de reação padrão constituídos por HBSS contendo ferricitocromo c (80 µmol/L) mais os polissacarídeos (A) XGT; (B) XGCd, XGJd e XGTd nas concentrações acima. Como controle as células foram incubadas somente com o meio de reação e para o controle positivo desta via as células foram incubadas com o meio na presença de PMA (1 µg/mL). Após o tempo de 2 h a absorbância do sobrenadante foi medida em 550 nm. A concentração de citocromo c reduzido, o qual corresponde à concentração de  $O_2^{\cdot -}$  produzido pelos macrófagos, foi determinada através do coeficiente de extinção molar ( $C_{oxid.red.} \Delta \epsilon = 2,1 \times 10^4 M^{-1} cm^{-1}$ ):  $C = A/\epsilon$  (JOHNSTON *et al.*, 1978). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EP de três experimentos independentes, cada um em quadruplicata

Em condição experimental similar à utilizada no presente estudo, resultados diferentes foram observados para a arabinogalactana isolada das folhas de *Phyllanthus niruri*, pois, este polissacarídeo foi capaz de induzir a produção de  $O_2^{\bullet-}$ , sendo este efeito três vezes superior ao controle quando na concentração de 250  $\mu\text{g/mL}$  (MELLINGER *et al.*, 2005). Posteriormente, foi relatado que o mesmo polímero quando submetido a tratamento com HCl, para mimetizar o efeito do fluido gástrico humano, promoveu estímulo da produção de  $O_2^{\bullet-}$  duas vezes superior ao controle (MELLINGER *et al.*, 2008). Arabinogalactana isolada da goma de *Anadenanthera colubrina*, ativou o *burst* respiratório *in vitro*, tanto na presença como na ausência de PMA. Em testes *in vivo* este polissacarídeo (200 mg/kg) foi inoculado na cavidade peritoneal do camundongo, e após 7 dias da administração, os macrófagos foram coletados, plaqueados e a produção de  $O_2^{\bullet-}$  aumentou 70% na ausência de PMA e 48% na presença de PMA quando comparado aos controles (MORETÃO *et al.*, 2003).

Diferente do efeito observado para as xiloglucanas, quatro arabinogalactanas, com diferentes massas molares, obtidas de *Opuntia poliacantha*, foram capazes de estimular a produção de ROS de maneira dose-dependente nas concentrações de 25 a 400  $\mu\text{g/mL}$  (SCHEPETKINS *et al.*, 2008). Todas as frações apresentaram, em diferentes proporções, composição monossacarídica constituída majoritariamente por galactose, xilose, ramnose e ácido galacturônico. Foi observado que as intensidades do estímulo desta via foi diretamente proporcional a massa molar média, isto é, quanto maior a massa do polissacarídeo, maior foi o efeito produzido (SCHEPETKINS *et al.*, 2008). Na concentração de 200  $\mu\text{g/mL}$ , o polissacarídeo que apresentava maior massa molar (733 kDa) estimulou oito vezes mais a produção de ROS quando comparado com o grupo controle, enquanto que a arabinogalactana de 168 kDa aumentou a produção quatro vezes a mais que o controle. Embora as xiloglucanas nativas e modificadas apresentem diferenças nas massas molares, nenhuma fração avaliada no presente estudo foi capaz de induzir a produção de  $O_2^{\bullet-}$ .

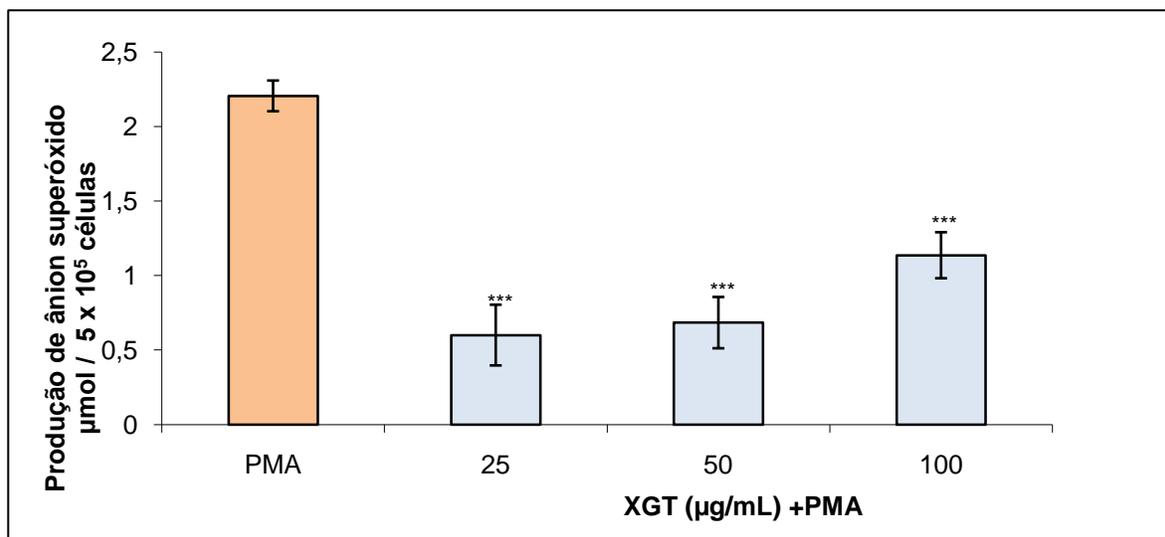
O heteropolissacarídeo isolado da erva *Gynostemma Pentaphyllum*, o qual é constituído por glucose, galactose, arabinose, xilose, manose, ácido galacturônico e glucurônico, aumentou de forma dose-dependente a produção de ROS. Nos

experimentos *in vitro*, na máxima concentração testada (400 µg/mL), foi observado aumento na produção de ROS de 169%, enquanto que, *in vivo*, com a inoculação intraperitoneal do polímero (100 mg/Kg) houve o aumento de 123% (YANG *et al.*, 2008). Neste trabalho, os autores avaliaram o estímulo da via através da conversão oxidativa da sonda sensível diclorofluoresceína diacetato em um composto fluorescente (diclorofluoresceína) (YANG *et al.*, 2008).

A Figura 32 mostra o efeito produzido nos macrófagos peritoneais quando tratados com os polissacarídeos XGT, XGCd, XGJd e XGTd na presença de PMA. Os resultados indicam que a presença dos polissacarídeos interferiu de forma significativa no efeito induzido pelo PMA, ou seja, mostraram exercer efeitos inibitórios na produção de  $O_2^{\bullet-}$  induzida pelo PMA. Diferente do que foi observado para as xiloglucanas nativas de *C. langsdorffii* e *H. courbaril*, a fração XGT (Figura 32A) reduziu a produção de  $O_2^{\bullet-}$  em aproximadamente 70% nas concentrações 10 e 25 µg/mL. A fração desgalactosilada correspondente, XGTd, também exibiu esta atividade. As frações de xiloglucanas desgalactosiladas na presença do indutor da via também diminuíram a produção de  $O_2^{\bullet-}$ . Para XGCd foi observado uma diminuição de 80% de  $O_2^{\bullet-}$ , na menor concentração testada. O mesmo pode ser observado para a fração XGJd a qual inibiu a produção deste radical em aproximadamente 65%, em todas as concentrações testadas, quando comparada com o controle positivo. Já as frações nativas correspondentes não promoveram tal efeito (ROSÁRIO *et al.*, 2008).

Atividade sequestradora de radicais livres tem sido descrita para diferentes classes de polissacarídeos. PAULY; FREIS; PAULY, (1999) avaliaram a resposta do *burst* respiratório utilizando a técnica de quimioluminescência, e demonstraram que, as células ativadas previamente com zimosana, quando tratadas com xiloglucanas de sementes de *T. indica* promoveram aumento na produção de  $O_2^{\bullet-}$  superior quando comparado com os neutrófilos tratados com oligopeptídeo obtido de *Saccharomyces cerevisiae*. Porém, neste mesmo estudo, os autores também sugerem que este polímero exerce atividade anti-radical livre, avaliado pelo teste de inibição da reação de Fenton.

A



B

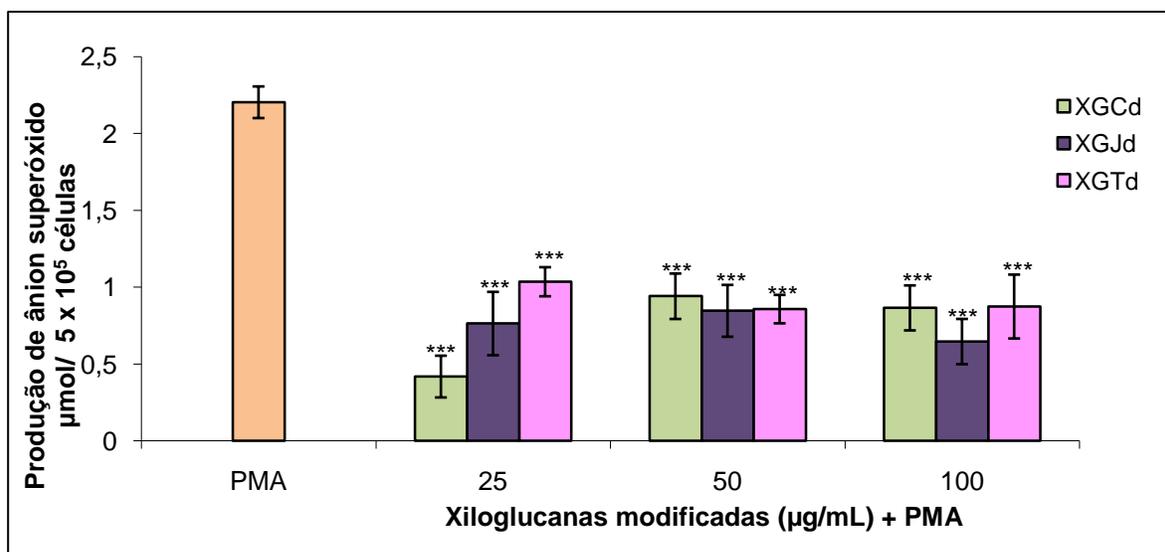


FIGURA 32 – EFEITO DAS XILOGLUCANAS NATIVAS OBTIDAS DAS SEMENTES DE *T. indica* (A) E MODIFICADAS OBTIDAS DAS SEMENTES DE *C. langsdorffii*, *H. courbaril* E *T. indica*. (B) NA PRESENÇA DE PMA SOBRE A PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO POR MACRÓFAGOS.

FONTE: O autor (2010).

NOTA: Macrófagos aderentes foram incubados em meio de reação constituído por HBSS contendo ferritocromo c (80 μmol/L) na presença de PMA (1 μg/mL) mais os polissacarídeos (A) XGT e (B) XGCd, XGJd e XGTd nas concentrações acima. Como controle as células foram incubadas somente com o meio de reação e com PMA (1 μg/mL). Após o tempo de 2 h a absorbância do sobrenadante foi medida em 550 nm. A concentração de citocromo c reduzido, o qual corresponde à concentração de ânion superóxido produzido pelos macrófagos, foi determinada através do coeficiente de extinção molar ( $C_{\text{oxid.red.}} \Delta \epsilon = 2,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ):  $C = A/\epsilon$  (JOHNSTON *et al.*, 1978. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EP de três experimentos independentes em quadruplicata. \*\*\* Diferença significativa da solução de citocromo c com PMA ( $p \leq 0,01$ ).

Tsiapali *et al.*, (2001) relataram efeitos antioxidantes de diversos polissacarídeos como: pululana, manana, dextrana e glucana-fosfato, bem como, dos monossacarídeos glucose e manose que compõem tais polímeros. Os autores constataram que os polissacarídeos apresentam atividade antioxidante maior do que suas unidades monossacarídicas e atribuíram este fato pela maior facilidade de retirada de próton do carbono anomérico do polímero do que das unidades monossacarídicas livres.

Glucuronoxilanas, arabinogalactanas, ramnogalacturonanas, frutanas e outros polissacarídeos neutros isolados das folhas de *Arctium lappa* var. hercules, *Aloe barbadensis*, *Althaea officinalis* var. robusta, *Plantago lanceolata* var. libor, partes aéreas e raízes de *Rudbeckia fulgida* var. sullivantii, caule de *Mahonia aquifolium*, e goma do pessegueiro (*Prunus persica*), foram testados quanto seus efeitos antioxidantes (KARDOŠOVÁ, MACHOVÁ; 2006). Para esse estudo, os autores avaliaram as respostas inibitórias da peroxidação de lipossomos da lecitina da soja, por radical OH. Todos os polissacarídeos testados, exceto as frutanas, apresentaram atividade antioxidante. Dentre estes polímeros, o efeito mais pronunciado foi obtido por glucuronoxilanas extraídas da *Althaea officinalis* var. robusta, e *Plantago lanceolata* var. libor, atingindo 69 %, quando comparado com o  $\alpha$ -tocoferol, que foi utilizado como controle positivo e atribuído atividade antioxidante de 100% (KARDOŠOVÁ, MACHOVÁ; 2006).

Recentemente foi avaliada, através da redução do molibdênio VI a V, a atividade antioxidante da xilogucana de *T. indica* proveniente de sementes previamente tratadas com irradiação por raios gama e raio de elétrons. Neste estudo foi demonstrado que a irradiação altera a morfologia e a massa molar das xilogucanas, diminuindo 16% (533 kDa) e 24% (442 kDa) quando as soluções de xilogucana (699 kDa) são irradiadas por raios gama e raio de elétrons, com intensidade de 10 kGy, respectivamente. Foi observado também que quanto menor a massa molar dos polissacarídeos, maior é sua atividade seqüestradora. Para a fração nativa (699 kDa) foi observado aumento de 20% na atividade sequestradora, enquanto que para as frações irradiadas que apresentaram massa molar de 533 e 422 kDa, houve um

aumento de 40% e 60% na atividade sequestradora (CHOI *et al.*, 2009). Redução na produção de  $O_2^{\bullet-}$ , foi observado em macrófagos da cavidade peritoneal quando tratados com outros polissacarídeos neutros como, manana e galactomanana na presença de PMA. Neste trabalho, os autores sugerem que esses polissacarídeos possam exercer um efeito antioxidante quando adicionados às células na presença de PMA (NOLETO *et al.*, 2002; 2004).

Utilizando experimentos diferentes do que foi realizado no presente trabalho para avaliar a capacidade de sequestrar radicais livres, Yin *et al.* (2010) testaram o efeito de um polissacarídeo ácido purificado da semente de *Plantago asiatica* L através da inibição da lipoperoxidação, bem como o sequestro de  $O_2^{\bullet-}$  gerado por auto-oxidação (YIN *et al.*, 2010). Utilizando quimioluminescência, Drábiková *et al.* (2009) mostraram a diminuição da produção de ROS, extra e intracelular em neutrófilos humanos tratados com glucomananas extraídas da levedura *Candida utilis* na presença de PMA.

Kangussu-Marcolino (2010) verificou a diminuição expressiva da produção de  $O_2^{\bullet-}$  na presença de PMA em células tratadas com polissacarídeos sulfatados extraídos de algas. Na máxima concentração testada (10  $\mu\text{g/mL}$ ) a heteroraminana reduziu a produção deste radical em 33%, enquanto que as duas galactanas testadas produziram efeitos mais pronunciados reduzindo a produção de  $O_2^{\bullet-}$  na presença de PMA em 44% e 55%. As galactanas sulfatadas apresentam estrutura semelhante, entretanto as intensidades foram distintas. Neste trabalho a autora confirmou o efeito inibidor no *burst* oxidativo através de ensaios *in vitro*, livre de células, baseados na capacidade do polissacarídeo inibir a redução de NBT (nitro blue tetrazólio) por  $O_2^{\bullet-}$  gerado no meio de reação.

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que as estruturas das xiloglucanas podem interferir na resposta de produção de  $O_2^{\bullet-}$  através da possível atividade sequestradora de  $O_2^{\bullet-}$ . Esta evidência foi observada na avaliação dos polissacarídeos em macrófagos na presença de PMA (Figura 32).

#### 5.4.4 Produção de NO<sup>•</sup>

A produção de óxido nítrico por macrófagos é resultado da ativação de uma via de significativa importância para estas células exercerem sua função na resposta inflamatória. O NO<sup>•</sup> é capaz de inibir o crescimento de diversos agentes de doenças infecciosas como, por exemplo, bactérias, fungos, protozoários e parasitas helmínticos (BOGDAN, 2001; KORHONEN, 2005; ORTEGA *et al.*, 2008; COULTER *et al.*, 2008; LUNDBERG; WEITZBERG, 2009). Diversos estudos relataram a ação de polissacarídeos na ativação de macrófagos, quanto à produção e liberação de NO<sup>•</sup>.

No presente trabalho, a produção de NO<sup>•</sup> foi avaliada utilizando macrófagos incubados por 48h com xiloglucanas nativas e modificadas. Esta via demanda mais tempo para se iniciar quando comparada com a produção de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Isso se deve a necessidade de expressar a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), a qual não é expressa em grande quantidade em macrófagos não ativados (KORHONEN *et al.*, 2005). Nos experimentos foi utilizado LPS como controle positivo, pois ele é considerado o principal agente estimulador da produção de óxido nítrico, por promover a indução da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (CUNHA *et al.*, 1993). As células foram tratadas com xiloglucanas nativa e desgalactosiladas, XT, XGCd, XGJd e XGTd, bem como a fração PFHB4, nas concentrações de 10, 25 e 50 µg/mL. Os resultados de tais experimentos estão apresentados nas figuras 33A, 33B e 34.

A Figura 33A mostra a produção de NO<sup>•</sup> liberado por macrófagos peritoneais quando tratados com xiloglucana proveniente de sementes de *T. indica*. Pode-se observar que este polímero, na concentração de 25 µg/mL, aumentou a produção deste metabólito em 100%, quando comparado ao grupo controle. Esta resposta foi semelhante àquela obtida para macrófagos tratados com XGJ, que proporcionou um aumento de 92% com a máxima concentração testada (50 µg/mL) (ROSÁRIO *et al.*, 2008). Entretanto, na mesma concentração testada, este estímulo foi inferior ao exibido pelo polímero XGC que mostrou para esta atividade um aumento três vezes superior quando comparado ao efeito de XGJ e XJT (ROSÁRIO *et al.* 2008).

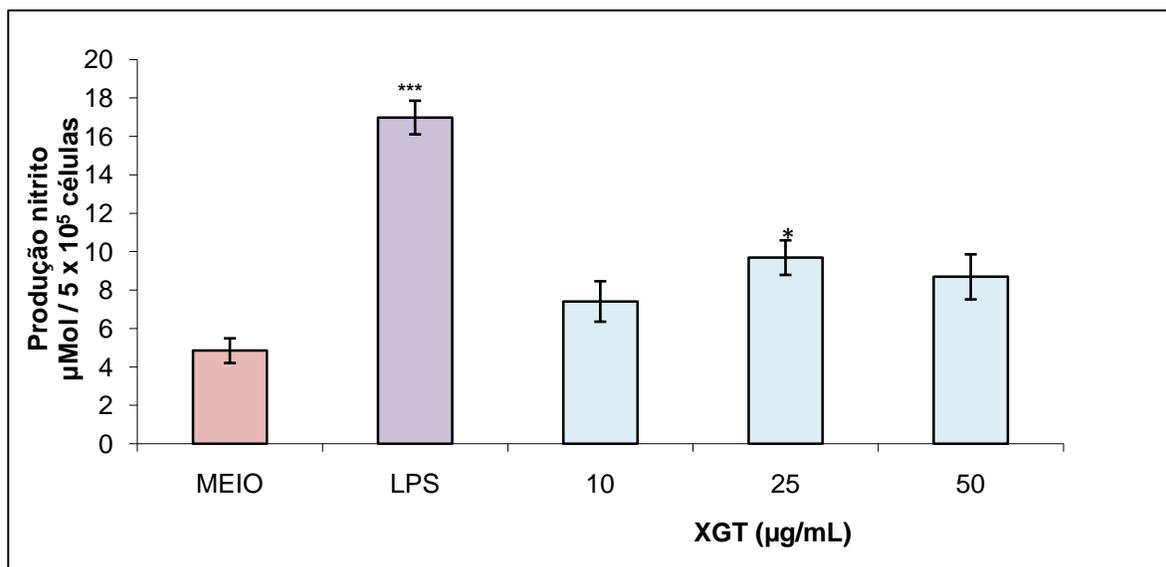
Os resultados obtidos para as três xiloglucanas desgalactosiladas mostraram diferentes intensidade no efeito sobre a produção de NO<sup>•</sup> (Figura 33B). A XGCd, já na menor concentração (10 µg/mL), promoveu um aumento de aproximadamente 113% quando comparada com os macrófagos não tratados (meio). Este efeito mostrou ser dose-dependente atingindo aproximadamente 325% na maior concentração (50 µg/mL). A XGJd também induziu a produção de NO<sup>•</sup>, porém em menor intensidade quando comparado com a XGCd, na menor concentração, apresentou resposta estatisticamente significativa, com um estímulo de aproximadamente 72% e atingiu na máxima concentração, aproximadamente 115%.

Similar ao que foi observado para as frações desgalactosiladas obtidas de *C. langsdorffii* e *H. courbaril*, XGTd, estimulou a produção de NO<sup>•</sup>. Na menor concentração testada (10 µg/mL), somente XGTd foi capaz de aumentar a produção de NO<sup>•</sup> de maneira significativa quando comparado ao grupo controle (140%). Na máxima concentração (50 µg/mL), XGTd aumentou a produção do radical em aproximadamente 280%, resultado significativo, porém inferior ao observado para XGCd.

Quando se compara o efeito das xiloglucanas nativas com as suas frações desgalactosiladas correspondentes, observa-se que a remoção das unidades de galactose não influenciou nitidamente a resposta para XGC e XGJ em relação à produção de óxido nítrico. Porém, a resposta dos macrófagos quanto à produção de NO<sup>•</sup> na presença de XGT e XGTd diferem entre si. Na maior concentração (50 µg/mL), a fração nativa (XGT) não estimulou esta via, enquanto que a fração modificada foi capaz de aumentar a produção de NO<sup>•</sup> em aproximadamente 280%.

Apesar de XGC apresentar os mesmos oligossacarídeos de XGT, há diferença na proporção dos mesmos, o que, conseqüentemente, proporciona uma diferença na estrutura fina, e isto deve ter favorecido esta variação de intensidade na produção de NO<sup>•</sup>. Porém, em relação às frações modificadas correspondentes (XGCd e XGTd), ambas foram capazes de estimular intensamente a produção deste radical, sugerindo que a mudança conformacional gerada pela remoção de galactose promoveu uma conformação favorável à xiloglucana de *T. indica* para o aumento da produção de NO<sup>•</sup>, enquanto que esta alteração conformacional não se mostrou significativa para XGCd e XGJd.

A



B

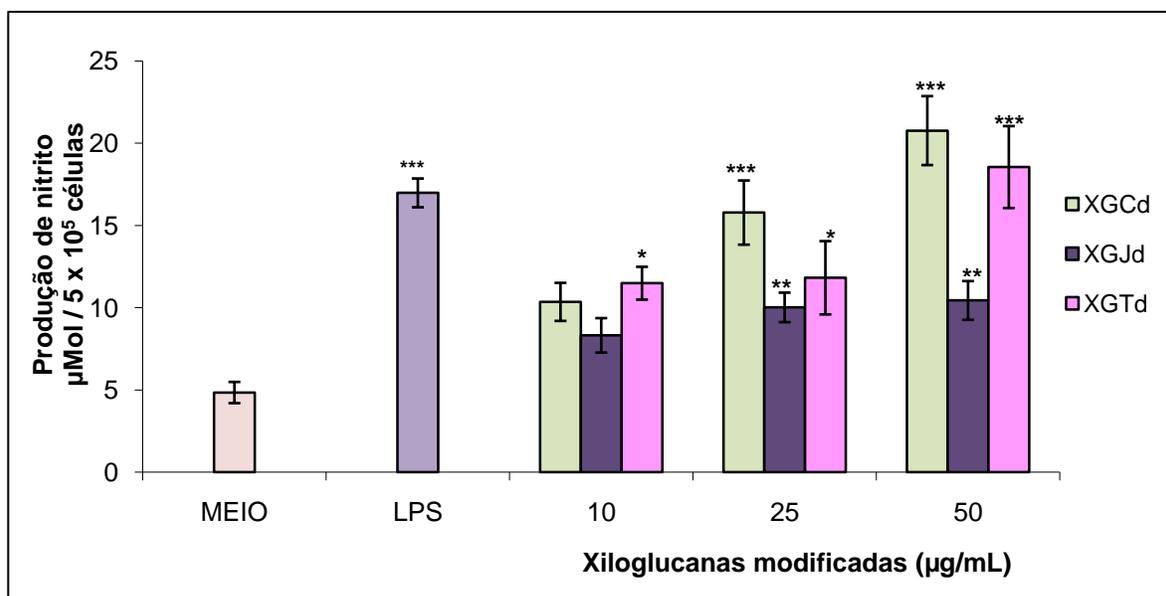


FIGURA 33 – EFEITO DAS XILOGLUCANAS NATIVAS OBTIDAS DAS SEMENTES DE *T. indica* (A) E MODIFICADAS OBTIDAS DAS SEMENTES DE *C. langsdorffii*, *H. courbaril* E *T. indica*. (B) SOBRE A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS

FONTE: O Autor (2010).

NOTA: Macrófagos aderentes foram incubados por 48 h, em meio MEM suplementado com 5% de soro fetal bovino, antibióticos e os polissacarídeos nas concentrações estipuladas. Utilizou-se como controle negativo o meio MEM e como controle positivo o LPS (50ng/mL). O NO<sup>•</sup> produzido foi quantificado no sobrenadante como nitrito pelo método de Griess. A absorbância foi medida em 550 nm. Os resultados estão expressos como média ± EP de quatro experimentos independentes, cada um em quadruplicata. \*, \*\*, \*\*\* Diferença significativa do Meio MEM: (p ≤ 0,05), (p ≤ 0,02), (p ≤ 0,01) respectivamente.

Na Figura 34 pode-se observar que, ao contrário do que foi observado para as xiloglucanas obtidas das sementes de *C. langsdorffii*, a xiloglucana estrutural, proveniente da mesma espécie, não estimulou a produção de NO<sup>•</sup> por macrófagos. A diferença da xiloglucana estrutural em relação aos polímeros de reserva consiste na presença de L-fucose além de unidades de glucose, xilose e galactose em sua composição monossacarídica. Os macrófagos expressam em sua superfície diversos receptores, dentre eles, o receptor manose, o qual pertence à classe de receptores com domínios lectina e são capazes de reconhecer unidades de manose, bem como, unidades de fucose (TAYLOR *et al.* 2005). A partir do resultado obtido no presente trabalho, pode-se sugerir que a xiloglucana fucosilada não interfere na ativação da produção de NO<sup>•</sup>. No entanto, não foram realizados testes para verificar se a interação deste polímero seria via receptor de manose/fucose. Vale ressaltar que somente a presença do monossacarídeo não significa que ocorrerá interação do polímero com o receptor, é necessário que haja uma conformação adequada para a ligação ocorrer.

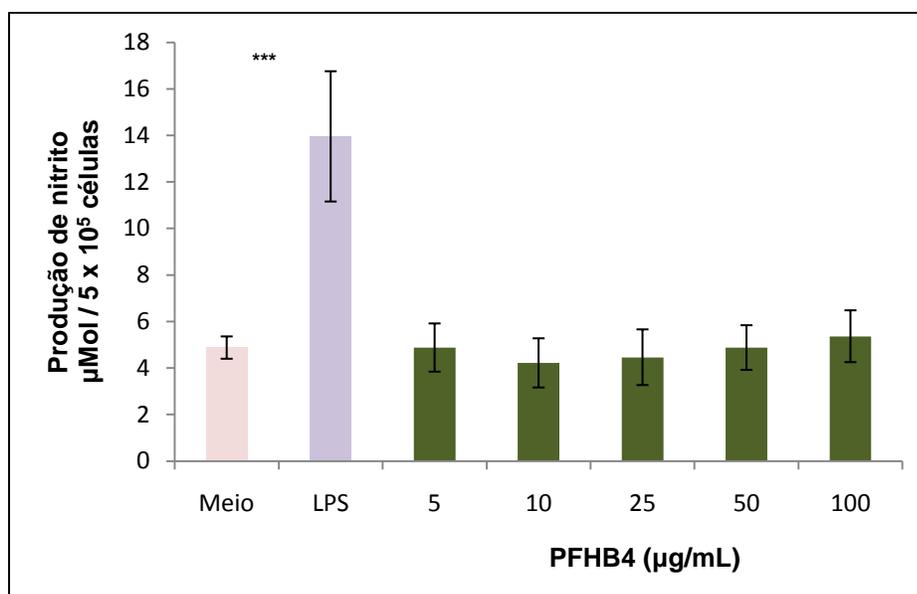


FIGURA 34 – EFEITO DA XILOGLUCANA ESTRUTURAL PFHB4 OBTIDA DAS FOLHAS DE *C. langsdorffii* SOBRE A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS

FONTE: O Autor (2010)

NOTA: Macrófagos aderentes foram incubados por 48 h, em meio MEM suplementado com 5% de soro fetal bovino, antibióticos e os polissacarídeos nas concentrações estipuladas. Utilizou-se como controle negativo o meio MEM e como controle positivo o LPS (50ng/mL). O NO<sup>•</sup> produzido foi quantificado no sobrenadante como nitrito pelo método de Griess. A absorbância foi medida em 550 nm. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EP de três experimentos independentes, cada um em triplicata.

Diferente do que foi observado para fração obtida das folhas de *C. langsdorffii*, um heteropolissacarídeo proveniente da fração aquosa do chá de *G. pentaphyllum* aumentou em cinco vezes a produção de NO<sup>•</sup> na concentração de 50 µg/mL, atingindo um aumento de treze vezes na maior concentração (500 µg/mL) quando comparado ao grupo controle (YANG *et al.* 2008).

O polissacarídeo ácido isolado da raiz da *Angelica sinensis*, nas concentrações de 10, 100 e 500 µg/mL, promoveu um aumento dose-dependente, na produção de NO<sup>•</sup> (YANG *et al.*, 2007), tão intenso quanto o observado para as xiloglucanas XGCd e XGTd. Neste trabalho, os autores incubaram as células com o polissacarídeo juntamente com um inibidor específico da enzima iNOS (óxido nítrico sintase indizível) e observaram a redução do estímulo, sugerindo que o polímero estudado ativa a produção de NO<sup>•</sup> através da indução da expressão do gene da iNOS (YANG *et al.*, 2007).

A intensidade do efeito observado para XGCd foi similar ao obtido para um polissacarídeo constituído por glucose, manose e galactose, isolado do corpo frutífero do cogumelo *Phellinus lintheus*, o qual estimulou a produção de NO<sup>•</sup>, na concentração de 50 µg/mL, semelhante ao LPS (200 ng/mL), utilizado como controle positivo da reação (KIM *et al.*, 2004).

Uma resposta semelhante, porém em menor intensidade, ocorreu com a galactomanana do líquen *Ramalina celastri*, a qual aumentou a produção de NO<sup>•</sup> em aproximadamente 40%, em todas as concentrações testadas (10- 250 µg/mL), quando comparadas com as células não tratadas (NOLETO *et al.*, 2002).

No presente trabalho, além da produção e liberação de ânion superóxido e óxido nítrico, foi avaliado o efeito das xiloglucanas nativas (XGC, XGJ e XGT) e das xiloglucanas desgalactosiladas (XGCd, XGJd e XGTd) em macrófagos peritoneais de camundongos quanto à produção de fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), interleucina-1 beta (IL-1β) e interleucina-6 (IL-6).

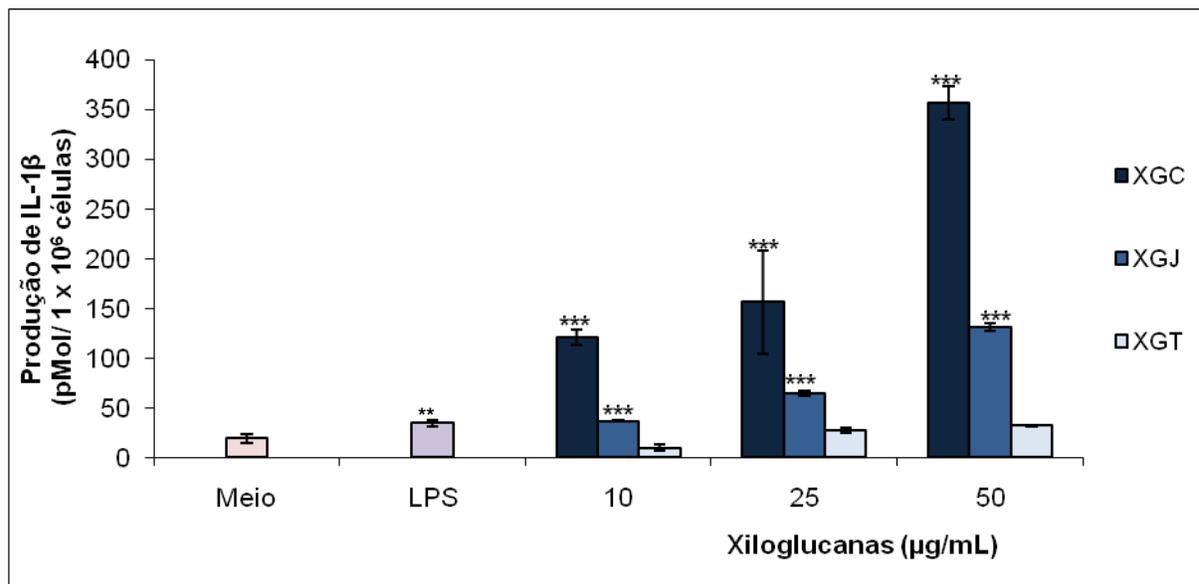
#### 5.4.5 Produção de citocinas

Os macrófagos são as maiores fontes de IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ . Macrófagos ativados são capazes de destruir células tumorais, sendo este efeito atribuído ao TNF- $\alpha$ . Por outro lado, IL-1 tem um efeito citostático e citotóxico, e IL-6 é considerado um dos principais mediadores imunológicos e inflamatórios. As três citocinas estão relacionadas entre si e são liberadas por macrófagos quando ativados por estímulos específicos, como LPS, outras citocinas e diferentes polissacarídeos, entre outros (MINTER; WESSELS; MOLDAWER, 2001; SONG *et al.*, 2002). Neste trabalho, os níveis destas citocinas foram determinados no sobrenadante de macrófagos peritoneais tratados por 24h com xiloglucanas nativas e desgalactosiladas nas concentrações de 10, 25 e 50  $\mu\text{g/mL}$ . Os resultados de tais avaliações estão apresentados nas figuras 35-37.

A Figura 35A mostra o efeito das xiloglucanas nativas na produção de IL-1 $\beta$ . Na menor concentração (10  $\mu\text{g/mL}$ ) de XGC houve um aumento de 522%, na produção de IL-1 $\beta$ , quando comparado com o grupo controle. Este efeito mostrou-se dose-dependente atingindo 1704% na maior concentração testada (50  $\mu\text{g/mL}$ ). Para XGJ, foi evidenciado o aumento da produção IL-1 $\beta$ , de 232% e 577% nas concentrações de 25  $\mu\text{g/mL}$  e 50  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. No caso da XGT, o estímulo da produção IL-1 $\beta$  foi inferior aos das outras xiloglucanas, sendo observado um aumento de apenas 65% na concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$ , quando comparada ao grupo controle. Os resultados da produção de IL-1 $\beta$  para os macrófagos tratados com as xiloglucanas desgalactosiladas estão apresentados na Figura 35B.

Diferente do observado para XGC e XGJ, para XGCd, em todas as concentrações testadas, não foi observado estímulo significativo, enquanto que para XGJd, somente na maior concentração apresentou aumento significativo de 104% na produção da citocinas, quando comparado com um aumento de 577% para XGJ na mesma concentração. Por outro lado, diferente da resposta da fração nativa (XGT), XGTd mostrou o maior aumento da produção de IL-1 $\beta$  quando comparado com todos os polissacarídeos testados.

A



B

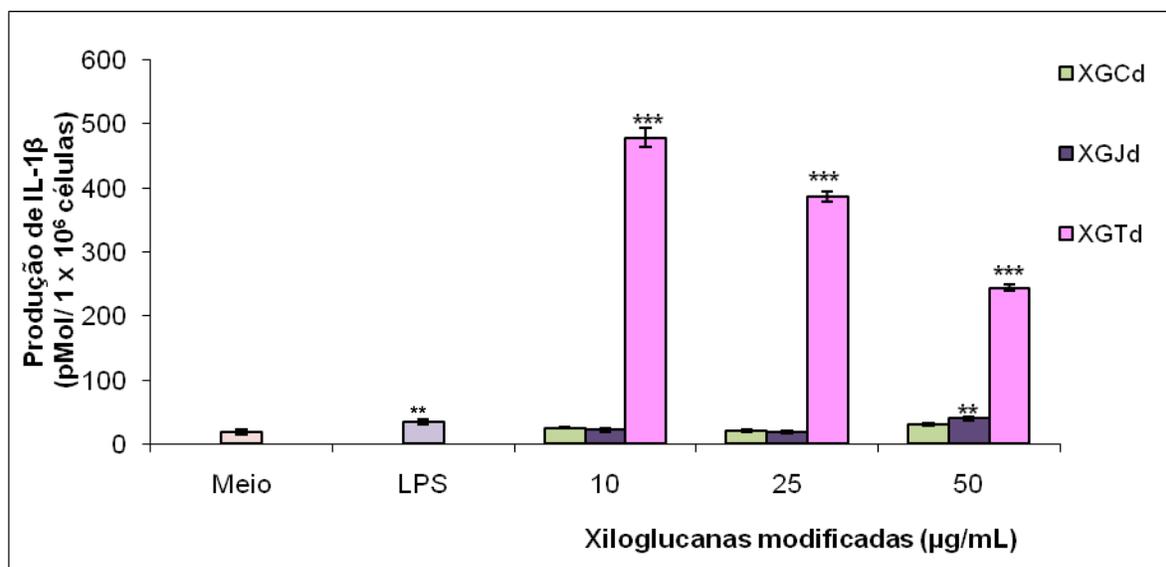


FIGURA 35 – EFEITO DAS XILOGLUCANAS NATIVAS (A) E MODIFICADAS OBTIDAS DAS SEMENTES DE *C. langsdorffii*, *H. courbaril* E *T. indica*. (B) SOBRE A PRODUÇÃO DE IL-1 BETA.

FONTE: O Autor (2010).

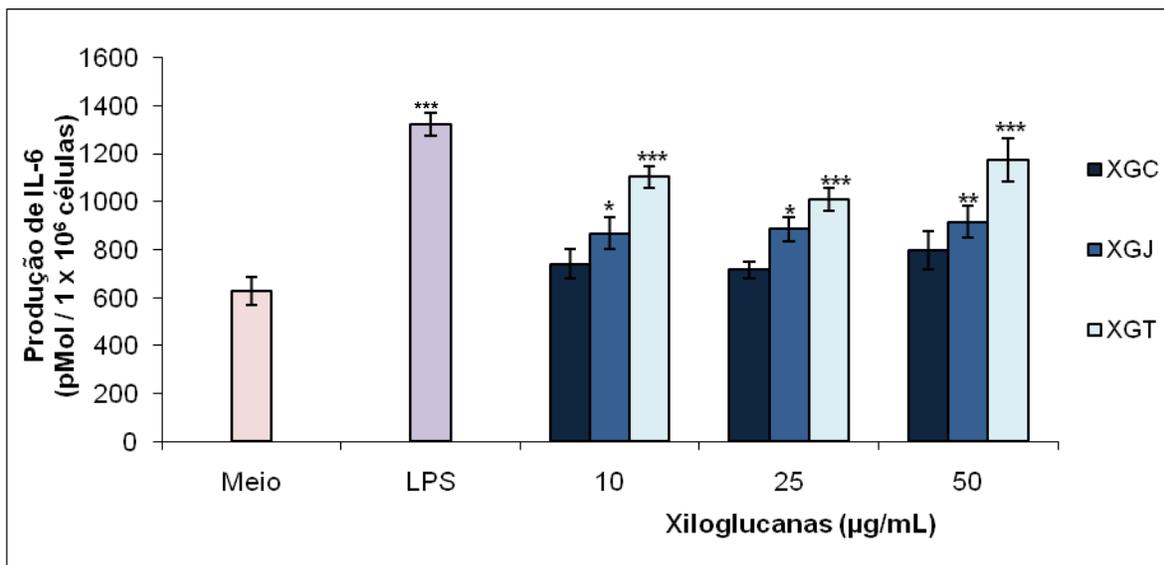
NOTA: Macrófagos aderentes foram incubados por 24 h, em meio MEM suplementado com 5% de soro fetal bovino, antibióticos e os polissacarídeos (A) XGC, XGJ e XGT e (B) XGCd, XGJd e XGTd nas concentrações estipuladas. Utilizou-se como controle negativo o meio MEM e como controle positivo o LPS (100ng/mL). O sobrenadante foi coletado e utilizado para mensurar, através de kit de ELISA, a quantidade de IL-1β produzida. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EP de dois experimentos independentes, cada um em quadruplicata. \*\* e \*\*\* Diferença significativa do controle negativo: ( $p \leq 0,02$ ) e ( $p \leq 0,01$ ) respectivamente.

Observa-se o aumento da produção de IL-1 $\beta$  em aproximadamente 2370% e 1160% quando comparado ao grupo controle nas concentrações de 10 e 50  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Estes resultados sugerem que a remoção das unidades de galactose interferiu diretamente na ativação de macrófagos para a produção de IL-1 $\beta$ .

A resposta para produção de IL-6 (Figura 36) foi diferente da observada para IL-1 $\beta$ . O polissacarídeo XGC não estimulou significativamente a produção desta citocinas, enquanto que sua fração desgalactosilada correspondente (XGCd) promoveu aumento de IL-6, somente na menor concentração (10  $\mu\text{g/mL}$ ), em 40% quando comparado ao controle. Em todas as concentrações testadas de XGJ pode-se observar um aumento de aproximadamente 40% na produção de IL-6, efeito este similar ao verificado para a respectiva fração desgalactosilada. Macrófagos tratados com XGT estimularam a produção de IL-6 em aproximadamente 75%, 60% e 85% nas concentrações de 10, 25 e 50  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Quando comparada com a fração desgalactosilada, observa-se que XGTd, promoveu um efeito semelhante, aumentando a produção de IL-6, em aproximadamente 83%, 85% e 76%, respectivamente, nas mesmas concentrações acima citadas. Em relação à produção de IL-6 a remoção das unidades de galactose parece não interferir diretamente na ativação de macrófagos para a produção desta citocina, exceto para XGC que após ser desgalactosilada estimulou esta via.

A produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos tratados com xiloglucanas nativas e modificadas está ilustrada na Figura 37A. XGC promoveu um aumento dose-dependente na produção de TNF- $\alpha$  de 119% a 220%, em concentrações de 10 a 50  $\mu\text{g/mL}$ , em relação ao grupo controle. Para XGJ, nas concentrações de 25 e 50  $\mu\text{g/mL}$  foi observado um aumento significativo para produção de TNF- $\alpha$  de 27% e 58%, respectivamente. No que se refere à produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos tratados com XGT, observa-se que, somente a máxima concentração testada, promoveu aumento significativo, atingindo 35%. Na Figura 37B, pode-se observar que os macrófagos tratados com as frações desgalactosiladas responderam diferente quando comparado com as células tratadas com as xiloglucanas nativas. Enquanto XGC e XGJ estimularam a produção de TNF- $\alpha$ , suas frações desgalactosiladas correspondentes, XGCd e XGJd, não promoveram significativamente o aumento desta citocina.

A



B

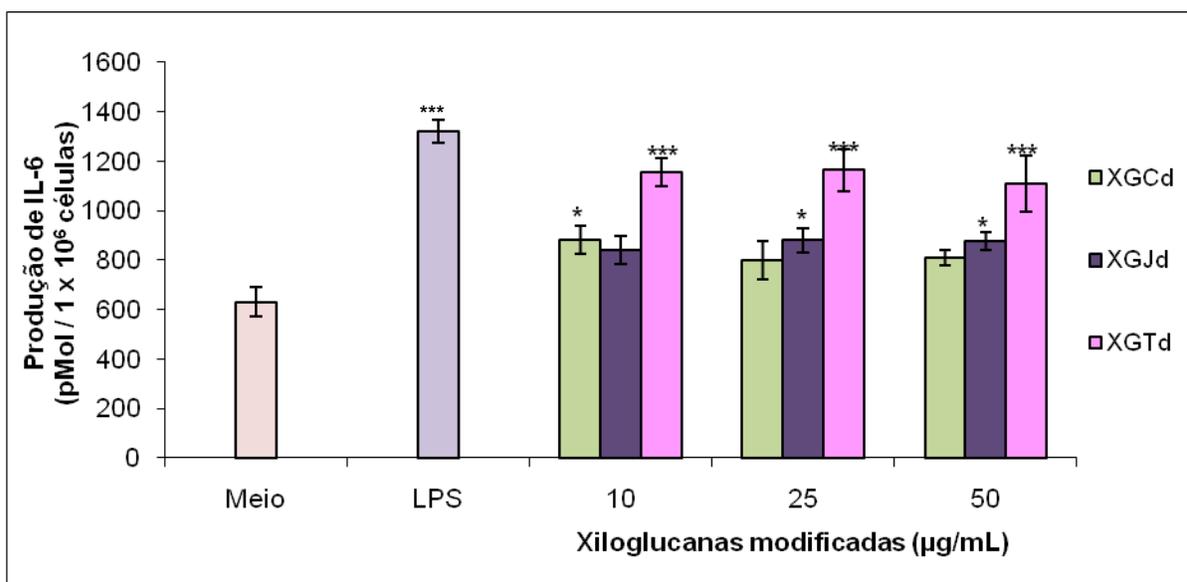
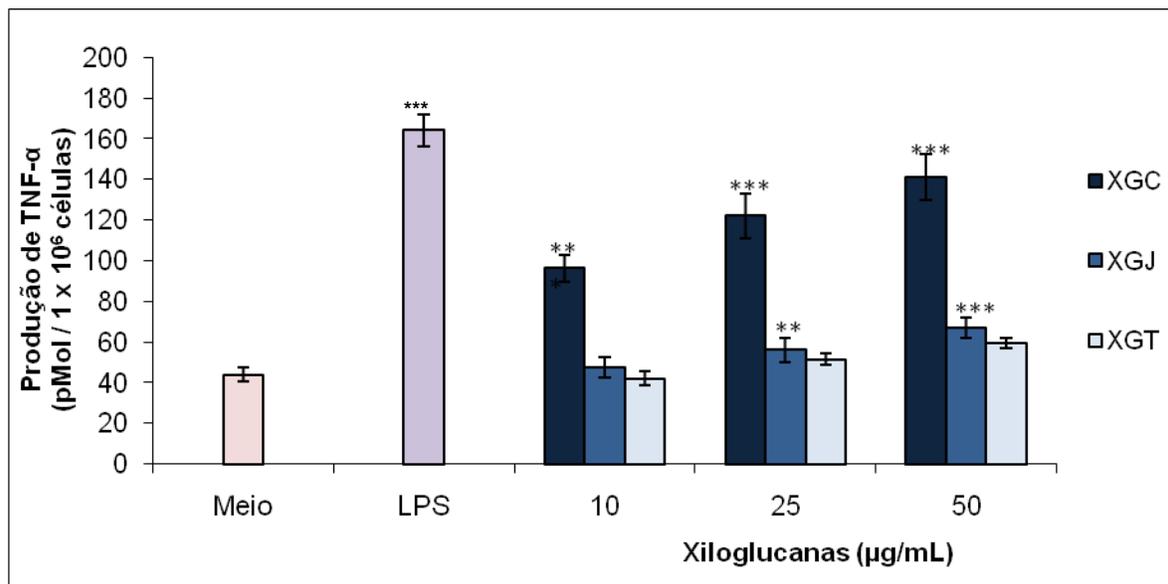


FIGURA 36 – EFEITO DAS XILOGLUCANAS NATIVA (A) E MODIFICADAS OBTIDAS DAS SEMENTES DE *C. langsdorffii*, *H. courbaril* E *T. indica*. (B) SOBRE A PRODUÇÃO DE IL-6 POR MACRÓFAGOS.

FONTE: O autor (2010).

NOTA: Macrófagos aderentes foram incubados por 24 h, em meio MEM suplementado com 5% de soro fetal bovino, antibióticos e os polissacarídeos (A) XGC, XGJ e XGT e (B) XGCd, XGJd e XGTd nas concentrações estipuladas. Utilizou-se como controle negativo o meio MEM e como controle positivo o LPS (100ng/mL). O sobrenadante foi coletado e utilizado para mensurar, através de kit de ELISA, a quantidade de IL-6 produzida. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EP de dois experimentos independentes, cada um em quadruplicata. \*, \*\*, \*\*\* Diferença significativa do controle negativo: (p  $\leq$  0,05), (p  $\leq$  0,02), (p  $\leq$  0,01) respectivamente.

A



B

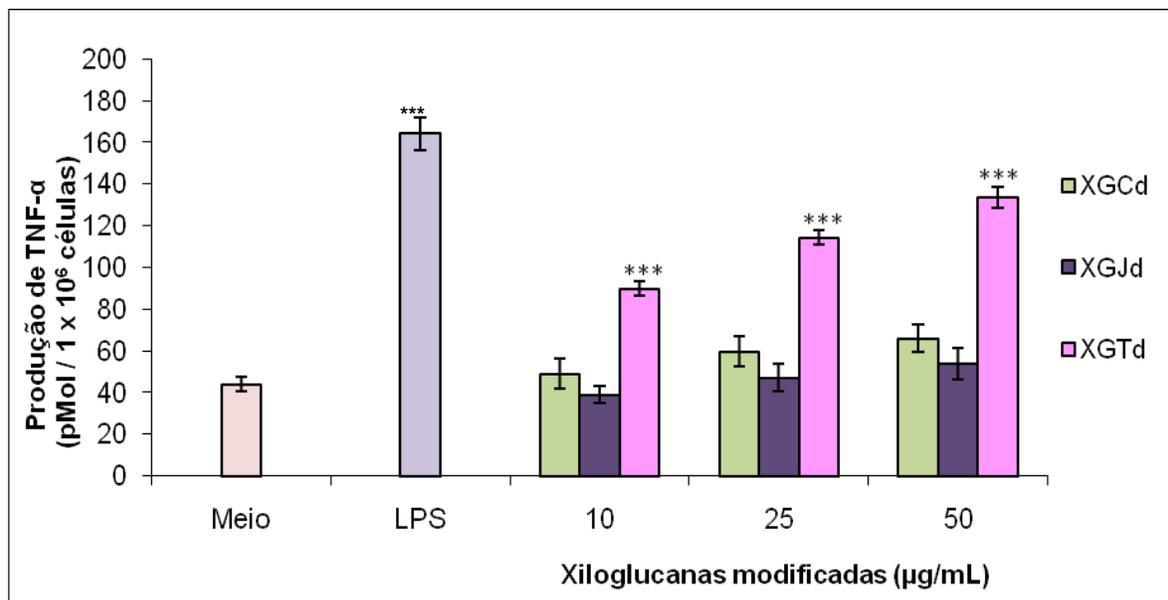


FIGURA 37 – EFEITO DAS XILOGLUCANAS NATIVAS OBTIDA DAS SEMENTES (A) E MODIFICADAS OBTIDAS DAS SEMENTES DE *C. langsdorffii*, *H. courbaril* E *T. indica*. (B) SOBRE A PRODUÇÃO DE TNF-ALFA POR MACRÓFAGOS

FONTE: O autor (2010).

NOTA: Macrófagos aderentes foram incubados por 24 h, em meio MEM suplementado com 5% de soro fetal bovino, antibióticos e os polissacarídeos (A) XGC, XGJ e XGT e (B) XGCd, XGJd e XGTd nas concentrações estipuladas. Utilizou-se como controle negativo o meio MEM e como controle positivo o LPS (100ng/mL). O sobrenadante foi coletado e utilizado para mensurar, através de kit de ELISA, a quantidade de TNF- $\alpha$  produzida. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EP de dois experimentos independentes, cada um em quadruplicata. \*\*, \*\*\* Diferença significativa do controle negativo: ( $p \leq 0,02$ ), ( $p \leq 0,01$ ) respectivamente

O efeito oposto foi observado para os polissacarídeos provenientes das sementes de *T. indica*, enquanto XGT somente estimulou na máxima concentração, XGTd aumentou de maneira dose-dependente a produção de TNF- $\alpha$  atingindo 104% a 203% para as concentrações de 10 a 50  $\mu\text{g/mL}$ .

Quando se analisa a resposta produzida pelos macrófagos tratados por XGC e XGT, observam-se efeitos opostos. Isto é, XGC estimulou a produção de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  enquanto que XGT estimulou a somente a produção de IL-6. Este comportamento foi observado por SONG *et al.* (2002), que avaliaram a ativação de macrófagos tratados com polissacarídeos de ginseng, através da expressão de mRNAs das três citocinas. Os autores concluíram que IL-1 $\beta$  ou TNF- $\alpha$  podem induzir a produção de IL-6, enquanto que TNF- $\alpha$  pode induzir IL-1 $\beta$ . Entretanto IL-6 não induz IL-1 $\beta$  ou TNF- $\alpha$ , mas pode suprimir sua produção por macrófagos. Este efeito de supressão já havia sido relatado por SCHINDLER *et al.* (1990).

O único polissacarídeo testado no presente trabalho que foi capaz de estimular a produção das três citocinas (IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ ) foi a xiloglucana de *T. indica* desgalactosilada (XGTd). Esse comportamento não pode ser atribuído a ausência das unidades de galactose, pois, se assim fosse, essa resposta também deveria ser observada para as frações XGCd e XGJd. Entretanto, sugere-se que estas diferenças nas respostas biológicas entre as xiloglucanas nativas e desgalactosiladas estejam relacionadas ao aspecto conformacional do polímero. A ativação concomitante das três citocinas em macrófagos quando tratados com polissacarídeos já foi amplamente descrita na literatura (WAKABAYASHI *et al.*, 1997; LEUNG *et al.*, 2004; SCHEPETIKNS *et al.*, 2005).

Diferenças na ativação de macrófagos entre frações com características estruturais semelhantes foram descritas para duas frações polissacarídicas extraídas das pétalas de *Carthamus tinctorius*, as quais apresentavam as mesmas unidades monossacarídicas (ramnose, arabinose, xilose manose, galactose e glucose) em diferentes proporções. Estas moléculas ativaram a produção de óxido nítrico de maneira semelhante, entretanto, foi relatado que a fração a qual apresenta maior quantidade de unidades de glucose foi capaz de ativar a produção de IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ , de forma equivalente as células tratadas por LPS. A outra fração isolada, a qual

apresentava como componente majoritário unidades de arabinose, ativou fracamente a produção de IL-6 e não estimulou a produção de IL-1 e TNF- $\alpha$  (WAKABAYASHI *et al.*, 1997).

Leung *et al.*, (2004) estudaram os efeitos biológicos de três frações polissacarídicas extraídas das folhas da planta *Aloe vera*. As frações apresentavam manose como monossacarídeo majoritário. No que se refere à produção de citocinas, os autores relatam que, dependendo da fração utilizada, a produção de IL-1 $\beta$ , por macrófagos peritoneais, apresentou uma variação de intensidade de 19166 - 31366% quando comparado com o grupo controle, intensidade similar ao observado para o LPS. A intensidade de TNF- $\alpha$  foi quantitativamente superior a de IL-1 $\beta$ , variando entre 114300 - 142200% quando comparado ao controle. Já a produção de IL-6 foi avaliada em linfócitos T e B tratados com as diferentes frações dos polissacarídeos, que promoveram aumento que variaram entre 21600 - 27300%. Anteriormente a este trabalho, foi relatado que o polissacarídeo obtido do suco comercial desta mesma espécie, denominado Aloiride, apresentava composição monossacarídica distinta dos polissacarídeos obtidos por Leung *et al.* (2004), constituída por unidades de glucose (37,2%), galactose (23,9%), manose (19,5%) e arabinose (10,3%) (PUGH *et al.*, 2001). Entretanto, as respostas biológicas obtidas para o Aloiride corroboram com os resultados acima descritos, pois o polissacarídeo foi capaz de induzir a expressão do mRNA o qual codifica IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  de forma similar ao estímulo provocado pelo LPS (PUGH *et al.*, 2001).

Cinco frações de arabinogalactanas extraídas de folhas e sementes de *Juniperus scopolorum*, apresentando massas molares distintas de 30, 60, 100, 200 e 680 kDa, mostraram-se capazes de ativar macrófagos. Todas as frações foram capazes de estimular em diferentes intensidades a produção de ROS e NO $^{\bullet}$  em macrófagos, entretanto somente as duas frações, as quais apresentavam a maior massa molar, foram capazes de estimular a produção de citocinas inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-12) bem como, antiinflamatórias (IL-10), na concentração de 200  $\mu$ g/mL, em macrófagos da linhagem J774.A (SCHEPETIKNS *et al.*, 2005).

Xie *et al.* (2008) isolaram cinco heteropolissacarídeos das folhas de *Artemisia tripartita*, as quais apresentaram as mesmas unidades monossacarídicas, constituídas

majoritariamente por xilose, arabinose, galactosamina, galactose e glucose em diferentes proporções. Além das diferenças na composição, as frações distinguem-se quanto à quantidade de sulfato e a massa molar (49 – 355 kDa). Todas as frações foram capazes de ativar macrófagos quanto à produção de ROS, NO<sup>•</sup>, IL-6, IL-12 e TNF- $\alpha$ , porém, estes estímulos apresentaram diferentes intensidades para cada fração. Quanto à produção das citocinas, os macrófagos foram tratados com 800  $\mu$ g/mL dos polissacarídeos, e a fração que apresentava maior massa molecular (355 kDa) promoveu o maior estímulo na produção de IL-6, enquanto que a fração com 49 kDa promoveu o maior aumento de TNF- $\alpha$  (XIE *et al.* 2008). Esses resultados mostram que, apesar dos polissacarídeos apresentarem similaridades na sua constituição, diferenças na massa molar, estrutura fina e conformação são capazes de influenciar diretamente na resposta biológica, efeito observado com as xiloglucanas no presente trabalho.

Wang *et al.* (2010) analisaram a atividade antitumoral mediado pela ação de macrófagos na presença de um polissacarídeo ácido isolado do ginseng. Além da produção de NO<sup>•</sup>, também foi avaliado o aumento da produção das interleucinas 1 e 6, bem como do TNF- $\alpha$ . Na concentração de 100  $\mu$ g/mL, o polissacarídeo isolado estimulou a produção de IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  com a mesma intensidade do LPS. Este efeito pode ser comparado com as xiloglucanas XGC e XGTd, pois estes polissacarídeos apresentaram intensidades de resposta similar ao produzido pelo LPS, em relação à produção de IL-6 e TNF- $\alpha$ , porém, diferente do polissacarídeo oriundo do ginseng, estimularam a produção de IL-1 $\beta$  com maior intensidade que o controle positivo.

Na Tabela 8 estão resumidos os resultados obtidos quanto à produção de NO<sup>•</sup>, IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  das xiloglucanas nativas e desgalactosiladas de *C. langsdorffii*, *H. courbaril* e *T. indica*.

TABELA 8 – RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS A PARTIR DAS XILOGLUCANAS NATIVAS E MODIFICADAS NA PRODUÇÃO DE NO<sup>o</sup>, IL-1, IL-6 E TNF- $\alpha$ 

Espécie	Proporção	Sigla	Concentração	(% ) Aumento da atividade em relação ao controle			
				NO <sup>o</sup>	IL-1	IL-6	TNF- $\alpha$
<i>C. langsdorffii</i>	Nativa		10 $\mu$ g/mL	262***	522*	17,5	118,9***
	Glc : Xyl : Gal	XGC	25 $\mu$ g/mL	300***	706,6*	13,7	177,5***
	4 : 2,5 : 1,6		50 $\mu$ g/mL	307***	1740**	26,8	220,7***
	Modificada		10 $\mu$ g/mL	113,6	29,1	40*	11
	Glc : Xyl : Gal	XGCd	25 $\mu$ g/mL	225,5***	10,9	27,3	35,2
	4 : 3,5 : 0,4		50 $\mu$ g/mL	324,2***	60,8	28,5	50
<i>H. courbaril</i>	Nativa		10 $\mu$ g/mL	80	89*	38,1*	8,4
	Glc : Xyl : Gal	XGJ	25 $\mu$ g/mL	85*	232,1***	40,9*	27,5**
	4 : 2,7 : 1,1		50 $\mu$ g/mL	92*	577,4***	45,6**	57,5***
	Modificada		10 $\mu$ g/mL	71,7	112	33,2	NE
	Glc : Xyl : Gal	XGJd	25 $\mu$ g/mL	106,7**	NE	40,3*	6
	4 : 3,2 : 0,2		50 $\mu$ g/mL	115,4**	104***	39,3*	22
<i>T. indica</i>	Nativa		10 $\mu$ g/mL	52,8	NE	75,4***	NE
	Glc : Xyl : Gal	XGT	25 $\mu$ g/mL	99,8*	39,1	60,4***	16,9
	4 : 2,7 : 1,1		50 $\mu$ g/mL	72,9	65*	86,6***	35,8
	Modificada		10 $\mu$ g/mL	137*	2373***	83,7***	104***
	Glc : Xyl : Gal	XGTd	25 $\mu$ g/mL	143,81*	1897***	84,9***	160***
	4 : 3,1 : 0,4		50 $\mu$ g/mL	282,6***	1159**	76,5***	203***

FONTE: O Autor (2010)

\*, \*\*, \*\*\* Diferença significativa do controle negativo: ( $p \leq 0,05$ ), ( $p \leq 0,02$ ), ( $p \leq 0,01$ ) respectivamente

## 5.5 DISCUSSÃO FINAL

No presente trabalho foram isoladas xiloglucanas de reserva nativas e modificadas por desgalactosilação, as quais foram avaliadas quanto aos possíveis efeitos em relação à ativação de macrófagos peritonias de comundongos, com o objetivo de verificar se modificações estruturais interferem nas diferentes vias características do processo de ativação de macrófagos e ainda se esses polímeros poderiam agir como possíveis modificadores da resposta biológica.

Diversos estudos de atividades biológicas utilizando diferentes polissacarídeos isolados das mais variadas fontes sugerem que os efeitos observados podem estar diretamente correlacionados com as características estruturais e físico-químicas destas

moléculas, dentre as quais se destacam a composição monossacarídica, o grau de ramificação, os tipos de ligações e a solubilidade (BOHN; BeMILLER, 1995; TZIANABOS, 2000; SCHEPETKINS; QUINN, 2006). Esta proposição é evidenciada principalmente quando se avalia a ativação de macrófagos por polissacarídeos de diferentes classes como beta e alfa-glucanas, mananas, acemanana, galactomananas, arabinogalactanas, polissacarídeos sulfatados natural ou quimicamente modificados e xiloglucanas (NOLETO *et al.*, 2002; STUELP-CAMPELO *et al.*, 2002; MORETÃO *et al.*; 2003; 2004; LEUNG *et al.*, 2004; YANG *et al.* 2008; MELLINGER *et al.*, 2005; 2008; AKRAMIENE *et al.*, 2007; ROSÁRIO *et al.*; 2008; KANGUSSU-MARCOLINO, 2010; SILVEIRA, 2010). As respostas de macrófagos a estas moléculas podem ser observadas através de interferência na produção de ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ), síntese e liberação de citocinas, capacidade fagocítica, entre outras (MORETÃO *et al.*; 2003; MELLINGER *et al.*, 2005; SCHEPETKINS; QUINN, 2006; SCHEPETKINS *et al.*, 2008; YANG *et al.* 2008; XIE *et al.* 2008).

A ativação de diferentes vias de macrófagos são dependentes dos receptores expressos na superfície dos macrófagos para ligação do polissacarídeo. Sabe-se que a interação ligante receptor é específica e se dá de forma quimicamente complementar, assim variações nos tipos de ligações glicosídicas, grau de ramificação e massa molar podem alterar a estrutura do polímero tornando-o com maior ou menor afinidade para ligar ao receptor na superfície destas células e conseqüentemente influenciar na resposta celular. No entanto, o mecanismo de interação entre polissacarídeos e receptores na superfície de macrófagos é complexo e ainda não está totalmente compreendido. Entretanto, sugere-se que polissacarídeos derivados de plantas ativam macrófagos via receptor, os quais já foram caracterizados, ou por outra estrutura alvo na superfície celular, que ainda possa ser desconhecida (TAYLOR *et al.* 2005; SCHEPETKIN; QUINN, 2006, SCHEPETKIN *et al.*, 2008). O potente efeito estimulatório de macrófagos por moléculas que apresentam alta massa molar pode estar relacionado com as unidades repetitivas presentes na sua estrutura, as quais podem ligar-se a receptores ou a outro alvo na membrana celular (LEUNG, 2004).

O presente trabalho está focado na natureza fenomenológica ao invés do mecanismo de ação dos polímeros na ativação de macrófagos. Neste sentido, o efeito

de xiloglucanas nativas e modificadas na ativação de macrófagos peritoneais de camundongos foi avaliado para a produção de ânion superóxido, óxido nítrico, atividade fagocítica e produção de citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ). Xiloglucanas provenientes dos cotilédones das sementes de *C. langsdorffii* (XGC), *H. courbaril* (XGJ) e *T. indica* (XGT), bem como, as xiloglucanas modificadas (XGCd, XGJd e XGTd), as quais foram obtidas pelo tratamento enzimático dos polissacarídeos nativos, de uma forma geral induziram diferenças na ativação de macrófagos nos parâmetros avaliados. Os resultados mostraram que cada polissacarídeo apresentou características singulares de ativação, isto é, estimulando ou não cada via, com diferentes intensidades de resposta em diferentes concentrações.

Embora os polissacarídeos testados tenham uma composição química semelhante, diferenças na massa molar e estrutura fina das mesmas podem ser responsáveis pelas respostas distintas observadas nos experimentos de atividade biológica. Estudos sobre as estruturas finas de xiloglucanas das espécies *T. indica* L. e *C. langsdorffii* L., mostraram que estas apresentam um padrão estrutural semelhante em relação aos oligossacarídeos que as constituem, compostas pelas subunidades Glc<sub>4</sub> (XXXG, XLXG, XXLG e XLLG). A análise dos oligossacarídeos obtidos por tratamento enzimático das xiloglucanas provenientes das sementes de *C. langsdorffii* indica principalmente a presença de XXXG, XLXG, XXLG e XLLG na proporção de 1,0: 1,1: 1,8: 7,4 e 1,0: 1,3: 2,6: 12, para sementes provenientes da savana e da floresta, respectivamente. Para a xiloglucana de *T. indica* a proporção de oligossacarídeos XXXG, XLXG, XXLG e XLLG foi de 1: 0,4-0,5: 2,1-2,2: 3,1-3,4 (BUCKERIDGE *et al.*, 1992; MARRY *et al.*, 2003; REN *et al.*, 2005; OLIVEIRA JUNIOR *et al.*, 2006). Já, as xiloglucanas presentes nas sementes de *H. courbaril* L. apresentam características únicas. Nestas sementes, cerca de 50% da estrutura da xiloglucana é composta de uma família de oligossacarídeos pertencentes à série XXXXG, portanto Glc<sub>5</sub>, as quais apresentam substituições por unidades de galactose (BUCKERIDGE *et al.*, 1997; TINÉ *et al.*, 2003; FREITAS *et al.*, 2005). Além deste oligossacarídeo, também foi caracterizado a série XXXXXG (Glc<sub>6</sub>) e determinado as proporções de Glc<sub>4</sub>: Glc<sub>5</sub>: Glc<sub>6</sub>, sendo de 2:1: 0,2. Neste mesmo estudo, através de digestão incompleta, também foi observado os tipos de dímeros formados entre as séries, obtendo como proporção de

Glc<sub>4</sub>-Glc<sub>4</sub> : Glc<sub>4</sub>-Glc<sub>5</sub> : Glc<sub>5</sub>-Glc<sub>5</sub>, de 3,1: 2,1: 1,0 (TINÉ *et al.*, 2006). Estas diferenças estruturais podem resultar em diferentes conformações, possibilitando diferentes respostas biológicas.

Os resultados encontrados nos estudos realizados por ROSÁRIO *et al.*, (2008), corroboram com os resultados no presente trabalho já que verificou-se que XGC em todas as concentrações ativaram a produção de NO<sup>\*</sup>, IL-1β e TNF-α, entretanto sua fração desgalactosilada correspondente não foi capaz de estimular a produção de citocinas. Xiloglucanas de *H. courbaril* nas formas nativa e desgalactosilada apresentaram efeitos similares na ativação de macrófagos, em todas as vias estudadas. Entretanto, a remoção das unidades de galactose influenciou a resposta das xiloglucanas de *T. indica*, intensificando a produção de NO<sup>\*</sup>, IL-1β, IL-6 e TNF-α. Pode-se sugerir que a mudança conformacional ocasionada pela remoção das unidades de galactose favoreceu a interação do polímero com os macrófagos, os quais se tornaram ativados e responderam através da produção de citocinas e espécies reativas de nitrogênio. A xiloglucana estrutural proveniente da parede celular das folhas de *C. langsdorffii*, cuja estrutura é diferente das xiloglucanas de reserva, principalmente por apresentar unidades de L-fucose não apresentou efeito nesta via.

Conforme descrito na revisão bibliográfica, muitos estudos vem sendo desenvolvidos utilizando xiloglucanas nativas e modificadas para a liberação controlada de fármacos (MIYAZAKI *et al.*, 1998; KAWASAKI *et al.*, 1999; MIYAZAKI *et al.*, 2001; TAKAHASHI *et al.*, 2002; SUMATHI; RAY, 2002; GHELARDI *et al.*, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2009; HIRUNA; TANTISHAIYAKUL; PICHAYAKORN, 2010). A partir dos resultados obtidos no presente estudo, os quais mostraram que estes polímeros não se comportam como uma substância inerte a resposta imunológica, a utilização dos mesmos como veículos para medicamentos pode representar aspectos positivos e negativos. Apesar de não ter sido avaliado o efeito sistêmico da ativação dos macrófagos na presença de xiloglucanas sugere-se que a interação deste polissacarídeo com medicamentos, os quais suprimem a resposta inflamatória, pode apresentar seus efeitos farmacológicos prejudicados. Entretanto, resultados promissores podem ser obtidos com a utilização das xiloglucanas como veículo para fármacos os quais pretendem estimular a resposta inflamatória, como, por exemplo,

aumentar a ação citotóxica dos macrófagos a patógenos e estimular efeitos anticarcinogênicos.

A ativação de macrófagos por polissacarídeos pode promover a inibição do crescimento e a metástase de células tumorais (KLIMP, 2002). As respostas do processo de ativação que envolve a produção de NO<sup>•</sup> e citocinas, incluindo, IL-1, IL-6, IL-12, e TNF estão relacionadas com a atividade anti-carcinogênica dos macrófagos (KLIMP, 2002; MORETÃO *et al.*, 2004; YANG *et al.*, 2008; MINTER; WESSELS; MOLDAWER, 2001; CHEN *et al.*, 2010). Através dos estímulos produzidos por macrófagos, na presença de xiloglucanas nativas e modificadas, a análise destes polissacarídeos na atividade anticarcinogênica pode mostrar resultados promissores. Estudos estão sendo desenvolvidos no Laboratório de Cultivo Celular, no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR para avaliar a aplicação destes polímeros na atividade antitumoral e leishmanicida.

## 6 CONCLUSÕES

1. Xiloglucanas de reserva (XGC, XGJ e XGT), com perfis homogêneos por HPSEC-MALLS/RI, foram isoladas dos cotilédones de *C. langsdorffii*, *H. courbaril* e *T. indica*.
2. Xiloglucanas modificadas (XGCd, XGJd e XGTd) foram obtidas a partir da desgalactosilação das xiloglucanas de reserva.
3. Xiloglucana fucosilada (PFHB4) foi obtida a partir de folhas de *C. langsdorffii* após processos de purificação por cromatografia de troca iônica e precipitação com reativo de Fehling.
4. As xiloglucanas de reserva nativas não exercem efeitos citotóxicos significativos para os macrófagos nas concentrações de 10-100  $\mu\text{g/mL}$  em 48 h de incubação, porém as moléculas desgalactosiladas mostraram ser mais citotóxicas para estas células alcançando aproximadamente 20% em 100  $\mu\text{g/mL}$  nas mesmas condições.
5. As xiloglucanas nativas e modificadas podem ser classificadas como modificadoras da resposta biológica, pois mostram-se capazes de ativar macrófagos em testes *in vitro*. Entretanto, a intensidade de ativação para cada parâmetro analisado é característica para cada polissacarídeo estudado;
  - ✓ Em relação à atividade fagocítica, somente a xiloglucana de *T. indica* na sua forma nativa (XGT) estimula esta via com uma intensidade de ~20 % na concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$ ;
  - ✓ XGT, XGCd, XGJd e XGTd reduzem a produção de ânion superóxido de macrófagos na presença de PMA e são capazes de estimular macrófagos quanto a produção de óxido nítrico em diferentes intensidades.

- ✓ Em relação à produção de citocinas houve uma variação de estímulo e de intensidade nos tratamentos de macrófagos com as diferentes xiloglucanas. XGC estimula a produção de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , enquanto que sua fração desgalactosilada correspondente não estimulou a produção de citocinas. XGJ e XGJd ativam macrófagos para a produção das três interleucinas. A produção de IL-1 $\beta$  e IL-6 foram aumentadas na presença de ambos XGT e XGTd, porém somente XGTd promoveu a produção de TNF- $\alpha$ .
6. A remoção das unidades de galactose de xiloglucana obtida de *C. langsdorffii* interfere ativação dos macrófagos para a produção das citocinas avaliadas. Entretanto a desgalactosilação da amostra proveniente das sementes de *T. indica* aumentou o estímulo da produção de citocinas e NO $^{\bullet}$ .

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J.S. *Immunologia celular e molecular*. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

ABEL, G.; CZOP, J. K. Stimulation of human monocytes  $\beta$ -glucan receptors by glucan particles induce production of TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . *International Immunopharmacology*, v. 14, p. 1363-1373, 1992.

ABOUGHE-ANGONE, S.; NGUEMA-ONA, E.; GHOSH, P.; LEROUGE, P.; ISHII, T.; RAYB, B.; DRIOUICHA, A. Cell wall carbohydrates from fruit pulp of *Argania spinosa*: structural analysis of pectin and xyloglucan polysaccharides. *Carbohydrate Research*, v. 343, p. 67-72, 2008.

ADAMS, D. O. Macrophages. *Methods in Enzymology*, v. 58, p. 494–506, 1979.

ADAMS, G. A. Complete acid hydrolysis. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, v. 5, p. 269-276, 1965.

ADACHI, Y.; OHNO, N.; YODAMAE, T. Inhibitory effect of  $\beta$ -glucan on zymosan-mediated hydrogen peroxide production by murine peritoneal macrophages *in vitro*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 16, p. 462-467, 1993.

AGGARWAL, B. B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Reviews*, v. 3, p. 745-756, 2003.

AJIWE, V. I. E.; OKEKE, C. A.; NNABUIKE, B.; OGUNLEYE, G. A.; ELEBO, E. Applications of oils extracted from african star apple (*Chrysophyllum africanum*), horse eye bean (*Mucuna sloanei*) and african pear (*Dacryodes edulis*) seeds. *Bioresource Technology*, v. 59, p. 259-261, 1997.

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Review*, v. 124, p. 783-801, 2006.

AKRAMIENE, D.; KONDROTAS, A.; DIDZIAPETRIENE, J.; KEVELAITIS, E. Apzvalginis Straipsnis: Effects of  $\beta$ -glucans on the immune system. *Medicina (Kaunas)*, v. 43, p. 587-606, 2007.

ALBERSHEIM, P. The walls of growing plant cells. *Scientific American*, v. 232, p. 80-94, 1975.

ANDERSON, C. T.; CARROLL, A.; AKHMETOVA, L.; SOMERVILLE, C. Real-time imaging of cellulose reorientation during cell wall expansion in arabidopsis roots. *Plant Physiology*, v. 152, p. 787-796, 2010.

ARA, T.; DeCLERCK, Y. A. Interleukin-6 in bone metastasis and cancer progression. *European Journal of Cancer*, v. 43, p. 1223-1231, 2010.

ARNOUS, A.; MEYER, A. S. Quantitative prediction of cell wall polysaccharide composition in grape (*Vitis vinifera* L.) and apple (*Malus domestica*) skins from acid hydrolysis monosaccharide profiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 57, p. 3611–3619, 2009.

AVIGAD, G.; DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. Carbohydrate Metabolism: Storage Carbohydrates. *Plant Biochemistry*, p. 143-204, 1997.

BABIOR, M. B. The respiratory burst oxidase. *Advances in Enzymology & Related Areas of Molecular Biology*, v. 65, p. 49-95, 1992.

BADWEY, J. A.; KARNOVSKY, M. L. Active oxygen species and the function of phagocytic leukocytes. *Annual Review of Biochemistry*, v. 49, p. 695–726, 1980.

BAUER, W. D.; TALMADGE, K. W.; KEEGSTRA, K.; ALBERSHEIM, P. The structure of plant cell walls. II. The hemicellulose of the walls of suspension-cultured sycamore cells. *Plant Physiology*, v. 51, p.174-187, 1973.

BERZI, I.; SZENTIVANYI, A. *Cytokines and Chemokines*, in: Berczi, I.; Szentivanyi, A. (Ed), *NeuroImmune Biology. V. 3. The Immune-Neuroendocrine Circuitry: History and Progress*. Elsevier Science B.V., 2003.

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

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

BIERMANN, C. J.; MCGINNIS, G. D. Hydrolysis and other cleavage of glycosidic linkages. *Analysis of Carbohydrates by GLC and MS*, p. 27-41, 1989.

BILLIAR, T. R.; HOFMAN, R. A.; CURRAN, R. D.; LANGEHR, J. M.; SIMMONS, R. L. A role of inducible nitric oxide biosynthesis in liver in inflammation and in the allogenic immune response. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, v. 120, p. 192-197, 1992.

BOCHICCHIO, R.; REICHER, F. Are hemicelluloses from *Podocarpus lambetii* typical of gymnosperms? *Carbohydrate Polymers*, v.53, p.127-136, 2003.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunology*, v. 2, n. 10, p. 907–916, 2001.

- BOHN, J. A.; BeMILLER, J. N. (1→3) $\beta$ -d-glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydrate Polymers*, v. 28, p. 3–14, 1995.
- BOUGHANMI, N.; THIBAUT, F.; DECOU, R.; FLEURAT-LESSARD, P.; BERE, E.; COSTA, G.; LHERNOULD, S. NaCl effect on the distribution of wall in growth polymers and arabinogalactan proteins in type A transfer cells of *Medicago sativa* Gabès leaves. *Protoplasma*, p. 1-12, 2010.
- BRANSCHADEL, M.; BOSCHERT, V.; KRIPPNER-HEIDENREICH, A. Tumour Necrosis Factors. *Encyclopedia of life*, p. 1-12, 2007.
- BREDT, D. S.; SNYDER, S. H. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requirig enzyme. *Procceding of the National Academy of Sciences*, v. 87, p. 682-685, 1990.
- BUCHALA, A. J.; GENOUD, T.; ROULIN, S.; SUMMERMATTER, K. Xyloglucans in different types of cotton (*Gossypium sp.*) cells. *Acta Botanica Neerlandica*, v. 42, n. 2, p. 213-219, 1993.
- BUCKERIDGE, M. S., DIETRICH, S.M.C. Galactomannans from Brazilian legume seeds1. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 13, p. 109-112, 1990.
- BUCKERIDGE, M. S., DALVA, C. R.; GRANT REID, J. S.; DIETRICH, S. M. C. Xyloglucan structure and post-germinative metabolism in seeds of *Copaifera langsdorfii* from savanna and forest populations. *Physiologia Plantarum*, v. 86, p. 145-151, 1992.
- BUCKERIDGE, M. S., CROMBIE, H. J., MENDES, C. J. M., REID, J. S. G., GIDLEY, M. J., VIEIRA, C. C. J. A new family of oligosaccharides from the xyloglucan of *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae) cotyledons. *Carbohydrate Research*, v. 303, p. 233-237, 1997.
- BUSATO, A. P.; REICHER, F.; DOMINGUES, R.; SILVEIRA, J. L. M. Rheological properties of thermally xyloglucan gel from the seeds of *Hymenaea courbaril*. *Materials Science and Engineering*, v. 29. p. 410-414, 2009.
- 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*. *Biological Macromolecules*. v.35, p.277-282, 2005.
- BUSATO, A. P.; VARGAS-RECHIA, C.G.; REICHER, F. Xyloglucan from leaves of *Hymenaea courbaril*. *Phytochemistry*. v. 58, p. 525-531, 2001.
- BUSATO, A. P. *Xiloglucana fucosilada de Folhas de Hymenaea courbaril (Jatobá)*. Trabalho de Tese de Doutorado em Ciências Bioquímicas - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

- BYEON, S. E.; LEE, J.; LEE, S. Y.; HONG, E. K.; KIM, Y. E.; CHO, J. Y. Functional activation of macrophages, monocytes and splenic Lymphocytes by polysaccharide fraction from *Tricholoma matsutake*. *Archives of Pharmacol Research*, v. 32, p. 1565-1572, 2009.
- CARNEIRO-LEÃO, A. M. A.; BUCHI, D. F.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J.; OLIVEIRA, M. B. M. Cytotoxic effect against HeLa cells of polysaccharide from the lichen *Ramalina celastri*. *Journal of Submicroscopy Cytology and Pathology*, v. 24, p. 1-5, 1997.
- CARPITA, N. C.; GIBEAUT, D. M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal*, v. 3, p. 1-30, 1993.
- CARPITA, N.; McCANN, M. The cell wall. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (Ed.). *Biochemistry and Molecular Biology of plants*. American Society of Plant Physiologists, p. 52-108, 2000.
- CARVALHO, P. E. R. *Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira*, p. 274-279, 1994.
- CASBON, A.; ALLEN, L. H.; DUNN, K. W.; DINAUER, M. C. Macrophage NADPH oxidase flavocytochrome b localizes to the plasma membrane and rab11-positive recycling endosomes. *Journal of Immunology*, v. 182, p. 2325-2339, 2009.
- CHEN, W.; ZHANG, W.; SHEN, W.; WANG, K. Effects of the acid polysaccharide fraction isolated from a cultivated *Cordyceps sinensis* on macrophages *in vitro*. *Cell. Immunology*, v. 262, p. 64-74, 2010.
- CHOI, J.-I.; KIM, J.-K.; SRINIVASAN, P.; KIM, J.-H.; PARK, H.-J.; BYUN, M.-W.; LEE, J.-W. Comparison of gamma ray and electron beam irradiation on extraction yield, morphological and antioxidant properties of polysaccharides from tamarind seed. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 78, p. 605–609, 2009.
- CHOI, H.-S.; YIM, J.-H.; LEE, H. K.; PYO, S. Immunomodulatory Effects of Polar Lichens on the Function of Macrophages In Vitro. *Journal of Marine Biotechnology*, v. 11, p. 90-98, 2009.
- COHEN, S. M.; RYAN, L.; ROOT, K. The oxidative metabolism of thioglycollate-elicited mouse peritoneal macrophages: the relationship between oxygen, superoxide and hydrogen peroxide and the effect on monolayer formation. *Journal of Immunology*, v. 127, p. 1007–1011, 1981.
- COHN, Z. A. The activation of mononuclear phagocytes: fact, fancy and future. *Journal of Immunology*, v. 121, p. 813-816, 1978.
- COMMINS, P.; BORISH, L.; STEINKE, J. W. Immunologic messenger molecules: Cytokines, interferons, and chemokines. *Journal of Immunology*, v. 125, p. 53-72, 2010.

- COSGROVE, D. J. Growth of the plant cell wall. *Reviews*, v. 6, p. 850-861, 2005.
- COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. Robbins: Pathologic basis of disease. *W.B Saunders Company*, p.11-13, 1994.
- COULTER, J. A.; MCCARTHY, H. O.; XIANG, J.; ROEDL, W.; WAGNER, E.; ROBSON, T.; HIRST, D. G. Nitric oxide—A novel therapeutic for cancer. *Nitric Oxide*, v. 19, p. 192-198, 2008.
- CRAWFORD, R. M.; FINBLOOM, D. S.; CHARA, J.; PAUL, W. E.; MELTZER, M. S. B-cell stimulatory factor-1 (IL-4) activated macrophages for increased tumoricidal activity and expression of Ia antigens. *Journal of Immunology*, v. 139, p. 135-141, 1987.
- CRONQUIST, A. An integrated system of classification of flowering plants. *New York: Columbia University*, p. 555, 1988.
- CROSS, A. R.; SEGAL, A. W. The NADPH oxidase of professional phagocytes—prototype of the NOX electron transport chain systems. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1657, p. 1-22, 2004.
- CUNHA, F. Q.; ASSREUY, J.; MONCADA, S.; LIEW, F. Y. Phagocytosis and induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. *Immunology*, v. 79, p. 408-411, 1993.
- CUTILLAS-ITURRALDE, A.; PEÑA, M. J.; ZARRA, I.; LORENCES, E. P. A. Xyloglucan from persimmon fruit cell walls. *Phytochemistry*, v. 48, p. 607-610, 1996.
- DING, K.; FANG, J. N.; DONG, T.; TSIM, K. W. K.; WU, H. Characterization of a rhamnogalacturonan and a xyloglucan from *Nerium indicum* and their activities on PC12 pheochromocytoma Cells. *Journal of Natural Products*, v. 66, p. 7-10, 2003.
- DOCIO, T.; WILLIAMS, P.; PAULY, M.; O'NEILL, M.A.; PELLERIN, P. Polysaccharides from grape berry cell walls. Part II. Structural characterization of the xyloglucan polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, v. 53, p. 253-261, 2003.
- DONADIO, L. C.; NACHTIGAL, J. C.; SACRAMENTO, C. K. *Frutas exóticas*. Jaboticabal: Funep, 1988.
- DRÁBIKOVÁ, K.; PERECKO, T.; NOSAL, R.; BAUEROVA, K.; PONIST, S.; MIHALOVA, D.; KOGAN, G.; JANCINOVA, V. Glucomannan reduces neutrophil free radical production in vitro and in rats with adjuvant arthritis. *Pharmacological Research*, v. 59, p. 399-403, 2009.
- DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

EAGLE, H. Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science*, v. 130, p. 432, 1959.

ECKARDT, N.A. Role of xyloglucans in primary cell walls. *The Plant Cell*, v. 20, p. 1421-1422, 2008.

FAIRWEATHER, D.; CIHAKOVA, D. Alternatively activated macrophages in infection and autoimmunity. *Journal of Autoimmunity*, v. 33, p. 222–230, 2009.

FILISSETTI-COZZI, T. M. C. C.; CARPITA, N. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Analytical Biochemistry*, v. 197, p.157-162, 1991.

FITZPATRICK, B.; MEHIBEL, M.; COWEN, R. L.; STRATFORD, I. J. iNOS as a therapeutic target for treatment of human tumors. *Nitric Oxide*, v. 19, p. 217-224, 2008.

FREITAS, R. A. *Estrutura e Interação de galactoxiloglucana-amido de milho*. Trabalho de Dissertação de Mestrado em Ciências Bioquímicas – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2000.

FREITAS, R. A., MARTIN, S.; SANTOS, G. L.; VALENGA, F.; BUCKERIDGE, M. S.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M. R. Physico-chemical properties of seed xyloglucans from different sources. *Carbohydrate Polymers*, v. 60, p. 507-514, 2005.

FRY, S. C.; YORK, W. S.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A.; HAYASHI, T.; JOSELEAU, J.-P.; KATO, Y.; LORENCES, E. P.; MacLACHLAN, G. A.; McNEIL, M.; MORT, A.; REID, J. S. G.; SEITZ, H. U.; SELVENDRAN, R. R.; VORAGEN, A. G. J.; WHITE, A. R. An unambiguous nomenclature for xyloglucan-derived oligosaccharides. *Plant Physiology*, v. 89, p. 1-3, 1993.

FRY, S. C. The structure and functions of xyloglucan. *J. Exp. Bot.*, v. 40, n. 211, p. 1-11, 1989.

GAILLARD, B. D. E. Separation of linear from branched polysaccharides by precipitation as iodine complexes. *Nature*, v. 191, p. 1295-1296, 1961.

GEISSMANN, F.; MANZ, M. G.; JUNG, S.; SIEWEKE, M. H.; MERAD, M.; LEY, K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*, v. 327, p. 656-661, 2010.

GHELARDI, E.; TAVANTI, A.; DAVINI, P.; CELANDRONI, F.; SALVETTI, S.; PARISIO, E.; BOLDRINI, E.; SENESI, S.; CAMPA, M. A. Mucoadhesive polymer extracted from tamarind seed improves the intraocular penetration and efficacy of rifloxacin in topical treatment of experimental bacterial keratitis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 48, p. 3396-3401, 2004.

GONSALVES, P. E. *Livro dos Alimentos*. MG, 2002.

- GREEN, J. W. Wood cellulose. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, v. 3, p. 9-21, 1963.
- GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, v. 126, p. 131–138, 1982.
- HACKETT, C. J. Inate immune activation as a broad-spectrum biodefense strategy: Prospects and research challenges. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 112, n. 4, p. 686-694, 2003.
- HALL, C. N.; GARTHWAITE, J. What is the real physiological NO concentration in vivo? *Nitric Oxide*, v. 21, p. 92-103, 2009.
- HALLIWELL, B. Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide? *Trends in Biochemical Sciences*, v. 31, p. 509-515, 2006.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals reactive species and toxicology. *New York: Oxford University Press*, 1999.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals reactive species and toxicology. *Free Radicals in Biology Medicine*. *Oxford University*, 2006.
- HANKS, J. H.; WALLACE, R. E. Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v. 71, p. 196, 1949.
- HANTUS, S.; PAULY, M.; DARVILL, A.G.; ALBERSHEIM, P.; YORK, W.S. Structural characterization of novel L-galactose-containing oligosaccharide subunits of jojoba seed xyloglucans. *Carbohydrate Research*, v. 304, p. 11-20, 1997.
- HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry*, v. 48, p. 422-427, 1972.
- HAYASHI, T. Xyloglucans in the primary cell wall. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v. 40, p. 139-168, 1989.
- HENSEL, A.; MEIER, K. Pectins and xyloglucans exhibit antimutagenic activities against nitroaromatic compounds. *Planta Medica*, v. 65, p. 395-399, 1999.
- HENSEL, A.; SCMIDGALL, J.; KREIS, W. The plant cell wall – A potential source for pharmacologically active polysaccharides. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, v. 73, p. 37-43, 1998.
- HIRUNA, N.; TANTISHAIYAKUL, V.; PICHAYAKORN, W. Effect of Eriochrome Black T on the gelatinization of xyloglucan investigated using rheological measurement and release behavior of Eriochrome Black T from xyloglucan gel matrices. *Elsevier*, v. 388, p. 196-201, 2010.

HOFFMAN, M.; JIA, Z.; PENA, M. J.; CASH, M.; HARPER, A.; BLACKBURN, A. R.; DARVILL, A.; YORK, W. S. Structural analysis of xyloglucans in the primary cell walls of plants in the subclass Asteridae. *Carbohydrate Research*, v. 340, p. 1826-1840, 2005.

HÖIJE, A.; SANDSTRÖM, C.; ROUBROEKS, J. P.; ANDERSSON, R., GOHIL, S.; GATENHOLM, P. Evidence of presence of 2-O- $\beta$ -D-xylopirinosyl- $\alpha$ -L- arabinofuranose side chain in barley husk arabinoxylan. *Carbohydrate Research*, v.341, p. 2959-2966, 2006.

HSIEH, Y. S. Y.; HARRIS, P. J. Xyloglucans of monocotyledons have diverse structures. *Molecular Plant*, v. 2, p. 943-965, 2009.

JAMES, S.L.; Role of nitric oxide in parasitic infections, *Microbiol. Rev.* v. 59, p. 533-547, 1995.

JIA, Z.; Qin, Q.; DARVILL, A.G., YORK, W. Structure of xyloglucan produced by suspension-cultures tomato cells. *Carbohydrate Research*, v.338, p. 1197-1208, 2003.

JO, T. A.; PETRI, D. F. S.; VALENGA, F.; LUCYSZYN, N.; SIERAKOWSKI M. R. Thin films of xyloglucans for BSA adsorption. *Materials Science and Engineering*, v. 29, p. 631-637, 2009.

JOHNSTON, R. B.; GODZIK, C. A.; COHN, Z. A. Increased superoxide anion production by immunologically activated and chemically elicited macrophages. *Journal Experimental Medicine*, p. 115–127, 1978.

JOHNSON, G. B.; BRUNN, G. J.; TANG, A. H.; PLATT, J. L. Evolutionary clues to the functions of the Toll-like family as surveillance receptors. *Immunology*, v. 24, p. 19-24, 2003.

JONES, J. K. N.; STOODLEY, R. J. Fractionation using copper complexes. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, v. 5, p. 36-38, 1965.

JUN, L.; MET, Z.; YUAN, C. Reversal of inhibition of reactive oxygen species on respiratory burst of macrophages by polysaccharide from *Coriolus versicolor*. *International Journal of Immunopharmacology*, v. 15, p. 429-433, 1993.

KAI, K. C. *Extração e caracterização de xiloglucanas de Tamarindus indica*. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Biologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

KAI, K. C.; PETKOWICZ, C. L. de O. Influence of extraction conditions on properties of seed xyloglucan. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 46, p. 223-228, 2010.

KAISER, P.; ROTHWELL, L.; AVERY, S.; BALU, S. Evolution of the interleukins. *Developmental & Comparative Immunology*, v. 28, p. 375-394, 2004.

- KAKEGAWA, K.; EDASHIGE, Y.; ISHI, T. Xyloglucan from xylem-differentiating zones of *Cryptomeria japonica*. *Phytochemistry*, London, v. 47, n. 5, p. 767-771, 1998.
- KANGUSSU-MARCOLINO, M. M. *Avaliação de Atividade Leishmanicida IN VITRO de Heteropolissacarídeos Ácidos: não Sulfatados e Naturalmente Sulfatados*. Trabalho de Dissertação de Mestrado em Ciências Bioquímicas – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.
- KANEDA, M.; RENSING, K.; SAMUELS, L. Cell Wall Deposition in Developing Secondary Xylem of Poplar. *Journal of Integrative Plant Biology*, v. 52, p. 234-243, 2010.
- KARDOŠOVÁ, A.; MACHOVÁ, E. Antioxidant activity of medicinal plant polysaccharides. *Fitoterapia*, v. 77, p. 367–373, 2006.
- KARNOVSKY, M. L.; BADWAY, J. A. Respiratory burst during phagocytosis: an overview. *Methods in Enzymology*, v. 132, p. 353-364, 1986.
- KAWASAKI, N.; OHKURA, R.; MIYAZAKI, S.; UNO, Y.; SUGIMOTO, S.; ATTWOOD, D. Thermally reversible xyloglucan gels as vehicles for oral drug delivery. *International Journal of Pharmacology*, v. 181, n. 2, p. 227-234, 1999.
- KEEGSTRA, K.; TALMADGE, K. W.; BAUER, W. D.; ALBERSHEIM, P. Structure of plant cell walls. III. A model of the walls of suspension-cultured sycamore cells based on interconnections of the macromolecular components. *Plant Physiology*, v. 51, p. 188-197, 1973.
- KIM, G.-Y. et al. Acidic polysaccharide isolated from *Phellinus linteus* enhances through the up-regulation of nitric oxide and tumor necrosis factor- $\alpha$  from peritoneal macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 95, p. 69–76, 2004.
- KINDT, T.; OSBORNE, B.A.; GOLDSBY, R.; Cytokines, In: KINDT, T.; OSBORNE, B.A.; GOLDSBY, R.; (6 Ed), Kuby Immunology, Freeman, 2000
- KISHIMOTO, T. INTERLEUKIN-6: From basic science to medicine-40 years in immunology. *Annual Review of Immunology*, v. 23, p. 1–21, 2005.
- KLEBANOFF, S. J. *Oxygen metabolites from phagocytes*. In: *Inflammation – Basic Principles and Clinical Correlates*. [S.l.]: Raven Press, 1992.
- KLEINERT, H. et al. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *European Journal of Pharmacology*, v. 500, p. 255–266, 2004.
- 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*, v. 44, p. 143–16, 2002.

- KORHONEN, R. et al. Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr. Drug Targets. Inflammation & Allergy - Drug Targets*, v. 4, p. 471–479, 2005.
- KOOIMAN, P. On the occurrence of amyloids in plant seeds. *Acta Botanica Neerlandica*, v. 9, p. 208-219, 1960.
- KOOIMAN, P. Partial enzymic degradation of Tamarindus-amyloid. *Nature*, v. 179, p. 201, 1957.
- KOOIMAN, P. The constitution of Tamarindus amyloid. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*, v. 80, p. 849-865, 1961.
- KOOIMAN, P. The constitution of the amyloid from seeds of *Amona muricata*. *Phytochemistry*, London, v. 6, p. 1665-1673, 1967
- KRAUS, J.; FRANZ, G.; LATGE, J. P.; BOUCIAS, D.  $\beta$ -(1→3)-glucans: anti-tumor activity and immunostimulation. *Fungal cell wall and immune response*, p. 31-444, 1991.
- KUMAR, C. S.; CHANDINI, S.; BHATTACHARYA, S. Tamarind Seed: properties, processing and utilization. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 48, p. 1-20, 2008.
- LANG, P.; MASCI, G.; DENTINI, M.; CRESCENZI, D. V.; COOKE, D.; GIDLEY, M. J.; FANUTTI, C.; REID, J. S. G. Tamarind seed polysaccharides: preparation, characterisation and solution properties of carboxylated, sulphated and alkylaminated derivatives. *Carbohydrate Polymers*, v. 17, p. 185-198, 1992.
- LEROUXEL, O.; CAVALIER, D. M.; LIEPMAN, A. H.; KEEGSTRA, K. Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides — a complex process. *Plant Biology*, v. 9, p. 621–630, 2006.
- 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*, v. 14, p. 501-510, 2004.
- LI, X.; SAKURAI, N.; NEVINS, D. J. Characterization of kiwifruit xyloglucan. *Journal of Integrative Plant Biology*, v. 51, n. 10, p. 933-941, 2009.
- LIMA, N. N.; REICHER, F.; CORRÊA, J. B. C.; GANTER, J. L. M. S.; SIERAKOWSKI, M. R. Partial structure of a xyloglucan from the seeds of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* (jatobá). *Ciencia e Cultura*, v. 45, n. 1, p. 22-26, 1993.
- LIMA, N.N.; REICHER, F.; CORRÊA, J.B.C.; GANTER, J.L.M.S.; SIERAKOWSKI, M.-R. Oligosaccharides derived from the xyloglucan from the seeds of *Hymenaea coubaril* var. *stilbocarpa*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 17, n. 6, p. 413-415, 1995.

LORENCES, E.P. Cell wall xyloglucan incorporation by xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase in pine hypocotyls. *Plant Science*, v. 166, p. 1269-1274, 2004.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. *Plantarum*, São Paulo, p. 152 e 155, 1992.

LUNDBERG, J. O.; WEITZBERG, E. NO Generation from inorganic nitrate and nitrite: role in physiology, Nutrition and Therapeutics. *Archives of Pharmacol Research*, v. 32, p. 119-1126, 2009.

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

MACMICKING, J.; XIE, Q. W.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. *Annual Review of Immunology*, v. 15, p. 323–350, 1997.

MARRY, M.; CAVALIER, D. M.; SCHNURR, J. K.; NETLAND, J.; YANG, Z.; PEZESHK, V.; YORK, W. S.; PAULY, M.; WHITE, A. R. Structural characterization of chemically and enzymatically derived standard oligosaccharides isolated from partially purified tamarind xyloglucan. *Carbohydrate Polymers*, v. 51, p. 347-356, 2003.

MARLETTA; M. A. Nitric oxide synthase: Aspects concerning structure and catalysis. *Cell*, v. 78, p. 927-930, 1994.

MARTIN, S.; FREITAS, R. A.; OBAYASHI, E.; SIERAKOWSKI, M. R. Physico-chemical aspects of galactoxyloglucan from the seeds of *Hymenaea courbaril* and its tetraborate complex. *Carbohydrate Polymers*, v. 54, p. 287-295, 2003.

MASTROMARINO, P.; PETRUZZIELLO, R.; MACCHIA, S.; RIETI, S.; NICOLETTI, R.; ORSI, N. Antiviral activity of natural and semi syntextic 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 actio of nitric oxide in mammalian cells. *Trends in Biochemistry Science*, v. 22, p. 477-481, 1997.

McNEIL, M.; DARVILL, A.G.; FRY, S.C. Structure and function of the primary cell walls of plants. *Annual Review of Biochemistry*, v. 53, p. 625-663, 1984

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*, v. 68, 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*, v. 43, p. 115–120, 2008.

MIMA, T.; NISHIMOTO, N. Clinical value of blocking IL-6 receptor. *Current Opinion in Rheumatology*, v. 21, p. 224–230, 2006.

MINTER, R. M.; WESSELS, F. G.; MOLDAWER, L. L. Cytokine Biology. *Academic Press.*, v. 67, p. 933-947, 2001.

MIYAZAKI, S.; SUICHA, F.; KAWASAKI, N.; SHIRAKAWA, M.; YAMATOYA, K.; ATTWOOD, D. Thermally reversible xyloglucan gels as vehicles for rectal drug delivery. *Journal of Controlled Release*, v. 56, p. 75-83, 1998.

MIYAZAKI, S.; SUZUKI, S.; KAWASAKI, N.; SHIRAKAWA, M.; ENDO, K.; TAKAHASHI, A.; ATTWOOD, D. *In situ* gelling xyloglucan formulations for sustained release ocular delivery of pilocarpine hydrochloride. *International Journal of Pharmacology*, v. 229, p. 29-36, 2001.

MOHNEN, D. Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 11, n.3, p. 266-277, 2008.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric Oxide: Physiology, Pathophysiology and Pharmacology. *Pharmacological Reviews.*, v. 43, p. 109-142, 1994.

MORETÃO, M. P.; BUCHI, D. F.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M.; OLIVEIRA, M. B. M. Effect of an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco) on peritoneal macrophage functions. *Immunology Letters*, 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 heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco). *Immunology Letters*, v. 93, p. 189–197, 2004.

MOORE, J. P.; NGUEMA-ONA, E.; CHEVALIER, L.; LINDSEY, G. G.; BRANDT, W. F.; LEROUGE, P.; FARRANT, J. M.; DRIOUICH, A. Response of the leaf CcII wall to desiccation in the resurrection plant *Myrothamnus flabellifolius*. *Plant Physiology*, v. 141, p. 651-662, 2006.

NANCY, A.; ECKARDT. Role of xyloglucan in primary cell walls. *The Plant Cell*, v. 20, p. 1421–1422, 2008.

NASEEM, K. M. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 26, p. 33–65, 2005.

NATHAN, C.; XIE, Q. wen. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *Journal of Biological Chemistry*, v. 269, n. 19, p. 13725–13728, 1994.

NISHIMOTO, N. Interleukin-6 as a Therapeutic Target in Candidate Inflammatory Diseases. *Clinical pharmacology & Therapeutics*, v. 87, p. 483-487, 2010.

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

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

NUSSLER, A. J.; BILLIAR, T. R. Inflammation, immunoregulation and inducible nitric oxide synthase. *Journal of Leucocyte Biology.*, v. 54, p. 171-178, 1993.

OBEL, N.; ERBENC, V.; SCHWARZA, T.; HNELD, S.; FODORA, A.; PAULY, M. Microanalysis of Plant Cell Wall Polysaccharides. *Molecular Plant*, v. 2, p. 922–932, 2009.

OHYA, Y.; NISHIMOTO, T.; MURATA, J.; OUCHI, T. Immunological enhancement activity of muramyl dipeptide analogue/CM-curdlan conjugate. *Carbohydrate Polymers*, v. 23, p. 47-54, 1994.

OKASAKI, M.; CHIBA, N.; ADACHI, Y.; OHNO, N.; YODAMAE, T. Signal transduction pathway on  $\beta$ -glucans triggered hydrogen peroxide production from macrophages, *in vitro*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 19, p. 18-23, 1996.

OLIVEIRA JUNIOR, C. J. F.; BRAGA, M. R.; BUCKERIDGE, M. S. Isolamento de oligossacarídeos de xiloglucano de dicotiledôneas através de hidrólise enzimática e cromatografia de exclusão molecular. *Revista Brasileira de Botânica.*, v. 29, p. 391-397, 2006.

O'NEILL, M. A.; YORK, W. S. The composition and structure of plant primary cell walls. In: *The Plant cell wall. Annual Plant Review.* eds. JKC. Rose CRC Press, v.8, p.1-54, 2003.

ONWELUZO, J. C.; RAMESH, H. P.; THARANATHAN, R. N. Characterization of free sugars and xyloglucan-type polysaccharides of two tropical legumes. *Carbohydrate Polymers*, v. 47, p. 253-257, 2002.

ORTEGA, A.; CARRETERO, J.; OBRADOR, E.; ESTRELA, J. M. Tumoricidal activity of endothelium-derived NO and the survival of metastatic cells with high GSH and Bcl-2 levels. *Nitric Oxide*, v. 19, p. 107–114, 2008.

OWINO, W. O.; NAKANO, R.; KUBO, Y.; INABA, A. Coordinated expression patterns of genes encoding cell wall modifying enzymes during ripening in distinct anatomical tissue regions of the fig (*Ficus carica* L.) fruit. *Postharvest Biology and Technology*, v. 32, p. 253-261, 2004.

PAREDES, L. L. R. *Extração e Caracterização dos Polissacarídeos das Raízes de Lepidium meyenii e Testes de Atividade Inseticida*. Trabalho de Dissertação de Mestrado em Ciências Bioquímicas – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

PARK, J. W.; BABIOR, B. M. The translocation of respiratory burst oxidase components from cytosol to plasma membrane is regulated by guanine nucleotides and diacylglycerol. *Journal of Bioogical Chemistry*, v. 267, p. 19901-19906, 1992.

PARK, J. W.; MA, M.; RUEDI, J. M.; SMITH, R. M.; BABIOR, B. M. The cytosolic components of the respiratory burst oxidase exist as a Mr 240.000 complex that acquires a membrane binding site during activation of the oxidase in cell-free system. *Journal of Biological Chemistry*, v. 267, p. 17327-17332, 1992.

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

PEDRONI, F.; SANCHEZ, M.; SANTOS, F. A. M. Fenologia da copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf. - Leguminosae, Caesalpinioideae) em uma floresta semidecídua no sudeste do Brasil. *Rev. bras. Bot.*, v. 25, 2002.

PEIXOTO, A. M. *Enciclopédia agrícola brasileira S-Z*. EDUSP. V. 6. 2006.

POPPER, Z. A.; FRY, S. C. Xyloglucan-pectin linkages are formed intraprotoplasmically, contribute to wall-assembly, and remain stable in the cell wall. *Planta*, v. 227, p. 781–794, 2008.

POZZOLINI, M.; SCARFI, S.; BENATTI, H.; GIOVINE, M. Interference in MTT cell viability assay in activated macrophage cell line. *Analytical Biochemistry*, v. 313, p. 338-341, 2003.

PUGH, N.; ROSS, S. A.; ELSOHLY, M. A.; PASCO, D. S. Characterization of Aloeride, a New High-Molecular-Weight Polysaccharide from *Aloe vera* with Potent Immunostimulatory Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, p. 1030-1034, 2001.

RAMAMOORTHY, L.; KEMP, M. C.; TIZARD, I. R. Acemannan, a  $\beta$ -(1,4)-acetylated mannan, induces nitric oxide production in macrophage cell line RAW 264. *Molecular Pharmacology*, v. 50, p. 878–884, 1996.

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*, v. 50, p. 79–83, 2002.

RAY, B.; LOUTELIER-BOURHIS, C.; LANGE, C.; CONDAMINE, E.; DRIOUICHA, A.; LEROUGEA, P. Structural investigation of hemicellulosic polysaccharides from *Argania spinosa*: characterisation of a novel xyloglucan motif. *Carbohydrate Research*, v. 339, p. 201–208, 2004.

REDGWELL, R. J.; MELTON, L. D.; BRASCH, D. J. Cell-wall polysaccharides of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) chemical features in different tissue zones of fruit at harvest. *Elsevier Science Publication*, p. 241-258, 1988.

REID, J.S.G.; EDWARDS, M.E. Galactomannans and other cell wall storage polysaccharides in seeds. In: STEPHEN, A.M. (Ed.). *Food Polysaccharides and Their Applications*. Marcel Decker, Inc, p. 155-186, 1995.

REILLY, T. et al. Comparison of the in vitro cytotoxicity of hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapson. *Biochemical Pharmacology*, v. 55, p. 803–810, 1998.

REN, Y.; PICOUT, D. R.; ELLIS, P. R.; ROSS\_MURPHY, S. B.; REID, J. S. G. A novel xyloglucan from seeds of *Azelia africana* Se. Pers. Extraction, characterization and conformational properties. *Carbohydrate Research*, v. 340, p. 997-1005, 2005.

RENARD, C. M. G. C.; LEMEUNIER, C.; THIBAUT, J. F. Alkaline extraction of xyloglucan from depectinized apple pomace: optimization and characterization. *Carbohydrate Polymers*, v. 28, p. 209-216, 1995.

RIBEIRO, C.; ARIZAG, G. G. C.; WYPYCH, F.; SIERAKOWSKI, M. R. Nanocomposites coated with xyloglucan for drug delivery: In vitro studies. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 367, p. 204-210, 2009.

RIZZINI, C. T. Árvores e madeiras úteis do Brasil, manual de dendrologia brasileira. *Edgard Blucher*, São Paulo, p. 124-128, 1978.

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*, v. 69, p. 464–472, 2008.

ROSE, J. K. C.; HADFIELD, K. A.; LABAVITCH, J. M.; BENNETT, A. B. Temporal sequence of cell wall disassembly in rapidly ripening melon fruit. *Plant Physiology*, v. 117, p. 345-361, 1998.

ROTROSEN, D. The respiratory burst oxidase in inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates. *Raven Press*, p. 589-601, 1992.

RYVES, J. W.; EVANS, A. T.; OLIVER, PARKER, J. P.; EVANS, J. F. Activation of the PKC isotypes  $\alpha$ ,  $\beta$ 1,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  by phorbol ester of different biological activities. *Federation of European Biochemical Society*, Amsterdam, v. 288, n. 1-2, p. 5-9, 1991.

SAITÔ, H.; YOSHIOKA, Y.; AKETAGAWA, J.; TANAKA, S.; SHIBATA, Y. Relationship between conformation and biological response for (1 $\rightarrow$ 3) $\beta$ -D-glucans in the activation of coagulation factor G form limulus amebocyte lysate and host-mediated antitumor activity. Demonstration of single-helix conformation as a stimulant. *Carbohydrate Research*, v. 217, p. 181-190, 1991.

SAKURAI, N.; NEVINS, D. J. Changes in physical properties and cell wall polysaccharides of tomato (*Lycopersicon esculentum*) pericarp tissues. *Physiologia Plantarum*, v. 89, p. 681-686, 1993.

SAKURAI, T.; OHNO, N.; YODAMAE, T. Intravenously administered (1 $\rightarrow$ 3)-  $\beta$ -glucan, SSG, obtain from *Sclerotinia sclerotiorum* IFO 9395 augments murine peritoneal macrophages function *in vivo*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 40, p. 2120-2124, 1992.

SAMPEDRO, M. C.; ARTOLA, R. L.; MURATURE, M.; MURATURE, D.; DITAMO, Y.; ROTH, G. A., KIVATINITZ, S. Mannan from *Aloe saponaria* inhibits tumoral cell activation and proliferation. *International Immunopharmacology*, v. 4, p. 411-418, 2004.

SANDHU, A. P. S.; RANDHAWA, G. S.; DHUGGA, K. S. Plant cell wall matrix polysaccharide biosynthesis. *Molecular Plant*, v. 2, p. 840-850, 2009.

SASADA, M.; PABST, M.; JOHNSTON, R. Activation of peritoneal macrophages by lypopolysaccharide alters the kinetic parameters of the superoxide-producing NADPH oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, v. 258, n. 16, p. 9631–9635, 1983.

SHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. *Annual Reviews of Plant Biology*, v. 61, p. 263-289, 2010.

SCHEPETKINS, I. A.; QUINN, M. T. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *International Immunopharmacology*, v.6, p.317-333, 2006.

SCHEPETKINS, 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*, v. 8, n. 10, p. 1455-1466, 2008.

SCHEPETKINS, I. A.; FAULKNER, C. L.; NELSON-OVERTO, . K.; WILEY, J. A.; QUINN, M. T. Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Juniperus scopolorum*. *International Immunopharmacology*, v. 5, p. 1783–1799, 2005.

SCHINDLER, R.; MANCILLA, J.; ENDRES, S.; GHORBANI, R.; CLARK, S. C.; DINARELLO, C. A. Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 Suppresses IL-1 and TNF. *Blood*, v. 75, p. 40-47, 1990.

SCHMIDT, H. H. W.; WALTER, U. NO at work. *Cell*, v. 78, p. 919-925, 1994.

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

SEGAL, A. W. How neutrophils kill microbes. *Journal of Innate Immunity*, v. 23, p. 197–223, 2005.

SHEPHERD, V. L.; LEE, Y. C.; SCLESINGER, P. H.; STAHL, P. D. L-Fucose-terminated glycoconjugates are recognized by pinocytosis receptor on macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 78, p. 1019-1022, 1981.

SHIRAKAWA, M.; YAMATOYA, K.; NISHINARI, K. Tailoring of xyloglucan properties using enzyme. *Food hydrocolloids*. V.12, p. 25-28, 1998.

SILVA, P. H. da; HASHIMOTO, Y.; ALVES, H. B. Hematologia Laboratorial. *REVINTER*, p.184-188, 2009.

SILVEIRA, J. da C. *Avaliação dos Efeitos Imunomoduladores e Citotóxicos de Polissarídeos de Chorisia speciosa E Hymenaea courbaril*. Trabalho de Dissertação de Mestrado em Ciências Bioquímicas – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

SIMI, C. K.; ABRAHAM, T. E. Transparent xyloglucan–chitosan complex hydrogels for different applications. *Food Hydrocolloids*, v. 24, p. 72–80, 2010.

SIMS, I. M.; GANE, A. M.; DUNSTAN, D.; ALLAN, G. C.; BOGER, D. V.; MELTON, L. D.; BACIC, A. Rheological properties of xyloglucans from different plant species. *Carbohydrate Polymers*, v. 37, p. 61-69, 1998.

SIMS, I. M., MUNRO, S. L. A., CURRIE, G., CRAIK, D., BACIC, A. Structural characterization of xyloglucan secreted by suspension-cultured cells of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Carbohydrate Research*, 293, 147-172, 1996.

SIMS, J. E.; SMITH, D. E. The IL-1 family: regulators of immunity. *Nature Reviews Immunology*, v. 10, p. 89-102, 2010.

SLONEKER, J. H. Gas-liquid chromatography of alditol acetates. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, v. 6, p. 20-24, 1972.

SOMERVILLE, C.; BAUER, S.; BRININSTOOL, G.; FACETTE, M.; HAMANN, T.; MILNE, J.; OSBORNE, E.; PAREDEZ, A.; PERSSON, S.; RAAB, T.; VORWERK, S.; YOUNGS, S. Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science*, v. 306, p. 2206-2211, 2004.

SONE, Y.; MAKINO, C.; MISAKI, A. Inhibitory effect of oligosaccharides derived from plant xyloglucan on intestinal glucose absorption in rat. *Journal of Nutritional Science & Vitaminology*, v. 38, p. 391-395, 1992.

SONG, J. Y. et al. Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages by ginsan. *Immunopharmacology*, v. 2, p. 857-865, 2002.

SREELEKHA, T. T.; VIJAYAKUMAR, T.; ANKANTHIL, R.; VIJAYAN, K. K.; NAIR, M. K. Immunomodulatory effects of a polysaccharide from *Tamarindus indica*. *Anti-Cancer Drugs*, v. 4, p. 209-212, 1993.

STAHL, P.; SCHLESINGER, P. H.; SIGARDSON, E.; RODMAN J. S.; LEE Y. C. Receptor-mediated pinocytosis of mannose glycoconjugates by macrophages: characterization and evidence for receptor recycling. *Cell*, v. 19, p. 207-215, 1980.

STEVENS, B. J. H.; SELVENDRAN, R. R. Hemicellulosic polymers of cabbage leaves. *Phytochemistry*, London, v. 23, n. 2, p. 339-347, 1984.

STUEHR, D. J.; MARLETTA, M. A. Induction of nitrite/nitrate synthesis in murine macrophages by GCG infection, lymphokines or interferon- $\gamma$ . *Journal of Immunology*, v. 139, p. 518, 1987.

STUEHR, D. J.; SANTOLINI, J.; WANG, Z. Q.; WEI, C. C.; ADAK, S. Update on mechanism and catalytic regulation in the no synthases. *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 35, p. 36167-36170, 2004.

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

STUPO, T.; FREITAS, R. A.; SIERAKOWSKI, M. R.; DESCHAMPS, F. C.; WISNIEWSKI JR., A.; BIAVATTI, M. W. Characterization and potential uses of *Copaifera langsdorffii* seeds and seed oil. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 2659-2663, 2008.

SUISSA, F.; KAWASAKI, N.; MIYAZAKI, S. SHIRAKAWA, M.; YAMATOYA, K.; SASAKI, M.; ATTWOOD, D. Xyloglucan gels as sustained release vehicles for the intraperitoneal administration of mytomycin C. *International Journal of Pharmacology*, v. 172, p. 27-32, 1998.

SUMATHI, S.; RAY, A. R. Release behaviour of drugs from tamarind seed polysaccharide tablets. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, v. 5, p. 12-18, 2002.

SUN, J; ZHANG, X; BRODERICK, M.; FEIN, H. Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess reaction assay. *Sensors*, v. 3, p. 276-284, 2003.

SUN, X.; ANDREW, I. G.; JOBLIN, K. N.; HARRIS, P. J.; McDonald; HOSKIN, S. O. Polysaccharides compositions of leaf cell wall of forage chicory (*Chicorium intybus* L.). *Plant Science*, v.170, p. 18-27, 2006.

SZYMANSKI, D. B.; COSGROVE, D. J. Dynamic coordination of cytoskeletal and cell review wall systems during plant cell morphogenesis. *Current Biology*, v. 19, p. 800-811, 2009.

TAKADA, T.; KATAGIRI, T.; IFUKU, M.; MORIMURA, N.; KOBAYASHI, M.; HASEGAWA, K.; AGAMO, A.; KAMIJO, R. Sulfated polysaccharides enhance the biological activities of bone morphogenetic proteins. *Journal of Chemical Biology.*, v. 44(31), p. 43229-43235, 2003.

TAKAHASHI, A.; SUZUKI, S.; KAWASAKI, N.; KUBO, W.; MIYAZAKI, S.; LOEBENBERG, R.; BACHYNSKY, J.; ATTWOOD, D. Percutaneous absorption of non-steroidal anti-inflammatory drugs *in situ* gelling xyloglucan formulations in rats. *International Journal of Pharmacology*, v. 246, p. 179-186, 2002.

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

TARTAGLIA, L. A.; GOEDDEL, D. V. Two TNF receptors. *Immunology Today*, Limerick, v. 13, n. 5, p. 151-153, 1992.

TAYLOR, P. R.; MARTINEZ-POMARES, L.; STACEY, M.; LIN, H. H.; BROWN, G. D.; GORDON, S. Macrophage receptors and immune recognition. *Annual Review of Immunology*, v. 23, p. 901-44, 2005.

TEIXEIRA, D. M. A. *Isolamento e caracterização de um par lectina-receptor endógeno de semente de Mucuna sloanei (Fawcett & Rendle)*. Trabalho de Tese de Doutorado em Ciências Bioquímicas - Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

TINÉ, M. A. S.; LIMA, D. U. de; BUCKERIDGE, M. S. Galactose branching modulates the action of cellulase on seed storage xyloglucans. *Carbohydrate Polymers*, v. 52, p. 135-141, 2003.

TINÉ, M. A. S.; SILVA, C. O.; LIMA, D. U. de; CARPITA, N. C.; BUCKERIDGE, M. S. Fine structure of a mixed-oligomer storage xyloglucan from seeds of *Hymenaea courbaril*. *Carbohydrate Polymers*, v. 66, p. 444-454, 2006.

TSIAPALI, E.; WHALEY, S.; KALBFLEISCH, J.; ENSLEY, H. E.; BROWDER, I. W.; WILLIAMS, D. L. Glucans exhibit weak antioxidant activity, but stimulate macrophage free radical activity. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 30, n. 4, p. 393–402, 2001.

TZIANABOS, A. O. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 13, n. 4, p. 523-533, 2000.

USHIO-FUKAI, M. Compartmentalization of redox signaling through NADPH oxidase-derived ROS. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 11, p. 1289–1299, 2009.

VARIN, A.; GORDON, S. Alternative activation of macrophages: Immune function and cellular biology. *Immunobiology*, v. 214, p. 630–641, 2009.

VARNER, J. E.; LIN, L. S. Plant cell architecture. *Cell*, v. 56, p. 231-239, 1989.

VIERHIUS, E.; SCHOLS, H. A.; BELDMAN, G.; VORAGEN, A. G. J. Structural characterization of xyloglucan and xylans present in olive fruit (*Olea europaea* cv Koroneiki). *Carbohydrate Polymers*, v. 44, p. 51-62, 2001.

VIGNAIS, P. V. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 59, p. 1428–1459, 2002.

VINAY, D. S.; KWON, B. S. TNF superfamily: Costimulation and clinical applications. *Cell Biology International*, v. 33, p. 453-465. 2009.

VINCKEN, J. P.; WIJSMAN, A. J. M.; BELDMAN, G.; NIESSEN, W.M.A.; VORAGEN, A.G.J. Potato xyloglucan is built from XXGG-type subunits. *Carbohydrate Research*, v. 288, p. 219-232, 1996.

VINCKEN, J. P.; YORK, W. S.; BELDMAN, G.; VORAGEN, A. G. J. Two general branching patterns of xyloglucan, XXXG and XXGG. *Plant Physiology*, v. 114, p. 9-13, 1997.

XIE, Q.-W.; CHO, H. J.; CALAYCAY, J.; MUMFORD, R. A.; SWIDEREK, K. M.; LEE, T. D.; DING, A.; TROSO, T.; NATHAN, C. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science*, v. 256, p. 225–228, 1992.

XIE, G.; SCHEPETKIN, I. A.; SIEMSEN, D. W.; KIRPOTINA, L. N.; WILEY, J. A.; QUINN, M. T. Fractionation and characterization of biologically-active polysaccharides from *Artemisia tripartite*. *Phytochemistry*, v. 69, p. 1359–1371, 2008.

YAMATOYA, K.; SHIRAKAWA, M.; KUWANO, K.; SUZUKI, J.; MITAMURA, T. Effects of hydrolyzed xyloglucan on lipid metabolism in rats. *Food Hydrocolloids*, v. 10, p. 369-372, 1996.

- 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.
- YANG, X.; ZHAO, Y.; WANG, H.; MEI, Q. Macrophage activation by an acidic polysaccharide isolated from *Angelica Sinensis* (Oliv.) Diels. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, v. 40, n. 5, p. 636-643, 2007.
- YANG, X.; ZHAO, Y.; YANG, Y.; RUAN, Y. Isolation and Characterization of Immunostimulatory Polysaccharide from an Herb Tea, *Gynostemma pentaphyllum* Makino. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, p. 6905–6909, 2008.
- YARIV, J.; RAPPORT, M. M.; GRAF, L. The interaction of glycosides and saccharides with antibody to the corresponding phenylazo glycosides. *Biochemical Journal*, v. 85, p. 383–388, 1962.
- YIN, J. Y.; NIE, S. P.; ZHOU, C.; WAN, Y.; XIE, M. Y. Chemical characteristics and antioxidant activities of polysaccharide purified from the seeds of *Plantago asiatica* L. *Journal of the Science of Food and Agriculture.*, v. 90, p. 210–217, 2010.
- YORK, W. S.; KUMAR-KOLLI, V. S.; ORLANDO, R.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A. G. The structures of arabinoxyloglucans produced by solanaceous plants. *Carbohydrate Research*, v. 285, p. 99-128, 1996.
- YORK, W. S.; O'NEILL, M. A. Biochemical control of xylan biosynthesis: which end is up? *Current Opinion in Plant Biology*, v. 11, p. 258–265, 2008.
- YUGUCHI, Y.; KUMAGAI, T.; WU, M.; HIROTSU, T.; HOSOKAWA, J. Gelation of xyloglucan in water/alcohol systems. *Cellulose*, v. 11, p. 203–208, 2004.
- YUGUCHI, Y.; HIROTSU, T.; HOSOKAWA, J. Structural Characteristics of Xyloglucan – Congo Red Aggregates as Observed by Small Angle X-ray Scattering. *Cellulose*, v. 12, n. 5, p. 469-477, 2005.
- WAKABAYASHI, T.; HIROKAWA, S.; YAMAUCHI, N.; KATAOKA, T.; WOO, J.; NAGAI, K. Immunomodulating activities of polysaccharide fractions from dried safflower petals. *Cytotechnology*, v. 25, p. 205–211, 1997.
- WANG, Q.; ELLIS, P. R.; ROSS-MURPHY, S. B.; REID, J. S. G. A new polysaccharides from a traditional Nigerian plant food: *Detarium senegalense* Gmelin. *Carbohydrate Research*, v. 284, p. 229-239, 1996.
- WANG, G. NADPH oxidase and reactive oxygen species as signaling molecules in carcinogenesis, *Frontiers of Medicine in China*, v. 3, p. 1-7, 2009.

WANG, J.; ZUO, G.; LI, J.; GUAN, T.; LI, C.; JIANG, R.; XIE, B.; LIN, X.; LI, F.; WANG, Y.; CHEN, D. Induction of tumoricidal activity in mouse peritoneal macrophages by ginseng polysaccharide. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 46, p. 389–395, 2010.

WEIGERT, A.; BRÜNE, B. Nitric oxide, apoptosis and macrophage polarization during tumor progression. *Nitric Oxide*, v. 19, p. 95–102, 2008.

WISE, L. E.; MURPHY, M.; D'ADDIECO, A. Chlorite holocellulose, its fractionation and bearing on summative wood analyses and on studies on the hemicelluloses. *Paper Trade Journal*, v. 122, n. 2, p. 35-46, 1946.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, v. 2, p. 65-68, 1963a.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetylation. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, v. 2, p. 211-215, 1963b.

ZABLACKIS, E.; HUANG, J.; MÜLLER, B.; DARVILL, A G.; ALBERSHEIM, P. Characterization of the cell-wall polysaccharides of *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant Physiology*, v. 107, p. 1129-1138, 1995.

ZHUANG, J. C.; WOGAN, G. N. Growth and viability of macrophages continuously stimulated to produced nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 94, p. 11875-11880, 1997.

ZHONG, R.; YE, Z. *Secondary cell walls*. Encyclopedia of Life Sciences. John Willey & Sons, 9 p., 2009.

## APÊNDICE

G Model  
CBI-6373: No. of Pages 7

## ARTICLE IN PRESS

Chemico-Biological Interactions xxx (2010) xxx–xxx



Contents lists available at ScienceDirect

## Chemico-Biological Interactions

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



## Storage xyloglucans: Potent macrophages activators

Marianna Maia Taulois do Rosário, Mônica Mendes Kangussu-Marcolino, Alex Evangelista do Amaral, Guilhermina Rodrigues Noletto, Carmen Lúcia de Oliveira Petkowicz \*

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 8 July 2010  
Received in revised form  
22 September 2010  
Accepted 23 September 2010  
Available online xxx

## Keywords:

Xyloglucans  
Macrophages  
Nitric oxide  
Interleukins  
Tumor necrosis factor

## ABSTRACT

Storage xyloglucans from the seeds of *Copaifera langsdorffii*, *Hymenaea courbaril* and *Tamarindus indica* were obtained by aqueous extraction from the milled and defatted cotyledons, XGC, XGJ and XGT, respectively. The resulting fractions showed similar monosaccharide composition with Glc:Xyl:Gal molar ratios of 2.4:1.5:1.0, 3.8:1.5:1.0 and 3.6:2.4:1.0 for XGC, XGJ and XGT, respectively. High-performance size-exclusion chromatography of the polysaccharides showed unimodal profiles, and the average molar mass ( $M_w$ ) was obtained for XGC ( $9.6 \times 10^5$  g/mol), XGJ ( $9.1 \times 10^5$  g/mol) and XGT ( $7.3 \times 10^5$  g/mol). The immunomodulatory effects of the xyloglucans on peritoneal macrophages were evaluated. Phagocytic activity was observed in macrophages treated with XGT. The effect of XGT was tested on the production of  $O_2^{\bullet-}$  and NO. At 25  $\mu$ g/ml XGT caused a 100% increase in NO production when compared to the control group; however, it did not affect  $O_2^{\bullet-}$  production in the absence of PMA. The production of TNF- $\alpha$ , interleukins 1 $\beta$  and 6 by macrophages in the presence of the xyloglucans was evaluated. The polysaccharides affected the production of the cytokines by macrophages to different degrees. XGC caused an enhancement of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  production, compared to the other xyloglucans. For IL-6 production, XGT gave greater stimulation than XGC and XGJ, reaching 87% at 50  $\mu$ g/ml. XGJ promoted a statistically significant effect on all cytokine productions tested. The results indicate that the xyloglucans from *C. langsdorffii*, *H. courbaril* and *T. indica* can be classified as biological response modifiers (BRM).

© 2010 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Xyloglucans are heteropolysaccharides that form a massive deposit as a storage function in the cell wall of cotyledons of some leguminous seeds [1–5]. Storage xyloglucans consist of a cellulose-like backbone carrying single  $\alpha$ -D-xylopyranosyl units attached to the O-6 (branching point designated X). Some xylosyl residues have additional substitutions at the O-2 by  $\beta$ -D-galactopyranosyl (branching point designated L). Nonsubstituted glucosyl units in the backbone are designated G [6]. A comparative study of the fine structure of xyloglucans from the seeds of *Copaifera langsdorffii*, *Tamarindus indica* and *Hymenaea courbaril* has shown that they are composed of the same four xylocellotetraosyl units: XXXG, XLXG, XXLXG and XLLG [7–9]. However, the *H. courbaril* xyloglucan also contains xylocellopentaosyl (XXXXXG) and xylocellohexaosyl (XXXXXXG) units [8,10]. The proportion and arrangement of these oligosaccharides in xyloglucans can give rise to chains with conformational differences [7,10], which could display different properties [4]. The xyloglucans obtained from *C. langsdorffii* and

*H. courbaril* seeds showed distinct immunomodulatory responses, which were attributed to the differences in the molar mass and fine structure of the polymers [11].

Macrophages play a critical role in the host immunological response due to its ability to recognize, engulf and kill pathogens [12–14]. Some polysaccharides have been shown to increase the macrophage cytotoxic activity against tumor cells and microorganisms, activate phagocytic activity, increase the reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) production and enhance the secretion of cytokines and chemokines, such as tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ), interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, IFN- $\gamma$  and IFN- $\beta$ 2 [15–17]. Xyloglucans from *C. langsdorffii* and *H. courbaril* seeds stimulated the migration of macrophages into the peritoneum of mice and showed *in vitro* activation, evidenced by the enhanced NO production [11]. However, the effect of these xyloglucan on the secretion of cytokines and the phagocytic activity of macrophage remains unknown. There is evidence that the storage xyloglucan from *T. indica* is biologically active [18,19]. However, the data on the effects of this polysaccharide on macrophage activation are inconclusive and sparse.

Considering the significant effects previously observed for storage xyloglucans on peritoneal macrophages, the aim of this study was to evaluate the effect of the xyloglucan from *T. indica* seeds on  $O_2^{\bullet-}$  and NO production. We evaluated the effects of the xyloglu-

\* Corresponding author at: C.P.19046, CEP 81531-990, Curitiba, Paraná, Brazil.  
Tel.: +55 41 3361 1661; fax: +55 41 3266 2042.  
E-mail address: [clp@ufpr.br](mailto:clp@ufpr.br) (C.L.d.O. Petkowicz).

cans from *C. langsdorffii*, *H. courbaril* and *T. indica* seeds on other parameters of macrophages, such as phagocytic activity and the secretion of interleukin 1 $\beta$ , interleukin 6 and tumor necrosis factor, to understand the action of these polymers on macrophages activation.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), lipopolysaccharide (LPS), N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid (HEPES), ferricytochrome c, superoxide dismutase (SOD) (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) (MTT), sulfanilamide, naphthylethylenediamine were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). All other reagents were commercial products of the highest available purity and were obtained from Merck. Tissue culture materials were provided by Corning or Nunc. Eagle minimum essential medium (MEM) was supplied by Flow Laboratories. Fetal bovine serum was obtained from Cultilab (Brazil). PMA was dissolved in Me<sub>2</sub>SO and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  as a 1 mg/ml stock solution. Other chemical reagents were obtained from Merck. ELISA kits for Mouse IL-1 beta (IL-1b) ELISA Ready-SET-GO!, Mouse IL-6 ELISA Ready-SET-GO! and Mouse TNF- $\alpha$  ELISA Ready-SET-GO! were obtained by eBioscience.

### 2.2. Isolation and characterization of polysaccharides

Seeds from *H. courbaril*, *T. indica* and *C. langsdorffii* were acquired from IPEF (Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais, São Paulo, Brazil), and their isolated cotyledons were used for the extraction of the xyloglucans (XGJ, XGT and XGC) as described by Rosário et al. [11].

The total amount of carbohydrate was estimated by the phenol-sulfuric acid method [20] and the protein by the Hartree method [21]. Total acid hydrolysis was performed as previously described [11]. Monosaccharides were reduced with NaBH<sub>4</sub> [22] and acetylated with Ac<sub>2</sub>O-pyridine (1:1, v/v, 16 h, at 25  $^{\circ}\text{C}$ ) [23,24]. The resulting alditol acetates were analyzed by gas chromatography, using a 5890 A II HP gas chromatograph at 220  $^{\circ}\text{C}$  (FID and injector temperature, 250  $^{\circ}\text{C}$ ) with a DB-210 capillary column (0.25 mm i.d.  $\times$  30 m), 0.25  $\mu\text{m}$  film thickness and N<sub>2</sub> carrier gas (2.0 ml/min).

The average molar mass ( $M_w$ ) of the xyloglucans was determined by high pressure size exclusion chromatography (HPSEC) coupled to a refractive index (RI) and a Wyatt Technology Dawn-F multi-angle laser light scattering (MALLS) detector. Four Waters Ultrahydrogel 2000/500/250/120 columns were connected in series and coupled to the multidetection equipment. The eluent was 0.1 M NaNO<sub>2</sub>, containing 200 ppm NaN<sub>3</sub>. The HPSEC data were collected and analyzed by a Wyatt Technology ASTRA program.

The values of the dn/dc (differential refractive index increment of the solvent-solute solution with respect to a change in the solute concentration) were 0.109, 0.129 and 0.132, for XGC, XGJ and XGT, respectively.

### 2.3. Macrophage isolation

Swiss mice (6–8 weeks old) were used as the peritoneal macrophage donors. All recommendations of the Brazilian National Law (No. 6.638,05 November 1979) for the scientific management of animals and procedures were approved by the Institution's Animal Ethics Committee.

The peritoneal macrophages from the mice were collected by infusing their peritoneal cavity with 8 ml of sterile phosphate-buffered saline (PBS). The cells were plated in culture medium

(MEM, 5% fetal bovine serum and antibiotics) to give  $5 \times 10^5$  cells/well in 96 well dishes. After a 1 h incubation at 37  $^{\circ}\text{C}$  under 5% CO<sub>2</sub> in a humidified incubator, the nonadherent cells were removed by washing twice with PBS at 37  $^{\circ}\text{C}$ .

### 2.4. Cytotoxicity assays

The adherent macrophages were incubated for 2 h and 48 h in the absence (control) or presence of XGT at various concentrations (5–100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). The toxicity was evaluated using the MTT method [25].

### 2.5. Assay for phagocytic activity

The phagocytic activity was assayed using yeasts as the phagocytosing particles. Briefly, a macrophage monolayer ( $5 \times 10^5$  cells/well), adhered onto a glass coverslip and contained in a tissue culture plate (24 wells), was incubated with the standard medium in the absence (control) or presence of varying concentrations of XGC, XGJ and XGT (10, 25 and 50 mg/ml). After 48 h at 37  $^{\circ}\text{C}$  under 5% CO<sub>2</sub>, the cells were washed three times with the MEM, and the yeast (ratio of macrophages to yeast, 1:10) was added, following incubation under the same conditions up to 1 h. After each incubation time, non-phagocytic yeasts were removed by rinsing with PBS. The coverslips were then fixed with Bouin's fixative, stained with Giemsa for 1 h and dehydrated in acetone. The slides were mounted with Entelan. To obtain the ratio of phagocytic yeasts/macrophage, the slides were examined microscopically (BEL Photonics) [26].

### 2.6. Superoxide anion production

The adherent macrophages were incubated in a reaction mixture consisting of HBSS, containing ferricytochrome c (80  $\mu\text{M}$ ). XGT was added at 10–500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . PMA (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) and medium were used as positive and negative controls, respectively. The absorbance at 550 nm was measured after 2 h, and the amount of superoxide anion released was calculated by dividing the difference in the absorbance of the samples, with or without superoxide dismutase, by the extinction molar coefficient  $C_{\text{oxid,red}} \Delta \epsilon = 2.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  for reduced cytochrome c [27,28]. The results are expressed as  $\mu\text{mol}$  of reduced cytochrome c per  $5 \times 10^5$  cells.

### 2.7. Nitrite quantification

The adherent macrophages ( $5 \times 10^5$  cells/well) were incubated with XGT (10–50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) and LPS (100 ng/ml) as control. After 48 h, the isolated supernatants were mixed with an equal volume of Griess reagent and incubated at room temperature for 10 min [29]. The absorbance was measured at 550 nm, and the nitrite concentration was calculated from a NaNO<sub>2</sub> standard curve. The results are expressed as  $\mu\text{mol}/5 \times 10^5$  cells.

### 2.8. IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ quantification

The adherent macrophages ( $6 \times 10^5$  cells/well) were incubated in a 24-well tissue culture plate with standard medium in the absence (control) or presence of varying concentrations of XGC, XGJ and XGT (10, 25 and 50 mg/ml). LPS (100 ng/ml) was used as a positive control. After 24 h, the supernatant from the culture was collected and maintained at  $-70^{\circ}\text{C}$  until utilization. The IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  concentrations in the supernatant were determined using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (eBioscience). The manufacturer's instructions were followed.

### 2.9. Statistical analysis

The statistical analysis of the data was carried out using an analysis of variance (ANOVA) test. The test of Tukey was used to determine the statistical significance ( $*p < 0.05\%$ ).

## 3. Results

### 3.1. Isolation and characterization of polysaccharides

Storage xyloglucans from *C. langsdorffii*, *H. courbaril* and *T. indica* (XGC, XGJ and XGT, respectively) were obtained by aqueous extraction from milled and defatted cotyledons. From the chemical analysis, XGC, XGJ and XGT showed similar sugar content (higher than 90%) and low protein content ( $\sim 3\%$ ). The polysaccharides had Glc:Xyl:Gal ratios of 2.4:1.5:1.0, 3.8:1.5:1.0 and 3.6:2.4:1.0 for XGC, XGJ and XGT, respectively.

The polysaccharides XGC, XGJ and XGT were analyzed by HPSEC with multi-angle laser light scattering and refractive index detection. The elution profiles show a unimodal mass distribution with average molar masses ( $M_w$ ) of  $9.6 \times 10^5$ ,  $9.1 \times 10^5$  and  $7.3 \times 10^5$  g/mol for XGC, XGJ and XGT, respectively.

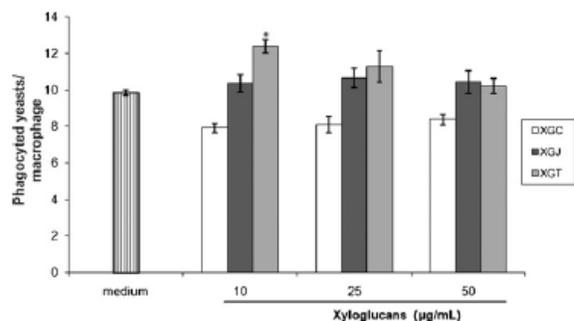
### 3.2. Phagocytic activity of peritoneal macrophages treated with xyloglucans

To determine the non-toxic concentration of the xyloglucan, adherent macrophages were incubated with XGT at different concentrations (5–100  $\mu\text{g/ml}$ ) for 2 and 48 h, and the cell viability was evaluated by the MTT method. This polysaccharide did not show any cytotoxic effects under the concentrations and conditions used (data not shown). In a previous study, the concentrations that were non-toxic to XGC and XGJ were determined [11].

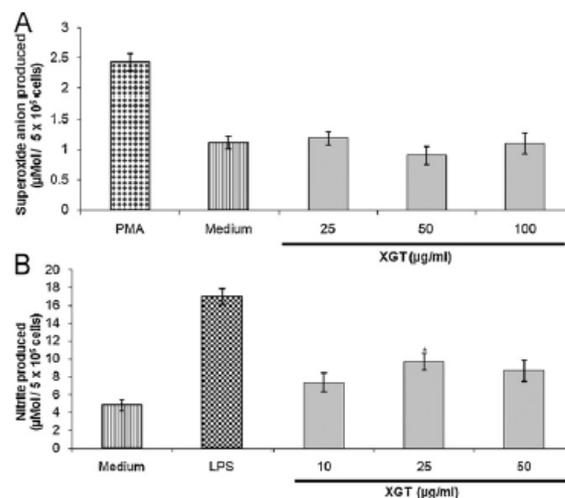
The phagocytic activity was determined from the ratio of phagocytosed yeasts/macrophage treated and untreated with xyloglucans. Only XGT at 10  $\mu\text{g/ml}$  produced a significant increase ( $\sim 25\%$ ;  $1.3 \times$ ) in the phagocytic activity of peritoneal macrophages when they were incubated with the polymers (Fig. 1). In contrast, XGC at the same concentration inhibited approximately 20% ( $1.25 \times$ ) of the phagocytic activity and XGJ did not modify in this parameter.

### 3.3. Effect of XGT on the production of superoxide anion and nitric oxide by peritoneal macrophages

To evaluate if XGT could affect the respiratory burst, the superoxide anion production was measured. Adherent macrophages



**Fig. 1.** Effect of xyloglucans on the phagocytic activity of macrophages. Adherent macrophages were cultivated in the absence (control) or presence of XGC, XGJ and XGT for 48 h, after which the medium was removed and yeasts (1:10) were added following incubation for 1 h. The phagocytic activity was obtained from the ratio of phagocytosed yeasts to macrophage. This result is expressed as mean  $\pm$  SE (standard error) for two independent experiments in triplicate.



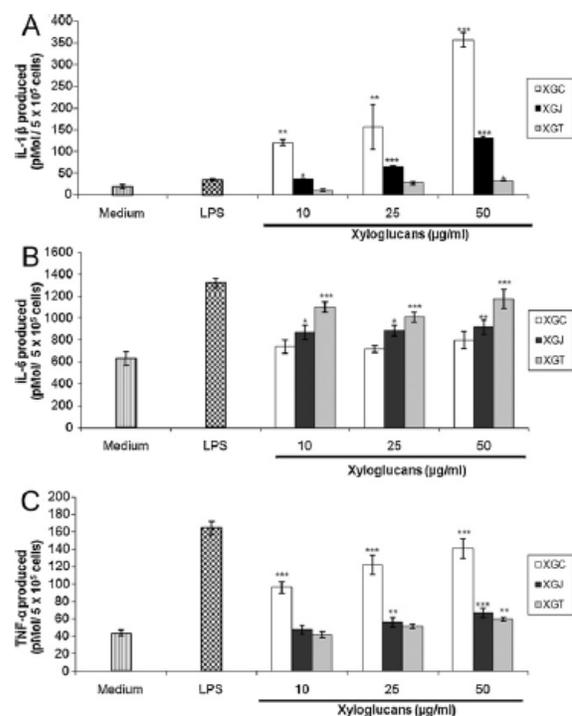
**Fig. 2.** Effect of XGT on superoxide anion and nitric oxide production by macrophages after 2 h of treatment. (A) Adherent macrophages were incubated in a mixture consisting of HBSS containing ferricytochrome c (80  $\mu\text{M}$ ) and the polysaccharide XGT. As control, the cells were incubated with PMA. The absorbance was measured at 550 nm to identify the  $\text{O}_2^{\cdot-}$  production. This result is expressed as mean  $\pm$  SE from three independent experiments in quadruplicate. (B) Adherent macrophages were incubated and supplemented with MEM and the polysaccharide XGT. As control, the cells were incubated with LPS (100  $\mu\text{g/ml}$ ). The absorbance was measured at 550 nm to identify the  $\text{NO}_2^-$  production after 48 h of treatment. This result is expressed as mean  $\pm$  SE from three independent experiments in quintuplicate. \*Significant difference from the control (medium) group by the Tukey test ( $p < 0.05$ ).

were incubated in solution with varying concentrations of XGT using PMA, an agent that triggers an *in vitro* respiratory burst, as a positive control. Fig. 2A shows that no interference in the superoxide anion production by XGT was found for any of the concentrations tested.

To evaluate the role of XGT on NO production by the peritoneal macrophages, concentrations of 10, 25 and 50  $\mu\text{g/ml}$  were used (Fig. 2B). The nitrite/nitrate concentration of the culture supernatant was significantly altered by 25  $\mu\text{g/ml}$  XGT, which indicates an increase of 100% in the NO production when compared to the negative control (medium). This suggests that XGT may stimulate the NO production of peritoneal macrophages.

### 3.4. Effect of xyloglucans on the production IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ by peritoneal macrophages

The secretory effects of XGC, XGJ and XGT on the production of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  by macrophages were determined. The peritoneal macrophages were treated with various concentrations of XGC, XGJ and XGT for 24 h, and the culture supernatants were assayed for cytokines. As shown in Fig. 3, the treatments with the different xyloglucans gave varying levels of cytokines produced by the peritoneal macrophages. At the lowest concentration (10  $\mu\text{g/ml}$ ), XGC caused a 522% increase of in IL-1 $\beta$  production, compared to the control group (Fig. 3A). The effect was dose-dependent, with the IL-1 $\beta$  production reaching 1704% at 50  $\mu\text{g/ml}$ . With XGJ, IL-1 $\beta$  production increased from 90% to 577% at 25  $\mu\text{g/ml}$  and 50  $\mu\text{g/ml}$ , respectively. For XGT, the stimulation of IL-1 $\beta$  production was significantly lower than XGC and XGJ, reaching 35% at 50  $\mu\text{g/ml}$ . Fig. 3B shows the results of IL-6 production. XGC did not interfere in the secretion of IL-6. XGJ promoted a 45% increase in IL-6 production at the highest concentration (50  $\mu\text{g/ml}$ ), compared to the untreated cells. At the lowest concentration (10  $\mu\text{g/ml}$ ), XGT promoted an increase of 75%



**Fig. 3.** IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  production by peritoneal macrophages stimulated by xyloglucans. The adherent macrophages were incubated with supplemented MEM and the polysaccharides XGC, XGJ and XGT (10, 25 and 50  $\mu$ g/ml). As control, the cells were incubated with LPS (100  $\mu$ g/ml). Culture supernatants were collected after 24 h, and the levels of IL-1 $\beta$  (3A), IL-6 (3B) and TNF- $\alpha$  (3C) were measured by ELISA. The results are expressed as mean  $\pm$  SE for two independent experiments in quadruplicate. \*Significant difference from the control (medium) group by the Tukey test ( $p < 0.05$ ).

in IL-6 production, reaching 87% at 50  $\mu$ g/ml versus the control group.

The TNF- $\alpha$  production following the macrophage treatment by xyloglucans is shown in Fig. 3C. XGC promoted an enhancement of TNF- $\alpha$  production from 119% to 220% (10–50  $\mu$ g/ml), in relation to the control. For XGJ, the effect occurred from 25  $\mu$ g/ml to 50  $\mu$ g/ml, and the enhancement of the TNF- $\alpha$  production ranged from 27% to 58%, respectively, in relation to the control. Only at 50  $\mu$ g/ml XGT was a significant increase observed, reaching 35% in the TNF- $\alpha$  production.

#### 4. Discussion

Considering the importance of macrophage activation to execute their functions for the organism defense, compounds with this potential are of great interest. Polysaccharides from different sources, plants especially, could be classified as biological response modifiers (BRMs) because they have a number of beneficial therapeutic properties, such as augmenting the immune response of macrophages [15,30–32]. Activated macrophages participate in both specific and nonspecific immune reactions and are the “bridge cells” for these two types of immune reactions [33,34]. In addition to activating the phagocytosis, they have been shown to modify their morphology, increase the reactive oxygen species and nitric oxide production and the secretion of cytokines and chemokines. These activations result in the enhancement of bactericidal potency against a wide variety of microorganisms and lethal effects against tumor cells [12,15,35–37]. Few studies have been performed to

evaluate the effects of the xyloglucans on macrophage functions [11,18,19]. In the present work, we investigated the immunostimulating capacity of xyloglucans obtained from *C. langsdorffii*, *H. courbaril* and *T. indica* seeds through the modulation of macrophage functioning.

Phagocytosis is the first step in the response of macrophages to invading microorganisms. We used the phagocytic activity of macrophage-like cells as an indicator of the immune function activation. Our results show that the ratio of yeast phagocytosis by macrophages was modified only in the presence of XGT. Previously, it was reported that the *T. indica* xyloglucan at 160  $\mu$ g/ml stimulated the capacities of phagocytosis by 58% [19]. In the present work, an increase of  $\sim$ 25% in the phagocytic activity was observed at a lower concentration (10  $\mu$ g/ml). Using a similar protocol, ARAGAL, an arabinogalactan extract from *Anadenathera colubrina*, stimulated the phagocytosis by 42.4–57% with 25–100  $\mu$ g/ml, respectively, after 1 h of incubation. Thus, this polymer is a more potent activator for this pathway than xyloglucans [26]. Ramesh et al. [38] measured the increase in the phagocytic activity of macrophages treated with fenugreek galactomannan using a different protocol, measuring the fluorescence produced by cells responding to fluorescein isothiocyanate-labeled zymosan [38]. The crude polysaccharides extracted from the leaves of green tea (*Camellia sinensis*) promote immunostimulating activity. Its effects were attributed to the high molar mass of the polysaccharides and the total catechin content in the leaf extract [39].

Whether a consequence of phagocytosis or not, the activation of macrophages could trigger the oxidative burst, which is characterized by the enhancement of glucose and oxygen uptake and the production of reactive oxygen intermediates, such as superoxide ( $O_2^{\bullet-}$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and the hydroxyl radical ( $HO^{\bullet}$ ), stimulates specific protein secretion [13,15,40]. With respect to this activation pathway, the *T. indica* xyloglucan does not significantly promote the enhancement of  $O_2^{\bullet-}$  production, compared with untreated macrophages (medium) (Fig. 2A). In previous studies, it was observed that XGJ and XGC did not interfere with the respiratory burst [11]. On the other hand, Pauly et al. [19] described that the xyloglucan of *T. indica* was capable of inducing the production of  $O_2^{\bullet-}$  when compared to a control group. However, in this work, the effect was determined using different experimental conditions, such as monocytes, which are cells that later differentiate into macrophages.

Different behavior has been observed in other classes of polysaccharides from plants with respect to  $O_2^{\bullet-}$  production. An arabinogalactan polymer, isolated from the plant *Phyllanthus niruri*, promoted an increase in the production of  $O_2^{\bullet-}$ , and this effect was three times greater when compared to a control group [41,42]. Another arabinogalactan, isolated from the leaves of *Artemisia tripartita*, exhibited the opposite effects with respect to the detection of  $O_2^{\bullet-}$  with neutrophils and macrophages in the presence of the polymer. The authors attributed this behavior to the scavenger activity of the polysaccharide toward  $O_2^{\bullet-}$  when it is secreted extracellularly [43]. Acidic polysaccharide fractions, purified from the aqueous extract of *Tanacetum vulgare*, had different molar mass and exhibited potent macrophage activating activity, enhancing the production of the reactive oxygen species. Although all fractions from *T. vulgare* had a similar monosaccharide composition, only two fractions exhibited the most potent immunoenhancing activity and stimulated murine macrophages to produce significant levels of the ROS and NO [44]. Arabinogalactan, extracted from *Anadenathera colubrina* gum, gave activation of the respiratory burst when the animals were inoculated intraperitoneally with 100 or 200 mg/kg of the polymer [26]. The evaluation of the effect by the polysaccharides on the production of superoxide anion appears to be complex because it can vary with the type of polysaccharide, the cell type,

the receptors involved in activating the pathway and the method of radical detection [43].

Fig. 2B shows that XGT can stimulate NO production by mouse peritoneal macrophages. The increase in NO production by XGT at 50  $\mu\text{g/ml}$  was similar to that obtained with the xyloglucan from *H. courbaril* at the highest concentration (50  $\mu\text{g/ml}$ ), reaching 92%. However, stimulation of NO production by XGC (307%) with the same concentration was greater than the other xyloglucans studied [11]. Increasing NO production has been characterized for other classes of polysaccharides described as biological response modifiers [45]. The stimulation of NO production by XGT was greater than that observed for a galactomannan from the lichen *Ramalina celastri*, which enhanced NO production by 40% when compared to untreated cells [26,43,45–48]. At 50  $\mu\text{g/ml}$ , a heteropolysaccharide obtained from *Gynostemma pentaphyllum* tea, enhanced NO production from macrophages. This effect was five times higher when compared with a control group [46]. Many studies have shown the potential of arabinogalactans polymers, extracted from different plant sources, in the induction of NO production by macrophages [26,43,47]. Schepetkin et al. [47] evaluated the induction of iNOS protein expression and NO production by increasing the amounts of polysaccharide fractions from *Juniperus scopolorum* by using murine peritoneal macrophages. The increase in NO production was time- and dose-dependent for 20–100  $\mu\text{g/ml}$  of polysaccharides. Similar results were observed with an acidic polysaccharide isolated from *Angelica sinensis* roots at 3–500  $\mu\text{g/ml}$ , which increased NO production by the induction of iNOS expression [48].

The surfaces of macrophages contain a diverse array of receptors that may bind different polysaccharides and activate them for the production of mediators, such as cytokines that serve as the primary communicators of the innate immune response, and additionally define the nature of the developing acquired immunity [49–51]. In the present work, the ability of storage xyloglucans to induce the production and secretion of TNF- $\alpha$  and interleukins 1 $\beta$  and 6 by macrophages treated with these polysaccharides was investigated. Different response intensities of the cytokine production by the macrophages in the presence of xyloglucans, which could be compared with NO release, were observed. IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  were produced by macrophages treated with XGC in a dose-dependent manner; however, this compound did not show any effect on IL-6 production. XGT gave the lowest production of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  at the highest concentration tested (50  $\mu\text{g/ml}$ ), but the stimulation of IL-6 production was greater than for the other xyloglucans analyzed. Song et al. [52] verified the induction of TNF- $\alpha$  mRNA in macrophages 3 h after treatment with ginsan, a polysaccharide from *Panax ginseng*, composed of  $\alpha(1 \rightarrow 6)$  glucopyranoside and  $\beta(2 \rightarrow 6)$  fructofuranoside. For IL-1 and IL-6, they observed that the effects were dose-dependent and reached the maximum only after 24 h of treatment. Wang et al. [34] treated the macrophages with a polysaccharide fraction obtained from ginseng with 50–200  $\mu\text{g/ml}$ , and after 48 h they observed the enhanced secretion of IL-1, IL-6 and TNF- $\alpha$ .

Arabinogalactan from the gum of the plant *A. colubrina* promoted the secretion of TNF- $\alpha$  in mice peritoneal macrophages treated with the polymer for 24 h [53]. Schepetkin et al. [47] extracted five fractions from *Juniperus scopolorum* cones, which contained arabinogalactans with different molar mass. All fractions were tested to evaluate the macrophage responses, and different intensities were observed for the secretion of inflammatory (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , and IL-12) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines. More recently, similar results were realized with five polysaccharides obtained after purification from the aqueous extraction from the leaves of *A. tripartita*. These fractions showed the same monosaccharide composition but had different proportions and molar masses, resulting in different stimuli of IL-6, TNF- $\alpha$  and

IL-10 production [43]. Macrophages treated with acidic polysaccharides extracted from *Opuntia polyacantha* resulted in significantly enhanced TNF- $\alpha$  and IL-6 production in a concentration-dependent manner. The levels of TNF- $\alpha$  induced by 20–40  $\mu\text{g/ml}$  of higher molar mass polymers from *O. polyacantha* were comparable to those induced by LPS in both murine and human cells [54].

It has been established that the IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-6 cytokines are related to each other because they are released in a coordinated manner from activated macrophages. IL-1 or TNF- $\alpha$  can induce IL-6, and TNF- $\alpha$  can induce IL-1 $\beta$ . IL-6 does not induce IL-1 $\beta$  or TNF- $\alpha$  but suppresses their production by the macrophages [52,55]. TNF- $\alpha$  plays an important role in inflammation and with IL-1 $\beta$ -promoted inhibition of tumor cell division. It is also involved in the tumoricidal effects by antibody-dependent cellular cytotoxicity and macrophage-mediated tumor cytotoxicity mechanisms. It can act on monocytes and macrophages in an autocrine manner to enhance various functional responses and induce the expression of other immunoregulatory and inflammatory mediators [56,57]. IL-1 $\beta$  is involved in fever during the induction of the acute phase protein response. In addition, it synergizes with IFN- $\gamma$  and IL-12 to increase tumor death by NK cells. [56,57]. Macrophages and monocytes are the main sources of IL-6, which is considered a major immune and inflammatory mediator [50–52,56]. Considering the interleukin effects, our results suggest different applications for xyloglucans. XGC promoted a clear increase in TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ; therefore, it could be used to trigger macrophages to activate tumoricidal activity. XG also induced significant secretion of IL-1, which can be considered a potentializer of tumor death, whereas XGT stimulated principally the production of IL-6. This polymer should be investigated for its potential to activate macrophages as an inflammatory response.

In the present work a probable relation of NO dependant cytokine release was observed. The signaling pathway of Toll-like receptors (e.g., TLR-4, which is able to recognize botanical polysaccharides) [15,58] leads to the activation of signaling pathway of nuclear factor- $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ) through the activation of MyD88. This, in turn, induces the transcriptional activation of genes of immune and inflammatory responses, among which the gene coding for iNOS. Thus, the activation of the NF- $\kappa\text{B}$  increases NO production by increasing the expression of iNOS [58–60]. The high levels of NO observed in macrophages in the presence of xyloglucans [11] suggest that these polysaccharides could interact with Toll-like receptors. As MyD88 also leads to activation of MEKK1, this triggers molecular responses which result in the production of many inflammatory mediators such as TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 and iNOS [61]. IL-1 $\beta$  induces the production of iNOS leading to release of NO [62]. TNF- $\alpha$  binds to its receptor and can activate signaling through NF- $\kappa\text{B}$  and Janus kinase inducing expression of iNOS [63].

In the present work, the IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  production by XGC treatment could contribute to explain the high increase in the NO production in macrophage in the presence of the same polysaccharide [11].

Many authors have described the effects of plant polysaccharides as biological response modifiers, especially on macrophage activation [15,30–34,41–49], but there are few reports concerning xyloglucans [11,18,19].

Although the three polysaccharides used in this study have the classical structure of storage xyloglucans, the combination and proportion of different oligosaccharides give a fine structure that varies according to the species and even in the populations of the same species [7–10]. The storage xyloglucans obtained from *C. langsdorfii* and *T. indica* seeds are composed of repeating units of XXXG with a variation in the substitution with galactose, generating oligosaccharides structures like XLXG, XXLG and XLLG [7,9]. In addition to these characterized xyloglucans subunits, the *H. courbaril* polymer showed, upon enzymatic digestion, distinct oligosaccharides that

were composed of XXXXG and XXXXXG [8,10]. These fragments could be substituted with galactose units in different proportions [8,10]. The differences in the fine structure of the xyloglucans can generate distinct macromolecular behavior and conformations. Because macrophage activation by polysaccharides is thought to be mediated primarily through the recognition of polymers by specific receptors, differences in the conformational features could explain the distinct immunomodulatory responses obtained with storage xyloglucans from different species.

In conclusion, interest in the antitumor and immunostimulatory activity of natural polysaccharides is growing. A large number of studies have shown that macrophage activation by polysaccharides has a relatively strong effect on tumor cells because they can inhibit the growth and metastasis of tumor cells. The present work shows that storage xyloglucans promote macrophage activation, evidenced by the secretion of important mediators. The results support the continued evaluation of the effects of these molecules on tumor cells and other cell types.

#### Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

#### Acknowledgements

This investigation was supported by the Brazilian research funding agencies CNPq and CAPES and Fundação Araucária.

#### References

- [1] N. Carpita, M. McCann, The cell wall, in: B.B. Buchanan, W. Gruissem, R.L. Jones (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, 2000, pp. 52–108.
- [2] M.A. O'Neill, W.S. York, The composition and structure of plant primary cell walls, in: *The Plant Cell Wall. Annual Plant Review* (8 Eds.), J.K. Rose CRC Press, Blackwell Publishing Ltd., Oxford, 2003, pp. 1–54.
- [3] C.L.O. Petkowicz, C.G. Vargas-Rechia, A.P. Busato, F. Reicher, Xiloglucanas: estrutura, propriedades e aplicações, in: F.M. Lajolo, E.W. Menezes (Eds.), *Carboidratos em alimentos regionais Iberoamericanos*, USP São Paulo, 2006, pp. 125–147.
- [4] T. Hayashi, Xyloglucans in the primary cell wall, *Annu. Rev. Plant Biol.* 40 (1989) 139–168.
- [5] S.C. Fry, The structure and functions of xyloglucan, *J. Exp. Bot.* 40 (1989) 1–11.
- [6] S.C. Fry, W.S. York, P. Albersheim, A. Darvill, T. Hayashi, J.P. Joseleau, Y. Kato, E.P. Lorences, G.A. MacLachlan, M. Mcneil, A. Mort, J.S.G. Reid, H.U. Seitz, R.R. Selvendran, A.G.J. Voragen, A.R. White, An unambiguous nomenclature for xyloglucan-derived oligosaccharides, *Physiol. Plant* 89 (1993) 1–3.
- [7] M.S. Buckneridge, C.R. Dalva, J.S. Grant-Reid, S.M.C. Dietrich, Xyloglucan structure and post-germinative metabolism in seeds of *Copaifera langsdorffii* from savanna and forest populations, *Physiol. Plant* 86 (1992) 145–151.
- [8] M.S. Buckneridge, H.J. Crombie, C.J.M. Mendes, J.S.G. Reid, M.J. Gidley, C.C.J. Vieira, A new family of oligosaccharides from the xyloglucan of *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae) cotyledons, *Carbohydr. Res.* 303 (1997) 233–237.
- [9] M. Marry, D.M. Cavalier, J.K. Schnurr, J. Netland, Z. Yang, V. Pezeshk, W.S. York, M. Pauly, A.R. White, Structural characterization of chemically and enzymatically derived standard oligosaccharides isolated from partially purified tamarind xyloglucans, *Carbohydr. Polym.* 51 (2003) 347–356.
- [10] M.A.S. Tiné, C.O. Silva, D.U. Lima, N.C. Carpita, M.S. Buckneridge, Fine structure of a mixed-oligomer storage xyloglucan from seeds of *Hymenaea courbaril*, *Carbohydr. Polym.* 66 (2006) 444–454.
- [11] M.M.T. Rosário, G.R. Noleto, J.F. Bento, F. Reicher, M.B.M. Oliveira, C.L.O. Petkowicz, Effect of storage xyloglucans on peritoneal macrophages, *Phytochemistry* 69 (2008) 464–472.
- [12] A.K. Abbas, A.H. Lichtman, Citocinas and Imunidade Inata in. *Imunologia Celular e Molecular* (5 Eds.), Elsevier, Rio de Janeiro, RJ, 2005, pp. 251–376.
- [13] B. Halliwell, Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide? *Trends Biochem. Sci.* 31 (9) (2006) 509–515.
- [14] B. Beutler, Innate immunity: an overview, *Mol. Immunol.* 40 (2004) 845–859.
- [15] I.A. Schepetkin, M.T. Quinn, Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential, *Int. Immunopharmacol.* 6 (2006) 317–333.
- [16] J.S. Lee, J.Y. Cho, E.K. Hong, Study on macrophage activation and structural characteristics of purified polysaccharides from the liquid culture broth of *Herictum erinaceus*, *Carbohydr. Polym.* 78 (2009) 162–168.
- [17] J.D. MacMicking, Recognizing macrophage activation and host defense, *Cell Host Microbe* 5 (2009) 405–407.
- [18] T.T. Sreelekha, T. Vijayakumar, R. Ankathil, K.K. Vijayan, M. Krishnan Nair, Immunomodulatory effects of a polysaccharides from *Tamarindus indica*, *Anti-Cancer* 44 (1993) 209–212.
- [19] M. Pauly, O. Freis, G. Pauly, Galactomannan and xyloglucan: Bio-active polysaccharides, 114, *Altured's Cosmetics & Toiletries*, 1999, 65–78.
- [20] M. Dubois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, F. Smith, Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.* 28 (1956) 350–356.
- [21] E.F. Hartree, Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response, *Anal. Biochem.* 48 (1972) 422–427.
- [22] M.L. Wolfrom, A. Thompson, Reduction with sodium borohydride, *Methods Carbohydr. Chem.* 2 (1963) 65–68.
- [23] M.L. Wolfrom, A. Thompson, Acetylation, *Methods Carbohydr. Chem.* 2 (1963) 211–215.
- [24] J.H. Sloneker, Gas-liquid chromatography of alditol acetates, *Methods Carbohydr. Chem.* 6 (1972) 20–24.
- [25] T.P. Reilly, F.H. Bellevue, P.M. Worster, C.K. Svensson, Comparison of the *In vitro* cytotoxicity of hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone, *Biochem. Pharmacol.* 55 (1998) 803–808.
- [26] M.P. Moretão, D.F. Buchi, P.A.J. Gorin, M. Iacomini, M.B.M. Oliveira, Effect of an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco) on peritoneal macrophage functions, *Immunol. Lett.* 89 (2003) 175–185.
- [27] M. Sasada, M.J. Pabst, R.B. Johnston Jr., Activation of peritoneal macrophages by lipopolysaccharides alters the kinetic parameters of the superoxide-producing NADPH oxidase, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 9631–9635.
- [28] R.B. Johnston Jr., C.A. Godzik, Z.A. Cohn, Increased superoxide anion production by immunologically activated and chemically elicited macrophages, *J. Exp. Med.* 48 (1978) 115–127.
- [29] L.C. Green, D.A. Wagner, J. Glogowski, P.L. Skipper, J.S. Wishnok, S.R. Tannenbaum, Analysis of nitrate, nitrite and [<sup>15</sup>N nitrates] in biological fluids, *Anal. Biochem.* 126 (1982) 131–138.
- [30] A.H. Klimp, E.G.E. Vries, G.L. Scherphof, T. Daemen, A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer, *Oncol. Hematol.* 44 (2002) 143–161.
- [31] M.Y.K. Leung, C. Liub, J.C.M. Koon, K.P. Fung, Polysaccharide biological response modifiers, *Immunol. Lett.* 105 (2006) 101–114.
- [32] A.O. Tzianabos, Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function, *Clin. Microbiol.* 13 (2000) 523–533.
- [33] W. Chen, W. Zhang, W. Shen, K. Wang, Effects of the acid polysaccharide fraction isolated from a cultivated *Cordyceps sinensis* on macrophages *in vitro*, *Cell. Immunol.* 262 (2010) 69–74.
- [34] J. Wang, G. Zuo, J. Li, T. Guan, C. Li, R. Jiang, B. Xie, X. Lin, F. Li, Y. Wang, D. Chen, Induction of tumoricidal activity in mouse peritoneal macrophages by ginseng polysaccharide, *Int. J. Biol. Macromol.* 46 (2010) 389–395.
- [35] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, Free radicals reactive species and toxicology, in: B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge (3 Eds.), *Free Radicals in Biology Medicine*, Oxford University Press, 2003, pp. 544–616.
- [36] D.M. Mosser, The many faces of macrophage activation, *J. Leuk. Biol.* 73 (2003) 209–212.
- [37] M.T. Quinn, I.A. Schepetkin, Role of NADPH oxidase in formation and function of multinucleated giant cells, *J. Innate Immun.* 1 (2009) 509–526.
- [38] H.P. Ramesh, K. Yamaki, T. TSUHIDA, Effect of fengugreek *Trigonella foenum-graecum* L. galactomannan fractions on phagocytosis in rat macrophages and on proliferation and Igm secretion in HB4C5 cells, *Carbohydr. Polym.* 50 (2002) 79–83.
- [39] M. Monobe, K. Ema, F. Kato, M. Maeda-Yamamoto, Immunostimulating activity of a crude polysaccharide derived from green tea (*Camellia sinensis*) extract, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 1423–1427.
- [40] M. Ushio-Fukai, Compartmentalization of redox signaling through NADPH oxidase-derived ROS, *Antioxid. Redox Signal.* 11 (2009) 1289–1299.
- [41] C.G. Mellinger, E.R. Carbonero, G.R. Noleto, T.R. Cipriani, M.B.M. Oliveira, P.A.J. Gorin, M. Iacomini, Chemical and biological properties of an arabinogalactan from *Phyllanthus niruri*, *J. Nat. Prod.* 68 (2005) 1479–1483.
- [42] C.G. Mellinger, T.R. Cipriani, G.R. Noleto, E.R. Carbonero, M.B.M. Oliveira, P.A.J. Gorin, M. Iacomini, Chemical and immunological modifications of an arabinogalactan present in tea preparations of *Phyllanthus niruri* after treatment with gastric fluid, *Int. J. Biol. Macromol.* 43 (2008) 115–120.
- [43] G. Xie, I.A. Schepetkin, D.W. Siemsen, L.N. Kirpotina, J.A. Wiley, M.T. Quinn, Fractionation and characterization of biologically-active polysaccharides from *Artemisia tripartita*, *Phytochemistry* 69 (2008) 1359–1371.
- [44] G. Xie, I.A. Schepetkin, M.T. Quinn, Immunomodulatory activity of acidic polysaccharides isolated from *Tanacetum vulgare* L., *Int. Immunopharmacol.* 13 (2007) 1639–1650.
- [45] G.R. Noleto, A.L.R. Mercê, M. Iacomini, P.A.J. Gorin, V.T. Soccol, M.B.M. Oliveira, Effects of a lichen galactomannan and its vanadyl (IV) complex on peritoneal macrophages and leishmanicidal activity, *Mol. Cel. Biochem.* 233 (2002) 73–83.
- [46] X. Yang, Y. Zhao, Y. Yang, Y. Ruan, Isolation and characterization of immunostimulatory polysaccharide from an herb tea, *Gynostemma pentaphyllum* Makino, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 6905–6909.
- [47] I.A. Schepetkin, C.L. Faulkner, L.K. Nelson-Overton, J.A. Wiley, M.T. Quinn, Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Juniperus scopolorum*, *Int. Immunopharmacol.* 5 (2005) 1783–1799.
- [48] X. Yang, Y. Zhao, H. Wang, Q. Mei, Macrophage activation by an acidic polysaccharide isolated from *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels, *J. Biochem. Mol. Biol.* 40 (2007) 636–643.

GModel

CBI-6373; No. of Pages 7

## ARTICLE IN PRESS

M.M.T. do Rosário et al. / *Chemico-Biological Interactions xxx (2010) xxx–xxx*

7

- [49] R.M. Minter, F.J. Wessels, L.L. Moldawer, Cytokine, in: W.W. Souba, D.W. Wilmore (Eds.), *Surgical Research*, Academic Press, San Diego, CA, 2001, pp. 933–947.
- [50] S.P. Commins, L. Borish, J.W. Steinke, Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines, *J. Allergy Clin. Immunol.* 72 (2010) 53–72.
- [51] I. Berczi, A. Szentivanyi, Cytokines and chemokines, in: I. Berczi, A. Szentivanyi (Eds.), *NeuroImmune Biology, Vol. 3: The Immune-Neuroendocrine Circuitry: History and Progress*, Elsevier Science B.V., 2003, pp. 191–220.
- [52] J.Y. Song, S.K. Han, E.H. Son, S.N. Pyo, Y.S. Yun, S.Y. Yi, Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages by ginsan, *Int. Immunopharmacol.* 2 (2002) 857–865.
- [53] M.P. Moretão, A.R. Zampronio, P.A.J. Gorin, M. Iacomini, M.B.M. Oliveira, Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages activated by an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco), *Immunol. Lett.* 93 (2004) 189–197.
- [54] I.A. Schepetkina, G. Xie, L.N. Kirpotina, R.A. Klein, M.A. Jutila, M.T. Quinn, Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Opuntia polyacantha*, *Int. Immunopharmacol.* 10 (2008) 1455–1466.
- [55] R. Schindler, J. Mancilla, S. Endres, R. Ghorbani, S.C. Clark, C.A. Dinarello, Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF, *Blood* 75 (1990) 40–47.
- [56] J.A. Ross, M.J. Auer, The biology of the macrophages, in: B. Burke, C.E. Lewis (Eds.), *The Macrophages*, Oxford University Press, 2002, pp. 1–57.
- [57] T.A. Hamilton, Molecular basis of macrophages activation: from gene expression to phenotypic diversity, in: B. Burke, C.E. Lewis (Eds.), *The Macrophages*, Oxford University Press, 2002, pp. 73–97.
- [58] M.G. Netea, G.D. Brown, B.J. Kullberg, N.A.R. Gow, An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system, *Nat. Rev. Microbiol.* 6 (2008) 67–78.
- [59] R. Medzhitov, C. Janeway, Innate immunity, *N. Engl. J. Med.* 343 (2000) 338–344.
- [60] E. Gonzalez-Rey, A. Chorny, M. Delgado, Regulation of immune tolerance by anti-inflammatory neuropeptides, *Nat. Rev. Immunol.* 7 (2007) 53–63.
- [61] Y. Liu, E.G. Sheperd, L.D. Nelin, MAPK phosphatases—regulating the immune response, *Nat. Rev. Immunol.* 7 (2007) 202–212.
- [62] C. Gabay, C. Lamacchia, G. Palmer, IL-1 pathways in inflammation and human diseases, *Nat. Rev. Rheumatol.* 6 (2010) 232–241.
- [63] J.G. Tidball, A. Villalta, NO may prompt calcium leakage in dystrophic muscle, *Nat. Med.* 15 (2009) 243–244.

## ANEXO



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



Nº 329

## 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: 23075.039393/2008-39

APROVADO:

09/09/2008 – R.O. 08/2008

TÍTULO:

Xiloglucana: relação entre estrutura e atividade biológica

AUTORES: Carmen Lúcia de Oliveira Petkowicz, Guilhermina Rodrigues Noletto,  
Marianna Maia Taulois do Rosário

Bioquímica

DEPARTAMENTO:

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