

PATRÍCIA MARIA STUELP CAMPELO



**EFEITOS BIOLÓGICOS *IN VIVO* E *IN VITRO* DE
POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS DE LIQUENS SOBRE
MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências - Bioquímica.

Orientadores: Prof. Dr. Marcello Iacomini
Prof.^a Dr.^a Maria Benigna
Martinelli de Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. Philip A. J. Gorin

CURITIBA

2002

PATRÍCIA MARIA STUELP CAMPELO

**EFEITOS BIOLÓGICOS *IN VIVO* E *IN VITRO* DE
POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS DE LIQUENS SOBRE
MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Paraná, como
requisito parcial à obtenção do título de Doutor
em Ciências - Bioquímica.

Orientadores: Prof. Dr. Marcello Iacomini
Prof.^a Dr.^a Maria Benigna
Martinelli de Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. Philip A. J. Gorin

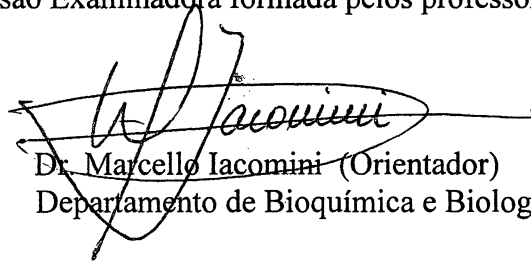
CURITIBA

2002

PATRICIA MARIA STUELP CAMPELO

**EFEITOS BIOLÓGICOS *IN VIVO* E *IN VITRO* DE POLISSACARÍDEOS
EXTRAÍDOS DE LÍQUENS SOBRE MACRÓFAGOS PERITONEAIS
DE CAMUNDONGOS**

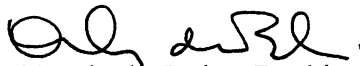
Tese aprovada como requisito final para a obtenção do título de Doutor em Ciências no Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão Examinadora formada pelos professores:



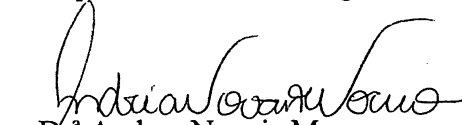
Dr. Marcello Iacomini (Orientador)
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Dr^a Eva Gunilla Skare Carnieri
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Dr^a Dorly de Freitas Buchi
Departamento de Biologia Celular – UFPR



Dr^a Andrea Novais Moreno
Pontificia Universidade Católica do PR



Dr. Pio Colepicolo Neto
Departamento de Bioquímica - USP

Curitiba, 28 de Novembro de 2002

Ao meu grande amor Douglas
Aos meus pais, Bruno e Eloina

Em especial, à minha maior realização, MARIANA

AGRADECIMENTOS

À Deus, fonte de toda inspiração e vontade.

Ao Douglas, pela paciência e colaboração, amor, respeito, amizade e incentivo e por ser meu equilíbrio e me proporcionar muitos momentos felizes.

Aos meus pais, Bruno e Eloina, e meus irmãos, Vânia, Vanêssa e Bruno pelo seu amor, dedicação, respeito e presença constantes.

Ao professor Dr. Marcello Iacomini, pela palavra sempre amiga e confiante, pela dedicação, apoio e sobretudo por ter acreditado em mim.

À professora Dr^a Maria Benigna Martinelli de Oliveira, pelo exemplo de profissional e pela confiança, estímulo, sugestões e agradáveis conversas.

Ao professor Dr. Philip A. J. Gorin, pelo apoio e amizade sempre presentes.

Ao professor Dr. Sílvio Sanches Veiga, pela cessão das proteínas para experimento de adesão celular.

Ao professor Dr. Aguinaldo José do Nascimento pelo auxílio nas análises estatística.

À Juliana Curi Martinichen, pela cessão do polissacarídeo sulfatado de *Cladonia ibitipocae*.

Às minhas amigas para a eternidade Sandra, Sílvia, Selene, Fabiane, Cíntia e Lauren porque amigo é aquele que é, apesar de tudo ou apesar de nada.

À Cynthia e ao Geraldo, pela amizade, carinho e apoio constantes.

À Leda e ao Emanuel, pelas palavras amigas, carinho e ajuda e por serem grandes pessoas.

Às minhas queridas amigas Elaine R. Carbonero, Ana Paula R. Abud e Ana Helena Gracher, pelos incansáveis momentos experimentais.

Às minhas queridas Rafaela e Giovana que, ao que parece, foram despertadas para a pesquisa.

À Guilhermina Noleto e Fabíola Stevan, pela troca de experiências e

protocolos e pela amizade.

Aos amigos e colaboradores Renato e Aurora (TECPAR) pela inestimável ajuda e pelos momentos de agradáveis conversas e descobertas.

Ao Guilherme e César, pela companhia, ajuda e agradáveis conversas.

À Dr^a Ana Maria Carneiro Leão, pela introdução aos macrófagos e pelo carinho e amizade.

Aos colegas de departamento e laboratório Carolina Mellinger, Roseane G. M. Zibetti, Paula C. S. Faria, Andréia S. Ribeiro, Mariana Piemont, Clarice Osaku, Lucimara Cordeiro, Rodrigo Vassoler, Rodrigo Reis, Fábio Rosado, pelos agradáveis momentos de convivência.

À Priscila Ienzen dos Santos, técnica do Laboratório de Oxidações Biológicas e Cultivo Celular, pelo carinho e pelo suporte técnico.

À coordenação do curso de Pós-graduação em Bioquímica.

À Sra. Marilza e Srta. Nanci, pelo auxílio sempre prestado.

Às bibliotecárias Telma, Izabella, Ruth e Mariza, pela colaboração e atenção.

Ao PRONEX/Carboidratos e CNPq pelo suporte financeiro.

À todos aqueles, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada.

“Se você acha que pode, ou acha que não pode, de qualquer forma você tem toda razão.”

Henry Ford

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XIII
RESUMO	XV
ABSTRACT	XVI
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 LIQUENS (FUNGOS LIQUENIZADOS)	2
1.1.1 Aspectos Gerais	2
1.1.2 Principais Compostos Produzidos por Liquens	3
1.1.2.1 Aspectos estruturais dos polissacarídeos liquênicos	5
1.2 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE POLISSACARÍDEOS	10
1.2.1 Ativação do Sistema Imune por Polissacarídeos	12
1.3 MACRÓFAGOS	17
1.4 “BURST” RESPIRATÓRIO	19
1.5 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO [•])	22
1.6 ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS POR POLISSACARÍDEOS	25
1.7 INTERFERÊNCIA NA INTERAÇÃO CÉLULAS-MATRIZ EXTRACELULAR OCACIONADA POR POLISSACARÍDEOS	28
1.8 JUSTIFICATIVA DOS OBJETIVOS	30
2 OBJETIVOS	33
3 MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 MATERIAIS E REAGENTES	36
3.2 MÉTODOS	36

3.2.1	Material de Vidro e Acessórios: Procedimentos de Esterilização.....	36
3.2.2	Soluções Tampão e Meio de Cultura	37
3.2.2.1	Solução salina tamponada (PBS) sem cálcio e magnésio	37
3.2.2.2	Solução balanceada de Hank (HBSS)	37
3.2.2.3	Meio de cultura	37
3.2.2.4	Solução de tripsina-EDTA	38
3.2.2.5	Soluções de polissacarídeos	38
3.3	MÉTODOS GERAIS	39
3.3.1	Preparo da Solução de Fehling	39
3.3.2	Dosagem de Proteínas	39
3.3.3	Dosagem de Carboidratos	40
3.4	α -GLUCANA DO LÍQUEN <i>Ramalina celastri</i>	40
3.4.1	Coleta do Líquen	40
3.4.2	Extração e Purificação dos Polissacarídeos	41
3.5	Galactomanana do Líquen <i>Cladonia ibitipocae</i>	43
3.6	ANIMAIS	43
3.7	CÉLULAS	43
3.7.1	Sarcoma 180 (S-180): manutenção da linhagem	43
3.7.2	Células HeLa	44
3.7.3	Macrófagos	44
3.8	TESTES DE ATIVIDADE BIOLÓGICA	45
3.8.1	Atividade Antitumoral de Polissacarídeos contra o S-180	45
3.8.2	Efeito dos Polissacarídeos sobre Macrófagos	48
3.8.2.1	Produção de peróxido de hidrogênio	48

3.8.2.2	Atividade fagocítica	51
3.8.2.3	Produção de óxido nítrico	51
3.8.2.4	Determinação da viabilidade celular	52
3.8.3	Adesão de Células HeLa às Moléculas da Matriz Extracelular	52
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	53
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1	ATIVIDADE ANTITUMORAL.....	55
4.2	EFEITOS <i>IN VITRO</i> DE POLISSACARÍDEOS DE LIQUENS EM MACRÓFAGOS EXTRAÍDOS DA CAVIDADE PERITONEAL DE CAMUNDONGOS	62
4.3	EFEITOS <i>IN VIVO</i> DA α -GLUCANA DE <i>R. celastri</i> EM MACRÓFAGOS EXTRAÍDOS DA CAVIDADE PERITONEAL DE CAMUNDONGOS	68
4.3.1	Atividade Elicitora de Células da Cavidade Peritoneal (PEC)	68
4.3.2	Atividade Fagocítica	71
4.3.3	Produção de H ₂ O ₂	74
4.3.4	Produção de NO [•]	80
5	CONCLUSÃO	86
6	REFERÊNCIAS	88
7	ANEXO	103

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 –	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA FAGOCITOSE DE UM MICROORGANISMO	21
FIGURA 2 -	SÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO (NO*) PELO ENDOTÉLIO VASCULAR E POR MACRÓFAGOS	24
FIGURA 3 –	ESTRUTURA PREDOMINANTE DA α -GLUCANA DE <i>Ramalina celastri</i> – $[\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{4)}]_n$ (3:1)	31
FIGURA 4 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA GALACTOGLUCOMANANA EXTRAÍDA DE <i>Cladonia ibitipocae</i> COM SUAS PROVÁVEIS RAMIFICAÇÕES	32
FIGURA 5 -	FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO E OBTENÇÃO DA $\alpha\text{-D-Glucana (1}\rightarrow\text{3),(1}\rightarrow\text{4) (1:3)}$ DE <i>Ramalina celastri</i>	42
FIGURA 6 -	MANUTENÇÃO DA LINHAGEM TUMORAL E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE POLISSACARÍDEOS UTILIZANDO COMO MODELO O SARCOMA-180	47
FIGURA 7 –	ESQUEMA EXPERIMENTAL DA INFLUÊNCIA <i>IN VIVO</i> (A) E <i>IN VITRO</i> (B) DO POLISSACARÍDEO NA PRODUÇÃO DE H ₂ O ₂ POR MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGOS	50
FIGURA 8 –	PERFIL DO CRESCIMENTO DO S-180 EM ANIMAIS TRATADOS COM α -GLUCANA DE <i>R. celastri</i>	56
FIGURA 9 –	EFEITO DA α -GLUCANA DE <i>R. celastri</i> E DA GALACTOMANANA DE <i>C. ibitipocae</i> SULFATADA QUIMICAMENTE (GMS) NA ADESÃO DE CÉLULAS HeLa SOBRE AS PROTEÍNAS DE MATRIZ EXTRACELULAR FIBRONECTINA (A) E LAMININA (B)	59
FIGURA 10 –	EFEITO DO TRATAMENTO <i>IN VITRO</i> COM POLISSACARÍDEOS SOBRE A VIABILIDADE DE MACRÓFAGOS	63
FIGURA 11–	EFEITO <i>IN VITRO</i> DA α -GLUCANA DE <i>R. celastri</i> SOBRE A PRODUÇÃO DE H ₂ O ₂ POR MACRÓFAGOS	65

FIGURA 12 - EFEITO <i>IN VITRO</i> DA GALACTOMANANA SULFATADA DE <i>C. ibitipocae</i> SOBRE A PRODUÇÃO DE H ₂ O ₂ POR MACRÓFAGOS	66
FIGURA 13 - ATIVIDADE ELICITORA DE CÉLULAS PARA A CAVIDADE PERITONEAL REALIZADA PELA α -GLUCANA ADMINISTRADA INTRAPERITONEALMENTE EM CAMUNDONGOS	69
FIGURA 14.- EFEITO DO TRATAMENTO DE CAMUNDONGOS COM α -GLUCANA NA FAGOCITOSE DE PARTÍCULAS DE LÁTEX FLUORESCENTES POR MACRÓFAGOS ISOLADOS DA CAVIDADE PERITONEAL	72
FIGURA 15 - CURVA DE TEMPO DE PRODUÇÃO DE H ₂ O ₂ POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS INOCULADOS COM α -GLUCANA DE <i>R. celastri</i>	75
FIGURA 16. PRODUÇÃO DO NO [•] POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM α -GLUCANA DE <i>R. celastri</i>	82

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	COMPOSIÇÃO QUÍMICA E CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAS DOS PRINCIPAIS POLISSACARÍDEOS DE LÍQUENS – CLASSIFICAÇÃO EM FAMÍLIAS	09
TABELA 2 –	ALGUNS ESTIMULANTES NÃO-ESPECÍFICOS DAS DEFESAS IMUNE DO INDIVÍDUO	14
TABELA 3 –	ATIVIDADE ANTITUMORAL DE α -GLUCANA DE <i>R. celsstri</i> CONTRA S-180	56
TABELA 4 –	EFEITO DA α -GLUCANA DE <i>R. celsstri</i> E DA GALACTOMANANA SULFATADA (GMS) DE <i>C. ibitipocae</i> NA ADESÃO DE CÉLULAS HeLa SOBRE AS PROTEÍNAS DE MATRIZ EXTRACELULAR LAMININA E FIBRONECTINA	60
TABELA 5 –	ATIVIDADE FAGOCÍTICA DE MACRÓFAGOS OBTIDOS DA CAVIDADE PERITONEAL DE CAMUNDONGOS	72
TABELA 6 –	PRODUÇÃO DE H ₂ O ₂ POR MACRÓFAGOS ISOLADOS DA CAVIDADE PERITONEAL DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM α -GLUCANA DE <i>R. celsstri</i> APÓS 7 (A), 15 (B) OU 30 (C) DIAS DE INOCULAÇÃO.	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

δ (delta)	Deslocamento químico
5-FU	5-Fluorouracil
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BRM	Modificadores da resposta biológica
BSA	Soro albumina bovina
CTL	Linfócitos T Citotóxicos
DMSO	Dimetilsulfóxido
DS	Grau de substituição por grupos sulfato
Gal	Galactose
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
Glc	Glucose
GM	Galactoglucomanana de <i>Cladonia ibitipocae</i>
GMS	Galactoglucomanana de <i>Cladonia ibitipocae</i> sulfatada quimicamente
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HBSS	Solução salina tamponada de Hank
i.p.	Intraperitoneal
IFN- γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
LPS	Lipopolissacarídeo
M.C.	Meio de Crescimento
Man	Manose

MEM	Meio essencial mínimo de Eagle
MTT	(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide); azul de tetrazólio
NK	Células “Natural Killer”
NO•	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
O ₂ ^{•-}	Ânion Superóxido
PBS	Solução salina tamponada
PEC	Células da cavidade peritoneal
PKC	Proteína Quinase C
PMA	Forbol 12-miristato, 13-acetato
ppm	Partes por milhão
RMN- ¹³ C	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN- ¹ H	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton
S-180	Sarcoma-180
SFB	Soro fetal bovino
SOD	Superóxido dismutase
SRE	Sistema retículo endotelial
TNF-α	Fator de necrose tumoral-alfa
VTM	Volume Tumoral Médio

RESUMO

Neste trabalho, a α -(1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4)-D-glucana solúvel em água foi obtida por extração alcalina de talos do líquen *Ramalina celastri* foi inoculada na cavidade peritoneal de camundongos para verificar seu efeito *in vivo* sobre a estimulação de macrófagos. Foram avaliadas a produção de peróxido de hidrogênio, a atividade fagocítica, a atividade elicitora de células para a cavidade peritoneal e a produção de óxido nítrico. Os efeitos foram determinados após 7, 15 e 30 dias da inoculação do polissacarídeo intraperitonealmente em camundongos. O número de células da cavidade peritoneal e a produção de H₂O₂ aumentaram aproximadamente 130 e 75%, respectivamente, 7 dias após a inoculação, decrescendo gradualmente. A produção de H₂O₂ foi avaliada utilizando o estímulo *in vitro* de forbol miristato acetato (PMA). Sem este agente indutor a diferença de produção não foi significativa quando comparada com o controle. Ensaio de atividade fagocítica usando partículas de látex fluorescente mostraram que a captação destas aumentou 7 dias após a inoculação do polissacarídeo e em 15 dias ainda estava elevada quando comparada com o controle. Os resultados obtidos para a produção de óxido nítrico foram semelhantes aos já descritos, ou seja, em 7 dias a produção desta espécie reativa de nitrogênio estava aumentada em cerca de 70%, retornando aos valores similares ao controle gradativamente. Estes resultados sugerem que esta α -glucana de *Ramalina celastri* possa funcionar como um modificador da resposta biológica. Com base nestes resultados foi testado uma alteração no protocolo experimental utilizado para os testes de atividade antitumoral, inoculando o polissacarídeo 3 vezes no animal, em intervalos de 7 dias. Nestas condições, o crescimento do Sarcoma-180 foi inibido em aproximadamente 60%. Este resultado pode sugerir que a α -glucana possa ser um tolerógeno, induzindo uma imunotolerância no animal.

A estimulação de macrófagos *in vitro* também foi avaliada utilizando a α -glucana de *R. celastri* e uma galactomanana sulfatada extraída de *Cladonia ibitipocae* (GMS). Ao contrário dos resultados *in vivo*, a α -glucana inibiu a produção de H₂O₂ em cerca de 65% numa dose de 1000 μ g/ml. Porém, a GMS estimulou a produção deste metabólito em 100%, em uma concentração de 100 μ g/ml, apresentando uma diminuição da viabilidade de macrófagos em cerca de 15% numa concentração de 500 μ g/ml. Este polímero ainda diminuiu a adesão de células HeLa às moléculas da matriz extracelular laminina e fibronectina.

ABSTRACT

An α -(1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4)-D-glucan was extracted from the lichen *Ramalina celastri* with aqueous alkali. It was water soluble and at a dose of 200 mg.kg⁻¹ decreased the Sarcoma-180 tumor size by ~80%, and the presence of plasmolymphocytary infiltration surrounding the tumor suggested macrophage stimulus. The polysaccharide was used to evaluate its effects on peritoneal exudate cells, namely, hydrogen peroxide production, phagocytic activity, NO[•] production and cell-eliciting activity. The polysaccharide was injected into mice and after 7, 15 and 30 days the cells were collected from the peritonea. The number of peritoneal cells increased by ~130% 7 days after inoculation, and then decreased gradually. On *in vitro* phorbol myristate acetate (PMA) triggering, hydrogen peroxide production increased 75% at 7 and 15 days after inoculation. Without PMA, the difference of production was not significant. Phagocytic assays using fluorescent beads showed that the uptake increased 7 and 15 days after inoculation, when compared to the control. NO[•] production increased by ~70%, gradually returning to the normal levels. These results suggest a possible role of the *Ramalina celastri* glucan as a biological response modifier. Another protocol of antitumor activity was tested, injecting the polysaccharide 1, 7 and 15 days after tumor implantation, which decreased tumor growth by ~60%. These results indicate that the glucan can be a tolerogen with compared with the original protocol, using a single dose.

Studies on *in vitro* macrophage stimulation were carried out using the α -glucan and a chemically sulfated *Cladonia ibitipocae* galactomannan (GMS). In contrast with the *in vivo* results, the glucan inhibited H₂O₂ production by ~65% using a dose of 1000 μ g/ml. However, GMS increased it by 100%, at a lower dose of 100 μ g/ml. This polymer showed a decrease of viability of macrophages by ~15% at a dose of 500 μ g/ml in the MTT assay and decreased HeLa cell adhesion on to the extracellular matrix proteins, fibronectin and laminin.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 LIQUENS (FUNGOS LIQUENIZADOS)

1.1.1 Aspectos Gerais

Os primeiros relatos sobre líquens remontam de 1729, quando o biólogo italiano Micheli utilizou pela primeira vez o termo LIQUEN (do grego: *lichen*), como planta rasteira ou lambe-chão (XAVIER-FILHO e RIZZINI, 1976). A verdadeira composição dos líquens só foi conhecida em 1868, quando o biólogo suíço Simon Schwendener demonstrou tratar-se não de um organismo vegetal, mas sim de uma associação complexa entre alga e fungo, que resulta na formação de um talo líquênico (XAVIER-FILHO e RIZZINI, 1976), não mantendo nenhuma semelhança com os organismos que o constituem (HALE, 1979).

Atualmente os líquens são considerados pequenos ecossistemas constituídos pela associação de um fungo, chamado micobionte, e um ou mais componentes fotossintetizantes, o fico ou fotobionte, que pode ser uma alga verde (clorofícea), uma cianobactéria, ou ambas. O micobionte é constituído mais freqüentemente por uma espécie de ascomiceto ou, mais raramente, por um basídio ou deuteromiceto sendo então denominados de ascolíquens, basidiolíquens ou deuterolíquens (CANAANI *et al.*, 1984; HAWKSWORTH e HILL, 1984; GORIN *et al.*, 1993).

De acordo com a classificação atual dos seres vivos pelo sistema de cinco reinos, os líquens constituem uma classe pertencente ao reino *Fungi*, classe *Lichenes* (LINHARES e GEWANDSZAJDER, 1985). Em relação à ordem, família, gênero e espécie, eles são classificados quanto à análise e descrição de caracteres morfológicos, internos e externos, do talo líquênico que pode ser classificado como arbustivo ou fruticoso, foliáceo ou folhoso, crustáceo ou crustoso. Seu tamanho varia desde poucos

milímetros nas espécies que habitam frestas de troncos e rochas, até metros de comprimento, como é o caso das “barbas de velho” (*Ramalina usnea*) pendurada nos galhos das árvores (MARCELLI, 1995). Vários liquenólogos e micologistas referem-se aos líquens como fungos liquenizados, uma vez que existe a predominância do micobionte na associação simbiótica (BARINAGA, 1995).

Os líquens são de notável capacidade adaptativa devido à sua associação simbiótica (CZECZUGA e CORONA, 1987), podendo habitar regiões inóspitas como rochas, regiões polares e subárticas (DEMBITSKY *et al.*, 1994). A sensibilidade desses seres se relaciona aos poluentes atmosféricos, particularmente ao dióxido de enxofre, podendo, desta forma, serem considerados como indicadores biológicos de poluição (HALE, 1979).

São conhecidas cerca de 13500 espécies liquênicas. Aproximadamente um terço delas foram estudadas com relação aos compostos de baixa massa molecular, tendo sido descritos aproximadamente 200 metabólitos secundários diferentes, muitos dos quais têm se mostrado biologicamente ativos (OLAFSDOTTIR e INGÓLFSOTTIR, 2001). Menos de 100 espécies foram investigadas quanto aos seus constituintes polissacarídicos, que apresentaram 3 principais estruturas típicas: α -glucanas, β -glucanas e galactomananas (GORIN *et al.*, 1988; GORIN *et al.*, 1993), embora a presença de heteroglucanas complexas também tenha sido relatada (IACOMINI *et al.*, 1987; OLAFSDOTTIR *et al.*, 1999).

1.1.2 Principais Compostos Produzidos por Líquens

Entre os principais compostos produzidos por líquens estão os ácidos liquênicos, conhecidos como “substâncias liquênicas”, carotenóides e carboidratos de baixa e de alta massa molecular.

Os ácidos liquênicos são produzidos pelo micobionte, que os depositam sobre a superfície das hifas (RODERIC, 1977). Estes ácidos são constituídos por uma série de compostos alifáticos (diácidos, triácidos ou ácido lactonas), aromáticos

(derivados do ácido pulvínico, derivados da antraquinona, derivados do dibenzofurano, etc) e, principalmente, ácidos fenólicos fracos como a atranorina e os ácidos lecanórico, girofórico e barbático, entre outros (CAVALCANTI *et al.*, 1983; HOLZMANN e LEUCKERT, 1990). Alguns autores consideram a produção dos ácidos liquênicos importante indicador taxonômico, visto que uma mesma espécie de líquen produzirá a mesma substância liquênica, não importando onde foi coletada (HALE, 1979).

Os carotenóides são considerados metabólitos secundários ou pigmentos acessórios de absorção de luz. Diferente dos ácidos liquênicos, os carotenóides sofrem influência significativa de fatores ambientais, tais como o clima e as diferenças de altitudes e latitudes (CZECZUGA e CORONA, 1987; CZECZUGA e XAVIER-FILHO, 1987). Aparentemente, os ácidos liquênicos e os carotenóides são importantes na fisiologia dos talos liquênicos, pois estes componentes podem reduzir a quantidade de luz que atinge a alga e, presumivelmente, filtrar certos comprimentos de ondas (RODERIC, 1977).

Os carboidratos de baixa massa molecular foram estudados por LINDBERG e colaboradores (1953) que pesquisaram a presença dos polióis arabinitol, manitol e volemitol, dos dissacarídeos trealose e sacarose e do glicosídeo de polioli umbilicina (2-*O*- β -D-galactofuranosil-D-arabinitol) em sessenta espécies de líquens. Além destes, outras moléculas pertencentes a este grupo foram isoladas e identificadas, como o 2-*O*- β -D-galactopiranosil-D-arabinitol (LINDBERG *et al.*, 1962), o 3-*O*- β -D-glucopiranosil-D-manitol (LINDBERG *et al.*, 1963) e o 3-*O*- β -D-galactofuranosil-D-manitol (LINDBERG *et al.*, 1964). A presença dos monossacarídeos redutores arabinose, xilose, ramnose, frutose, manose, galactose, glucose, entre outros, foi também descrita (CULBERSON, 1969; NISHIKAWA *et al.*, 1973).

Todas as espécies de líquens estudadas produzem polissacarídeos em quantidades consideráveis (BARRETO-BERGTER *et al.*, 1981; BARON *et al.*, 1991; MICENO *et al.*, 1991), que podem ser obtidos com alto rendimento quando realizado

um extrato aquoso (BARON *et al.*, 1991).

Considerando a importância dos polissacarídeos obtidos de líquens no presente trabalho, uma breve revisão sobre aspectos estruturais e biológicos destes polímeros será apresentada a seguir.

1.1.2.1 Aspectos estruturais dos polissacarídeos liquênicos

Os polissacarídeos isolados de líquens são, na maioria das vezes, α - ou β -glucanas lineares ou com poucas ramificações e, galactomananas. As descrições referentes à presença de outros heteropolissacarídeos são mais raras (IACOMINI *et al.*, 1987; OLAFSDOTTIR *et al.*, 1999).

Os estudos com polissacarídeos de líquens iniciaram em 1815, quando Berzélius publicou o primeiro trabalho no qual isolou um polissacarídeo insolúvel em água fria extraído da espécie *Cetraria islandica*, conhecida como “musgo da Islândia” (BERZELIUS, 1815¹, citado por CHANDA *et al.*, 1957). Posteriormente este polissacarídeo foi identificado como sendo constituído por unidades de glucose, com rotação ótica de +18°, consistente com a configuração β . Por análises de metilação e oxidação com metaperiodato de sódio, determinou-se a estrutura linear deste polímero, que é constituído por ligações do tipo β -(1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4) alternadas, em uma proporção de 3:7. Esta estrutura foi então denominada de liquenina (CHANDA *et al.*, 1957; PEAT *et al.*, 1957), atualmente liquenana (OLAFSDOTTIR e INGÓLFSDOTTIR, 2001). A partir desta primeira determinação outras β -D-glucanas foram descritas. BARON e colaboradores (1988) isolaram por extração alcalina do líquen *Stereocaulon ramulosum*, uma β -D-glucana linear constituída apenas por ligações (1 \rightarrow 3) entre as unidades de glucose, sendo caracterizada como um polímero tipo laminarana. Este também foi encontrado nas espécies *Ramalina usnea* e *celastri* (GORIN e IACOMINI, 1984; STUELP *et al.*, 1999). Uma outra β -D-glucana foi extraída do líquen *Cetraria*

¹ BERZELIUS, J. J. Versuche über die Mischung des Isländischen Mooses und seine Anwendung als Nahrungsmittel. *J. Chem. Phys.*, v.7, p.317-352, 1815.

islandica. Esta apresentava uma cadeia principal de unidades de glucose e de ácido glucurônico ligadas por ligações (1→3) e cadeias laterais constituídas por unidades de glucose ligadas por ligações (1→4) e/ou (1→6) à cadeia principal (HRANISAVLJEVIC-JAKOVLJEVIC *et al.*, 1975).

Outras β -glucanas descritas são as pustulanas, presentes em quase todas as espécies de *Umbilicariaceae* estudadas (NISHIKAWA *et al.*, 1970). Para estes polímeros foram descritas estruturas lineares com ligações do tipo (1→6), podendo estar acetilada em O-3 (IACOMINI *et al.*, 1988; KJÖLBERG e KVERNHEIM, 1989). β -(1→3),(1→6)-D-Glucanas foram encontradas em *Dictyonema glabratum* (antigamente *Cora pavonia*) e *Collema leptosporum* (IACOMINI *et al.*, 1987; PRADO *et al.*, 1999). De forma geral, a rotação óptica das β -glucanas são caracterizadas por valores positivos baixos, exceto para pustulana, para a qual os valores são negativos (GORIN *et al.*, 1988). A estrutura tridimensional de liquenanas foi analisada por cristalografia de raio-X e, como já foi demonstrado para várias β -glucanas de fungos, a conformação em hélice tripla foi sugerida, sendo que a introdução de pequenas cadeias laterais ou ligações (1→4) ou (1→6) na cadeia principal (1→3) parece não interferir com esta conformação (STONE e CLARKE, 1992).

Durante os primeiros trabalhos realizados com a liquenana, outro polissacarídeo de *Cetraria islandica* foi estudado, sendo este, solúvel em água fria. O polímero foi identificado como uma α -D-glucana linear, constituída por uma estrutura repetitiva preponderante - duas ligações (1→3) consecutivas e uma ligação (1→4) - embora seqüências de ligações (1→3) e (1→4) alternadas e ligações (1→4) adjacentes também estivessem presentes em menor proporção. Este polissacarídeo foi denominado isoliquenina (CHANDA *et al.*, 1957; FLEMING e MANNERS, 1966), atualmente isoliquenana (OLAFSDOTTIR e INGÓLFSDDOTTIR, 2001). O termo isoliquenana tem sido aplicado para qualquer α -D-glucana que apresente ligações (1→3),(1→4) em sua cadeia principal, mesmo sendo variável a proporção entre essas ligações. Ocasionalmente essas α -glucanas podem ser ramificadas em O-2, O-3 ou

O-6 (WORANOVICZ-BARREIRA *et al.*, 1999). Um subgrupo das isoliquenanas corresponde à polissacarídeos do tipo nigerana, que apresentam uma proporção fixa de ligações de 1:1, sendo insolúveis em água fria (WORANOVICZ-BARREIRA *et al.*, 1999).

A presença de heteropolissacarídeos também é descrita nos líquens, sendo encontrados polímeros constituídos principalmente por manose e galactose, formando as galactomananas (ULANDER e TOLLENS, 1906², citado por OLAFSDOTTIR e INGÓLFSDOTTIR, 2001). Devido à utilização de procedimentos de purificação inadequados e métodos analíticos estruturais rudimentares, a elucidação das estruturas dos heteropolímeros foi bastante dificultada durante um certo período. Os estudos mais detalhados surgiram por volta da década de 20 (SMITH, 1921³, citado por OLAFSDOTTIR e INGÓLFSDOTTIR, 2001) mas, a partir de 1984, com os trabalhos de GORIN, IACOMINI e colaboradores (GORIN e IACOMINI, 1984; GORIN e IACOMINI, 1985; IACOMINI *et al.*, 1985) as estruturas químicas de galactomananas extraídas de líquens foram devidamente estudadas, através de procedimentos de purificação mais adequados e técnicas analíticas mais modernas, como por exemplo espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono treze (RMN-¹³C) e a cromatografia em fase gasosa acoplada à espectroscopia de massa (CG-EM) (BARON *et al.*, 1991; MICENO *et al.*, 1991).

O primeiro heteropolissacarídeo estudado por estes autores foi o heteropolissacarídeo de *Cetraria islandica*, constituído por uma cadeia principal de manose ligada por ligações α -(1→6), substituída lateralmente por unidades de α -D-galactopirranose e β -D-galactopirranose ligadas por (1→2) e (1→4), respectivamente (GORIN e IACOMINI, 1984).

Atualmente, várias galactomananas já foram isoladas de 24 espécies

² ULANDER, A.; TOLLENS, B. Untersuchungen über die kohlenhydrate der flechten. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, v.39, p.401, 1906.

³ SMITH, A.L. Lichens. Cambridge University Press, 1921.

liquênicas, com a cadeia principal sempre consistindo de unidades de α -D-manopiranosil ligadas por ligações (1→6). A proporção de manose/galactose/glucose é variável, sendo que, na maioria dos casos, manose ou uma proporção quase equivalente de manose e galactose predominam. A proporção de glucose deve ser avaliada cuidadosamente para se excluir a possibilidade de contaminação com glucanas (OLAFSDOTTIR e INGÓLFSDOTTIR, 2001).

A ocorrência de heteropolissacarídeos contendo unidades monossacarídicas diferentes daquelas já descritas é mais rara em líquens. O primeiro foi isolado do líquen *Dictyonema glabratum* por IACOMINI e colaboradores (1987), com um rendimento de 0,06%. A estrutura deste polímero apresentava uma cadeia principal de unidades de α -D-manopiranosil ligadas por ligações (1→3), monossubstituída em 4-O (10%) ou dissubstituída em 2-O e 4-O (10%) por unidades de β -D-xilopiranosil (IACOMINI *et al.*, 1987). Outro heteropolissacarídeo denominado tamnolana, foi recentemente isolado do líquen *Thamnotia vermicularis* var. *subuliformis*. Este polímero é uma ramnopiranosilgalactofuranana com uma estrutura predominante de unidades de β -D-galactofuranosil com complexas cadeias laterais de ramnopiranosil-(1→2) ligadas e terminais de unidades de xilose (OLAFSDOTTIR *et al.*, 1999).

Particularmente com relação ao líquen *Ramalina celastri*, MICENO e colaboradores (1991) purificaram e caracterizaram dois polímeros: uma α -D-glucana ligada por ligações (1→3) e (1→4), distribuídas irregularmente ao longo da cadeia linear, semelhante à família das isoliquenanas, com predominância das ligações (1→3) sobre (1→4); e uma galactomanana formada por uma cadeia principal constituída por unidades de α -D-manopiranosil ligadas por ligações (1→6), substituída em 2-O e 4-O por unidades de β -D-galactopiranosil. Esses autores ainda isolaram uma β -D-glucana obtida por extração com álcali à quente, insolúvel em água, que não foi caracterizada estruturalmente (MICENO *et al.*, 1991).

Portanto, os polissacarídeos isolados de líquens podem ser agrupados dentro de famílias (tabela 1), que foram desenvolvidas baseadas em propriedades químicas e

físicas dos polímeros, cujas análises ficaram mais refinadas com o desenvolvimento da técnica de RMN de carbono treze (^{13}C) e próton (^1H) (OLAFSDOTTIR e INGÓLFSDOTTIR, 2001). Essas famílias apresentam uma variação das proporções das ligações entre os monossacarídeos, conforme a fonte de seu isolamento, que deve sempre ser indicada quando de seu uso.

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA E CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DOS PRINCIPAIS POLISSACARÍDEOS DE LIQUENS – CLASSIFICAÇÃO EM FAMÍLIAS

FAMÍLIA	COMPOSIÇÃO	LIGAÇÃO NA CADEIA PRINCIPAL	PROPORÇÃO ENTRE AS LIGAÇÕES	SOLUBILIDADE EM ÁGUA FRIA
Isoliquenana	α -glucana	(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4)	Variável	Solúvel
Nigerana	α -glucana	(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4)	(1:1)	Insolúvel
Liquenana	β -glucana	(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4)	Variável	Variável
Pustulana	β -glucana	(1 \rightarrow 6)	----	Insolúvel
Laminarana	β -glucana	(1 \rightarrow 3)	----	Insolúvel
Galactomanana	Man:Gal	α -Man p -(1 \rightarrow 6)	Variável	Solúvel
Galglcmanana	Man:Gal:Glc	α -Man p -(1 \rightarrow 6)	Variável	Solúvel

FONTE: OLAFSDOTTIR, E.S., INGÓLFSDOTTIR, K. Polysaccharides from lichens: structural characteristics and biological activity. **Planta Med**, v.67, p.199-208, 2001.

NOTA: ----- Não existente

Abreviaturas: Galglcmanana: galactoglucomanana; man: manose; gal: galactose; glc: glucose; Man p : manopiranose

1.2 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE POLISSACARÍDEOS

Os estudos referentes às atividades biológicas de polissacarídeos datam da segunda metade da década de 1950. Um dos trabalhos pioneiros nesta área foi o de BRADNER e colaboradores (1958), que descreveram, pela primeira vez, a atividade antitumoral de estruturas polissacarídicas da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*. Polissacarídeos isolados de várias fontes exibem vários tipos de atividades, como atividade antiviral (DAMONTE *et al.*, 1994; STÜBER e BUCHENAUER, 1996; DUARTE *et al.*, 2001), anticoagulante (NISHINO *et al.*, 1991; LIMA *et al.*, 1996; CARBONERO *et al.*, 2002) e antitumoral (MA *et al.*, 1991; PEREIRA *et al.*, 1994; STUELP-CAMPELO *et al.*, 2002), sendo de grande interesse para a aplicação médica. Esses dados vêm determinando uma alteração no conceito de que os polissacarídeos seriam não-imunogênicos (OHYA *et al.*, 1994) e, de fato, vários estudos sugerem que a ação biológica dos polissacarídeos ocorre por ativação do sistema imune (KRAUS e FRANZ, 1991; KIM *et al.*, 1996; LEUNG *et al.*, 1997; HO *et al.*, 2000).

Os imunomoduladores podem ser divididos em duas classes gerais baseado em sua origem e interação com o sistema imune. A primeira consiste de produtos de células de mamíferos, em geral proteínas que, seletivamente, aumentam a atividade de células específicas dentro do sistema linfocitário. A segunda consiste de substâncias isoladas e purificadas de microorganismos e de outras fontes naturais, sendo uma ferramenta importante para definir os mecanismos de defesa utilizados pelo hospedeiro (LIANG *et al.*, 1998). Estes imunomoduladores são os chamados “modificadores da resposta biológica” (BRM) (WILLIAMS *et al.*, 1992; BOHN e BeMILLER, 1995; TOKUNAKA *et al.*, 2000).

Evidências experimentais sugerem fortemente que muitas β -glucanas apresentam atividade imunofarmacológica atuando como modificadores da resposta biológica. Um exemplo disto são os polímeros lentinana (TAGUCHI *et al.*, 1988; MAEDA e CHIHARA, 1999) e esquizofilana (FUJIMOTO *et al.*, 1988), que têm sido

empregadas clinicamente no Japão como adjuvantes para a terapia contra o câncer (TOKUNAKA *et al.*, 2000; OLAFSDOTTIR e INGÓLFSDOTTIR, 2001). As β -glucanas estão envolvidos em uma variedade de respostas biológicas de defesa no hospedeiro, seja este vegetal ou animal. Em plantas, a resposta de defesa se dá pela ativação de genes de defesa contra ataques de patógenos (BOHN e BeMILLER, 1995; Di LUZIO, 1999). Nos animais, respostas de defesa podem ocorrer por ativação do complemento C₃ (SAITÔ *et al.*, 1991; CERENIUS *et al.*, 1994), ativação do sistema de coagulação (NISHINO *et al.*, 1991; SAITÔ *et al.*, 1991), reconhecimento de partículas estranhas por monócitos humanos, através de receptores para β -D-glucana (OHYA *et al.*, 1994) e atividade antitumoral por ativação do sistema imune do hospedeiro (CERENIUS *et al.*, 1994; BOHN e BeMILLER, 1995; Di LUZIO, 1999).

Os efeitos biológicos das glucanas parecem ser consequência da conformação dessas moléculas, que apresentam regiões altamente ordenadas, formadas principalmente por hélices triplas (MAEDA *et al.*, 1988; DEMLEITNER *et al.*, 1992; DING *et al.*, 1998; TOKUNAKA *et al.*, 2000), que podem ser decorrentes da massa molecular elevada e dos pontos de ramificação do polímero (SAITÔ *et al.*, 1991, YADOMAE e OHNO, 1996). No caso da lentinana, uma (1 \rightarrow 3)- β -D-glucana, são observadas 3 conformações no estado sólido quando a mesma apresenta alta massa molecular: cadeia simples, hélice simples ou tripla hélice, dependendo da fonte, método de isolamento e tratamentos físicos. Quando esta conformação ordenada é rompida por uréia ou por dimetilsulfóxido ou, quando sua massa molecular é reduzida, a atividade antitumoral desaparece (SAITÔ *et al.*, 1991). Por outro lado, alguns estudos demonstram que (1 \rightarrow 3)- β -D-glucanas com massa molecular menor que 20.000 Da apresentam uma potente atividade antitumoral se o grau de ramificação do polímero for menor que 0,25 (BLASCHEK *et al.*, 1992). No entanto, existem muitas divergências entre os diversos autores, indicando que esta é uma questão ainda não esclarecida.

1.2.1 Ativação do Sistema Imune por Polissacarídeos

O conceito mais atual de imunidade estabelece o processo imune como uma reação a substâncias estranhas, incluindo patógenos e macromoléculas, tais como proteínas e polissacarídeos, sem implicar em uma resposta auto-imune frente a estas moléculas (ABBAS *et al.*, 2000).

A resposta imune pode ser dividida em dois mecanismos de defesa: a imunidade natural ou inata e a imunidade específica ou adquirida. A imunidade natural refere-se a todos os mecanismos presentes no organismo antes da exposição a organismos infecciosos ou outras macromoléculas estranhas; estes não são aumentados por tal exposição e não discriminam entre a maioria das substâncias estranhas. Fazem parte deste sistema as barreiras físicas (pele e membranas das mucosas), moléculas circulantes, tais como fatores complemento, células fagocíticas (macrófagos, neutrófilos e células NK) e mediadores solúveis ativos em outras células, tais como IFN- β e TNF. A resposta imune específica é componente de um sistema integrado de defesa do hospedeiro no qual numerosas células e moléculas funcionam cooperativamente, amplificando os mecanismos protetores da imunidade natural. É estimulada ou induzida por exposição a substâncias estranhas, é específica para macromoléculas distintas e aumenta em magnitude e capacidade defensiva a cada exposição a uma macromolécula particular. Fazem parte deste sistema os anticorpos, os linfócitos e os mediadores solúveis ativos em outras células, tais como IFN- γ . Enquanto os fagócitos e o sistema complemento não distinguem entre antígenos distintos e não aumentam especificamente por exposição repetida ao mesmo antígeno, os linfócitos e anticorpos são altamente específicos e sua produção é estimulada por antígenos estranhos. Apesar disto, para realizar sua função de defesa do hospedeiro eliminando antígenos estranhos, ambos - linfócitos e anticorpos - requerem a participação dos fagócitos e do sistema complemento (ABBAS *et al.*, 2000; ROITT *et al.*, 2001).

A resposta imune específica é também classificada em dois tipos, baseados

nos componentes do sistema imune que participam da resposta: imunidade humoral, que é mediada por anticorpos e, imunidade celular, que é mediada por linfócitos T, os quais freqüentemente atuam em associação com os fagócitos. Na realidade, o sistema imune trabalha de forma associada, visando um efeito comum que é a eliminação do antígeno; assim, os linfócitos da imunidade celular são ativados, secretam citocinas, que estimulam a função dos fagócitos, os quais são componentes do sistema imune natural. Por outro lado, os macrófagos expressam proteínas que também promovem ativação das células T. Desta forma, a capacidade dos macrófagos e linfócitos em estimular um ao outro fornece um importante mecanismo de amplificação da imunidade específica (ABBAS, 2000).

A manipulação ativa do sistema imune do indivíduo é possível utilizando estimulantes não específicos (imunoterapia não-específica ativa) ou imunomoduladores (terapia imunomoduladora) (HERSH e TAYLOR, 1991). O primeiro caso compreende todos aqueles mecanismos que não implicam diretamente na indução específica de anticorpos, abrangendo os fatores de defesa imunológicos não-específicos como a ativação de macrófagos, de células NK e liberação de citocinas. Os imunomoduladores atuam para uma restauração geral ou aumento da imunidade humoral ou celular deficiente. São também considerados não-específicos no sentido de que o aumento da responsividade potencial do sistema imune é principalmente geral do que propriamente antígeno-específica (HERSH e TAYLOR, 1991).

Vários agentes estimulantes não-específicos da resposta imune têm sido investigados, nos últimos 30 anos, nas terapias contra o câncer, sendo a maioria produtos bacterianos (RICHMAN *et al.*, 1981). Eles podem ser classificados em várias categorias de acordo com o seu grau de purificação (tabela 2). Suas administrações têm sido avaliadas por várias vias diferentes, incluindo a administração por incisões na epiderme, por injeção intradérmica, subcutânea, intralesional, endovenosa e administração intracavitária (MARKMAN, 1987; WATANABE e IWA, 1987).

TABELA 2 – ALGUNS ESTIMULANTES NÃO-ESPECÍFICOS DAS DEFESAS IMUNE DO INDIVÍDUO

CATEGORIA	EXEMPLO
Microorganismos intactos	Viável: BCG Viável inativado: OK-432 Não-viável: <i>C. parvum</i>
Parede celular microbiana	Esqueleto da parede celular de BCG Esqueleto da parede celular de <i>Nocardia</i> Resíduo da extração de BCG com metanol
Glucanas	Glucana de levedura Lentinana (fúngica) Paquimarana (fúngica) Esquizofilana (fúngica)
Polissacarídeos ligados a proteínas	Krestina (fúngico)
Glicoproteínas microbianas	Bioestim (glicoproteína de <i>Klebsiella</i>)
Compostos sintéticos ou purificados	Peptídeoglicanas (Muramil dipeptídeo (MDP) e derivados de MDP) Trealose dimicolato Lipopolissacarídeos (LPS)
Polinucleotídeos indutores de interferon	Poli IC Poli IC-LC Poli AU

FONTE: HERSH, E.M.; TAYLOR, C.W. Immunotherapy by active immunization: use of nonspecific stimulants and immunomodulators. In: DeVITA, V.T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S.A. (eds) **Biologic therapy of cancer**. Philadelphia: Lippincott, 1991, p.613-626.

ABREVIATURAS: BCG: bacilus Calmette-Guérin; OK-432: preparação estreptocócica; *C. parvum*: *Corynebacterium parvum*; lentinana, paquimarana e esquizofilana: β -glucana-(1 \rightarrow 3) ramificada em (1 \rightarrow 6) com variadas proporções; IC: ácido inosínico-citidílico; LC: poli *l*-leucina; AU: ácido adenílico-uridílico.

Entre os vários produtos testados estão as glucanas extraídas de fungos e leveduras, sendo descrita a utilização destes polímeros em terapias conjuntas com quimioterápicos tradicionais em hospitais japoneses, mostrando um aumento da remissão dos tumores e sobrevivência dos pacientes testados em relação à terapia convencional (TAGUCHI, 1983; FUJIMOTO *et al.*, 1983; WAKUI *et al.*, 1986). Apesar disto, como não existem trabalhos semelhantes em outras partes do mundo para comparação com tais informações, a real importância destes dados não está completamente esclarecida (HERSH e TAYLOR, 1991).

Os agentes imunoterapêuticos não-específicos atuam principalmente via ativação de monócitos, macrófagos e células do sistema retículo-endotelial (SRE) (THOMASSON e STEWART, 1981). Como os tumores são naturalmente infiltrados por células linfóides e por macrófagos, acredita-se que o mecanismo de morte das células tumorais através da imunoterapia com agentes não-específicos seja decorrente da ativação das células do sistema imune infiltradas que, ativadas, teriam uma ação direta sobre a célula tumoral (HERSH *et al.*, 1976; HERSH e TAYLOR, 1991). Outro efeito antitumoral presumível desses agentes seria indireto, ou seja, a ativação de macrófagos e células do SRE ocasionaria a liberação de citocinas citotóxicas como por exemplo, o TNF- α e - β e a IL-1. Estas ativariam linfócitos T e células NK os quais, por sua vez, liberariam IL-2 e IFN- γ , que apresentam ação antitumoral direta (CARSWELL *et al.*, 1975; HERSH e TAYLOR, 1991). Dessa forma, um aspecto importante do mecanismo de ação da imunoterapia não-específica refere-se à indução de citocinas que possuem ação antitumoral direta ou indireta, através da ativação de outras células efectoras (HERSH *et al.*, 1976; GIFFORD e LOHMANN-MATTHES, 1987).

A ativação da resposta do sistema imune envolvendo macrófagos, células NK e T “helper”, diferenciação de células T, aumento da resposta proliferativa de células polimorfonucleares, produção de interleucinas e interferons, além do aumento da atividade fagocítica pode ser um processo induzido por polissacarídeos (ADACHI

et al., 1993; BOHN e BeMILLER, 1995). Entre eles, muitas β -glucanas estão envolvidas em uma variedade de respostas de defesa tais como atividade antitumoral e antiviral (SAITÔ *et al.*, 1991; DUARTE *et al.*, 2001), ativação do sistema de coagulação (SAITÔ *et al.*, 1991; ADACHI *et al.*, 1993), resistência contra infecção bacteriana (CERENIUS *et al.*, 1994; BOHN e BeMILLER, 1995), ativação de macrófagos e monócitos (OHYA *et al.*, 1994, BOHN e BeMILLER, 1995; TOKUNAKA *et al.*, 2000), embora tais atividades variem para cada polímero específico.

Em contraposição aos quimioterápicos, cujo mecanismo de ação envolve a citotoxicidade, a atividade antitumoral de polissacarídeos incluindo aquela das β -glucanas, tem sido explicada através da relação de suas estruturas químicas e suas ações como imunomoduladores (BOHN e BeMILLER, 1995). Os avanços no entendimento do sistema imune e na definição de antígenos tumorais têm incentivado o uso de novas estratégias no combate ao câncer (ABBAS *et al.*, 2000). Alguns autores postulam que em um sistema sem tratamento, onde as células do tumor proliferam mais rápido que a capacidade destrutiva do sistema imune, principalmente dos macrófagos, o uso terapêutico dos polissacarídeos contribuiria para diminuir o crescimento tumoral por potencialização das funções imunes do organismo (KIM *et al.*, 1996). Um dos principais mecanismos para destruição celular é a ativação de macrófagos, células envolvidas em todas as fases da resposta imune e, quando ativadas, produzem alguns metabólitos característicos que também participam da ação efetora do sistema imune (BRATTGJERD *et al.*, 1994, OKASAKI *et al.*, 1995).

Portanto, os macrófagos, células de particular interesse no presente trabalho, estão envolvidos em várias funções, além da fagocitose, incluindo: (1) secreção de vários compostos, tais como hidrolases, fatores estimuladores de colônia, prostaglandinas, estimuladores de células T e B, interferons, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, peróxido de hidrogênio, entre outros; (2) morte extracelular de células tumorais e microorganismos e, (3) apresentação de antígeno no processo de

indução de formação de anticorpos (van OSS, 1986). Devido ao interesse neste trabalho, uma breve revisão sobre estas células e os efeitos exercidos por diferentes polissacarídeos será apresentado a seguir.

1.3 MACRÓFAGOS

Os macrófagos são células do grupo dos fagócitos mononucleares, chamados de monócitos no sangue e macrófagos nos tecidos. Eles estão distribuídos por todos os tecidos do organismo, sendo responsáveis por numerosos processos homeostáticos, imunológicos e inflamatórios e constituindo uma defesa imediata contra elementos estranhos aos organismos. Eles participam tanto da imunidade específica, agindo como célula apresentadora de antígeno e produzindo IL-1, como da imunidade não-específica contra bactérias, fungos, vírus e neoplasias, não sendo surpreendente que os macrófagos apresentem variados fenótipos morfológicos e funcionais (ADAMS, 1979; SLAVKOVSKY, 2002).

Dessa forma, essas células podem ser classificados em 3 grupos funcionais: (1) macrófagos residentes, derivados da cavidade peritoneal sem nenhum estímulo; (2) macrófagos elicitados, que são recrutados para esta cavidade por um agente inflamatório não-específico, tal como o tioglicolato de sódio; e (3) macrófagos ativados, recrutados para a cavidade por uma infecção como o BCG (*Bacillus Calmette Guerin*), o qual produz um exudato rico em linfocinas (COHN, 1978; CRAWFORD *et al.*, 1987). Embora os macrófagos ativados sejam capazes de destruir o agente invasor, as células elicitadas necessitam de um estímulo adicional para ativar sua potencial ação microbiana e tumoricida, sendo o principal ativador o IFN- γ , que é produzido por linfócitos T ativados, tornando-se então capazes de se diferenciar em macrófagos ativados, os quais são habilitados para eliminar a maioria, se não todos, os patógenos (EZEKOWITZ e GORDON, 1984⁴, citado por KESHAV *et al.*, 1990; PORTNOY,

⁴ EZEKOWITZ, R. A. B.; GORDON, S. Alterations of surface properties by macrophage activation. Expression of receptors for Fc and mannose-terminal glycoproteins and differentiation antigens. In:

2001). Sendo assim, a diferenciação conceitual entre os diversos tipos de macrófagos é ainda bastante confusa e termos como estimulado, ativado, induzido, elicitado, entre outros, são freqüentemente usados sem distinção. Basicamente, dois grupos principais podem ser distinguidos: macrófagos residentes (que não sofreram exposição a nenhum agente externo) e macrófagos inflamatórios (SLAVKOVSKY, 2002).

Em um outro tipo de classificação, os macrófagos podem ser divididos em normais e inflamatórios. Os primeiros incluem os macrófagos do tecido conjuntivo (histiócitos), do fígado (células de Kupffer), do pulmão (macrófagos alveolares), dos linfonodos, do baço, da medula óssea, dos fluidos serosos (macrófagos pleurais e peritoneais), da pele (histiócitos e células de Langerhans) e em outros tecidos. A população destas células em um tecido particular é mantida por influxo dos monócitos do sangue circulante, renovação biológica ou proliferação local. Sob condições normais, prevalece esta última, sendo que dependendo do tecido, sua viabilidade varia entre 6 e 16 dias (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

Os macrófagos inflamatórios são também chamados de macrófagos ativados e estão presentes em vários exudatos, podendo ser caracterizados por parâmetros morfológicos, além de vários marcadores específicos (GORDON, 1996). O termo “macrófago ativado” geralmente refere-se a macrófagos que sofreram variações funcionais, bioquímicas e morfológicas, características de aumento da atividade celular. Quando comparados com macrófagos normais, essas “células ativadas” são maiores, mais aderentes às superfícies, demonstram aumento da expressão e secreção de enzimas lisossomais e de fatores de crescimento (os quais estão envolvidos no reparo de tecidos), realizam a fagocitose, engolfando grandes partículas como bactérias, leveduras, células tumorais e células “velhas” e, para eliminar essas partículas ingeridas, eles produzem metabólitos reativos de oxigênio e nitrogênio (KARNOVSKI e LAZDINS, 1978; NATHAN, 1985; FADOK *et al.*, 1993; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Dessa forma, a ativação dos macrófagos

envolve um estímulo antígeno-específico por um mecanismo que culmina com uma atividade fagocítica e microbicida aumentadas, situação que é causada pelo contato com agentes estranhos como bactérias, vírus e parasitas (KARNOVSKY e LAZDINS, 1978; COHN, 1978) ou por moléculas produzidas por linfócitos T (ROITT *et al.*, 2001).

Além disso, eles podem secretar moléculas sinalizadoras chamadas citocinas e quimiocinas, as quais dirigem a resposta imune (ABBAS *et al.*, 2000). As citocinas, proteínas de baixa massa molecular, são importantes porque permitem a comunicação entre as células do sistema imune via receptores específicos expressos nas superfícies celulares. Sob diferentes condições, os macrófagos podem secretar diferentes citocinas, tais como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e IL-12, e também podem responder a várias delas, tais como, IFN- γ , IL-4 e 13, fator de crescimento transformante β (TGF- β), entre outros (ABBAS *et al.*, 2000).

As principais características observadas nos macrófagos ativados correspondem ao aumento do “burst” respiratório, à taxa de migração além do estímulo da metabolização de glucose (BURGALETA *et al.*, 1978; KARNOVSKY e LAZDINS, 1978). A ativação de macrófagos é um fenômeno complexo que pode depender não apenas deles, mas de várias células, moléculas efetoras e estímulos aos quais os macrófagos são expostos (MIZUNO *et al.*, 2000).

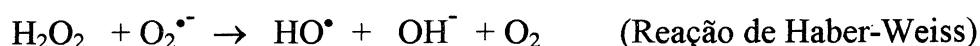
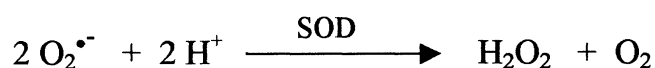
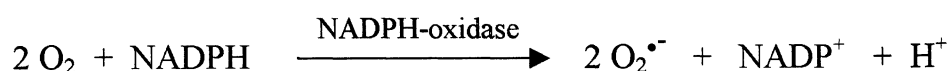
1.4 “BURST” RESPIRATÓRIO

A atividade de macrófagos frente a células tumorais e a expressão citotóxica deste mecanismo, estão correlacionadas com a expressão de vários mediadores inflamatórios (MARTIN e EDWARDS, 1993). Dentre esses mediadores, os mais importantes são TNF- α , IL-1, eicosanóides, intermediários reativos de oxigênio ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 e radical hidroxil) e intermediários reativos de nitrogênio, incluindo óxido nítrico (NO^{\bullet}) e o ânion peroxinitrito ($ONOO^-$) (NATHAN, 1987; VANE *et al.*, 1994, ROSA *et al.*, 1995).

A ligação de uma variedade de compostos nos receptores da superfície celular de neutrófilos e fagócitos normalmente leva à formação de metabólitos reativos de oxigênio. Isto ocorre devido a uma rápida ativação do complexo enzimático NADPH-oxidase, que é constituído por uma flavoproteína contendo FAD, ligada à membrana de vesículas secretoras que se fundem à membrana plasmática sob estímulo, e por componentes citosólicos. Normalmente ela está inativa, mas pode ser rapidamente ativada por variados estímulos, que podem ser cadeias peptídicas de microorganismos como o N-formilmethionilleucilfenilalanina (*fMetLeuPhe*) ou o éster de forbol 12-meristato 13-acetato (PMA), promovem a translocação de proteínas fosforiladas para a membrana, onde se associam com o citocromo b_{558} , formando a NADPH-oxidase ativa (BABIOR, 1992; SEGAL e ABO, 1993). O complexo ativo, ao oxidar a coenzima NADPH, acarreta a liberação de elétrons que reduzem o oxigênio a $O_2^{\bullet-}$, o qual, subseqüentemente, é convertido em H_2O_2 pela enzima superóxido dismutase (SOD) ou por dismutação espontânea.

Alternativamente, o H_2O_2 também pode ser formado, diretamente, por oxidases presentes nos peroxissomos. O radical hidroxil pode ser formado pela reação do $O_2^{\bullet-}$ com o H_2O_2 pela reação de Haber-Weiss (ROOT e METCALF, 1977; PICK e KEISARI, 1980; COTRAN *et al.*, 1994).

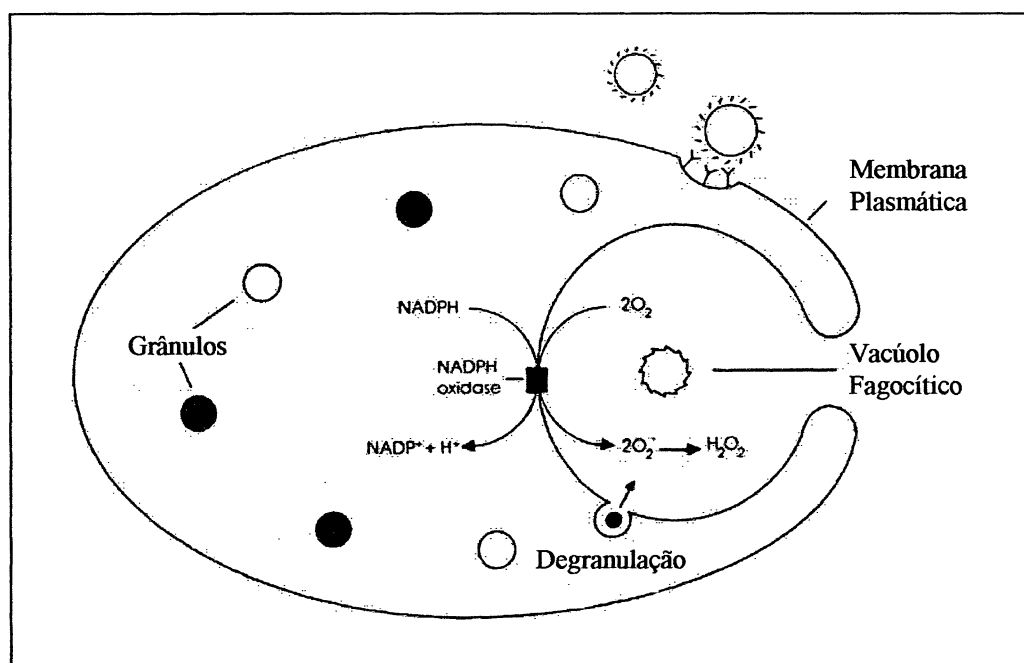
Tais reações estão ilustradas abaixo:



O estímulo no consumo de oxigênio (“burst” respiratório), e consequentemente da produção de H_2O_2 , constitui parâmetro bioquímico característico dos macrófagos ativados e sua intensidade vai depender de como e onde tais células

são obtidas (BURGALETA *et al.*, 1978; FADOK *et al.*, 1993; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Esta ativação pode ser desencadeada em consequência de uma resposta aos fatores liberados por linfócitos T, pela presença de certos microorganismos como o BCG ou, por produtos como tioglicolato, lipopolissacarídeos e polissacarídeos (ISAAC, 1989; FADOK *et al.*, 1993; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Em macrófagos isolados este estímulo ocorre também através do PMA, que ao alojar-se na membrana dos macrófagos, ativa várias isoformas da proteína quinase C (principalmente PKC β -II) que, em consequência, ativa a NADPH-oxidase a produzir espécies reativas de oxigênio, que destroem os patógenos fagocitados ou presentes no meio extracelular (RYVES *et al.*, 1991).

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA FAGOCITOSE DE UM MICROORGANISMO



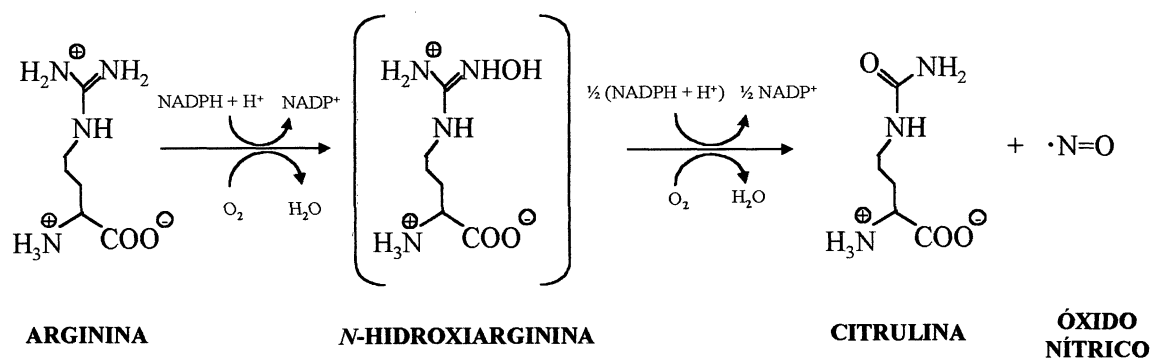
A NADPH oxidase é seletivamente ativada na membrana do vacúolo gerando O₂^{•-} e H₂O₂ no lúmen vacuolar. Enzimas são liberadas no vacúolo por degranulação dos grânulos citoplasmáticos do fagócito.

FONTE: SEGAL, A. W.; ABO, A. The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes. *Trends Biochem. Sci.*, v. 18, n.2, p. 43-47, 1993.

1.5 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO[•])

O óxido nítrico, um gás radical livre e solúvel em água, é produzido por células endoteliais, neurônios específicos no cérebro e por macrófagos estimulados (PRINCE e GUNSON, 1993; COTRAN *et al.*, 1994). Ele é um mensageiro intracelular, sendo livremente difusível e seus efeitos biológicos são determinados pela sua reatividade química. Como um radical livre, ele reage rapidamente com vários compostos, principalmente espécies contendo elétrons desemparelhados, tais como oxigênio molecular, O₂^{•-} e metais (MAYER e HEMMENS, 1997).

O NO[•] é sintetizado a partir da L-arginina por duas reações seqüenciais de enzimas monooxigenases chamadas óxido nítrico sintase (NOS). Essas enzimas são homodímeras, contendo FAD e FMN como grupos prostéticos e requerem tetrahydrobiopterina, NADPH e O₂ para sua atividade. Essas enzimas pertencem a uma família rara de citocromos P-450 (MAYER e HEMMENS, 1997). A reação de produção de NO[•] está ilustrada abaixo:

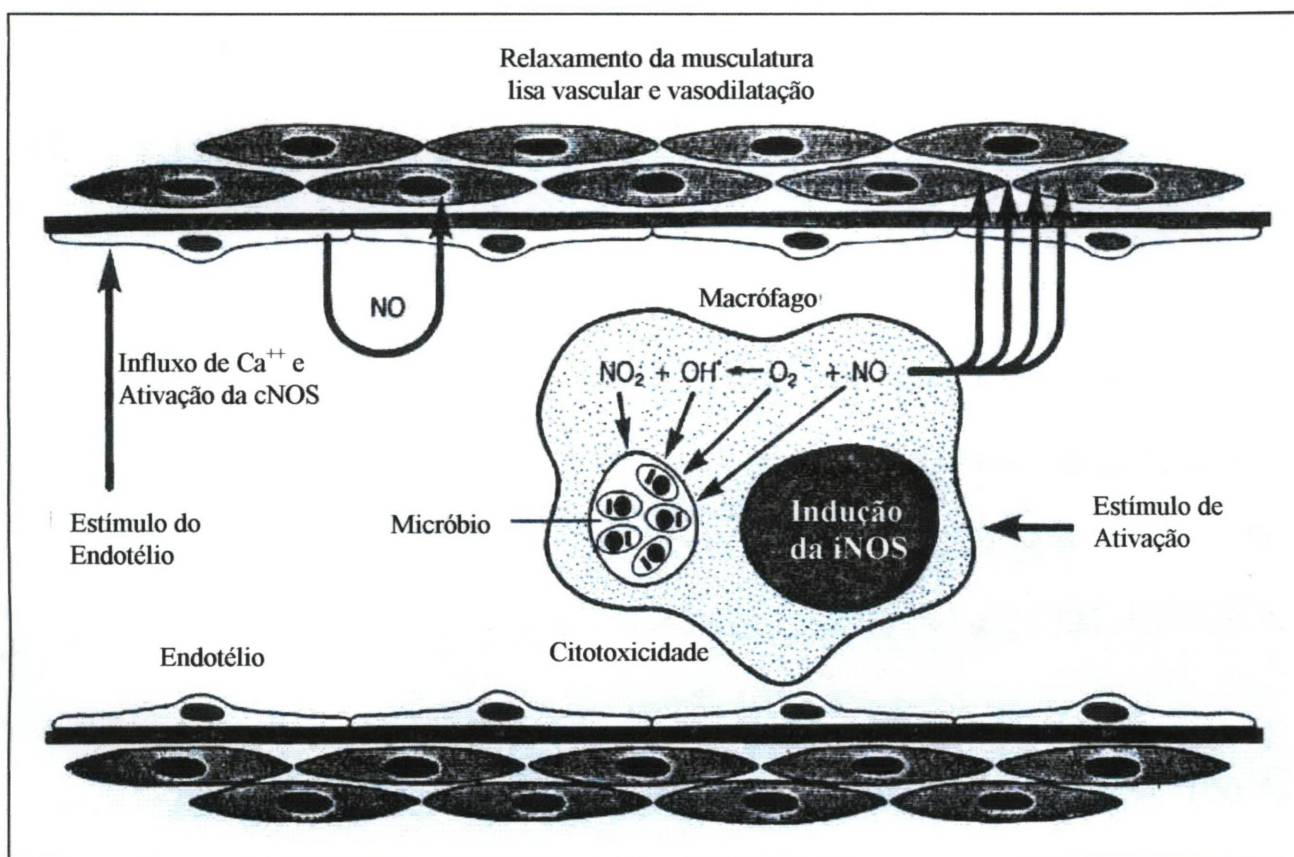


FONTE: MAYER, B.; HEMMENS, B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends Biochem. Sci.*, v.22, p.477-481, 1997.

Há dois tipos de NOS: nas células endoteliais e nos neurônios, a enzima é constitutiva (cNOS), sendo ativada por cálcio e calmodulina; nos macrófagos, a NOS é induzida (iNOS) quando estes são ativados por citocinas (por exemplo, IL-1, IFN- γ , TNF- α) ou outros agentes, como bactérias (por exemplo, BCG) ou produtos

bacterianos (por exemplo, LPS), sendo sua atividade, neste caso, independente de cálcio e de calmodulina (MONCADA *et al.*, 1994; JAMES, 1995). As evidências mostram a necessidade de duas moléculas sinais para a indução da atividade efetora desta via bioquímica, seja por LPS + IFN- γ (GREEN *et al.*, 1990), ou por IFN- γ + TNF- α (LIEW *et al.*, 1990). A inibição da transcrição da enzima pode se dar por ação de algumas citocinas ou fatores de crescimento, como IL-4, -8 e -10, fator de crescimento derivado de plaquetas (MAYER e HEMMENS, 1997), ou por análogos da arginina N-substituídos, como a N^G-monometil-L-arginina, aminoguanidina ou N-nitroarginina-metil-éster (JAMES, 1995).

Como o tempo de meia-vida do NO[•] é curto (somente alguns segundos), este efetor atua somente nas células próximas do seu local de produção. Entre as ações do NO[•] produzido pelo endotélio vascular estão o relaxamento da musculatura lisa vascular, redução da adesão e agregação plaquetária e, o NO[•] produzido por macrófagos atua como radical livre, sendo citotóxico para certos microorganismos e células tumorais (PRINCE e GUNSON, 1993; COTRAN *et al.*, 1994; MONCADA *et al.*, 1994; Mayer e HEMMENS, 1997). Porém, a produção descontrolada de NO[•] pode levar a uma resposta maciça tóxica, implicada em uma série de doenças inflamatórias (COTRAN *et al.*, 1994; ZHUANG e WOGAN, 1997).

FIGURA 2 - SÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO (NO[•]) PELO ENDOTÉLIO VASCULAR E POR MACRÓFAGOS

A óxido nítrico sintase (NOS) induzida combina o oxigênio com o nitrogênio da L-arginina para produzir óxido nítrico, o qual é tóxico para bactérias e células tumorais e causa vasodilatação e relaxamento da musculatura lisa. Em macrófagos de camundongos, IFN- γ ativa esta via, a qual é iniciada por ação do TNF. A toxicidade pode ser aumentada pela interação com espécies reativas de oxigênio, levando à formação de peroxinitritos.

FONTE: COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. *Robbins: Pathologic basis of disease*. 5 ed, Philadelphia: W. B. Saunders Company, p.11-13, 1994.

No presente trabalho, os polissacarídeos têm interesse especial entre as várias moléculas conhecidas por ativar macrófagos. O envolvimento destas células em todas as fases da resposta imune as tornam modelos interessantes para o estudo dos efeitos dos polissacarídeos como agentes imunoestimulantes não-específicos.

1.6 ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS POR POLISSACARÍDEOS

Vários polissacarídeos são descritos como capazes de estimular macrófagos (BRATTGJERD *et al.*, 1994; YOSHIKAWA *et al.*, 1996; Di LUZIO, 1999). Entre os mais estudados destacam-se as (1→3),(1→6)-β-D-glucanas (STONE e CLARKE, 1992; BOHN e BeMILLER, 1995), tanto particuladas quanto aquelas solúveis em água, as quais podem ser obtidas de uma variedade de plantas, fungos e bactérias (WAKSHULL *et al.*, 1999). O grau de ramificação destes polímeros é bastante variado e, via de regra, as estruturas apresentam massas moleculares geralmente maiores que 200.000 Da (KRAUZ e FRANZ, 1991; MISAKI *et al.*, 1993; OKASAKI *et al.*, 1995). Segundo GOLDMAN (1988), macrófagos peritoneais de camundongos possuem receptores para β-glucanas, podendo, desta forma, reconhecer e fagocitar esses polímeros, o que ocasionaria a ativação dessas células, caracterizada principalmente pela secreção de IL-1, IL-6, TNF-α, além da produção de NO[•], O₂^{•-}, H₂O₂ e aumento da atividade fagocítica (ABEL e CZOP, 1992; SAKURAI *et al.*, 1992; ADACHI *et al.*, 1993; OKASAKI *et al.*, 1995; OKAZAKI *et al.*, 1996).

SAKURAI e colaboradores (1996) e ESTRADA e colaboradores (1997) demonstraram que (1→3),(1→4)-β-D-glucanas lineares também são capazes de estimular os macrófagos a secretar IL-2, IL-4 e IFN-γ. Segundo alguns autores, seria possível que células T secretassem citocinas por um mecanismo mediado indiretamente pelas citocinas derivadas de macrófagos estimulados pela β-glucana, ou por um mecanismo alternativo de ativação direta das células NK, visto que estas também apresentam um receptor para este polímero (DUAN *et al.*, 1994; VETVICKA *et al.*, 1996).

Além das β-glucanas, uma fucogalactana isolada do cogumelo *Sarcodon aspratus* também induziu a liberação de TNF-α e NO[•] por macrófagos de camundongos *in vitro*, sendo a produção de TNF-α aproximadamente 4 vezes mais eficaz que a da β-glucana (MIZUNO *et al.*, 2000). O extrato aquoso deste cogumelo também apresentou uma atividade antitumoral contra o Sarcoma-180 (MARUYAMA

et al., 1989) sendo especulado que esta ação possa estar vinculada a atividade imunoestimulante demonstrada pela fucogalactana componente deste extrato (MIZUNO *et al.*, 2000).

Outro exemplo de atividade imunoestimulante exercida por polissacarídeos é aquela descrita para um polímero tipo-inulina, chamado PG, que foi extraído da raiz de *Platycodon grandiflorum*. Esta planta é uma Campanulaceae utilizada tradicionalmente como expectorante e contra bronquite e laringite (HAN *et al.*, 2001). Os autores mostraram que o polímero ativa seletivamente células B e macrófagos, mas não células T e propuseram que a seletividade seria causada pela ligação desta molécula a receptores específicos presentes nas células B e macrófagos, mas não nas células T. O efeito de seletividade foi muito similar àquele apresentado pelo polissacarídeo péctico angelana, isolado da raiz da Umbelliferae *Angelica gigas* Nakai (JEON *et al.*, 1999; JEON *et al.*, 2001). Estes polímeros, embora com efeitos similares, apresentaram composições químicas e estruturas substancialmente diferentes, sendo a angelana constituída por arabinose, galactose e ácido galacturônico, não contendo glucose (JEON *et al.*, 1999) e o polissacarídeo PG sendo uma glucofrutana, com a cadeia principal sendo constituída por (2→1)-β-D-frutose (HAN *et al.*, 2001). Ambos os polímeros ativaram a produção de NO^{*} pelos macrófagos, porém de forma diversa daquela exercida pelo LPS, uma vez que os receptores utilizados por esta molécula e pelos polissacarídeos não é o mesmo (HAN *et al.*, 2001; JEON *et al.*, 2001). Porém, não se tem dados comparativos entre esses polissacarídeos e as β-glucanas, as quais também ativam a produção de NO^{*} em macrófagos pela ligação em um receptor diferente daquele do LPS (HAN *et al.*, 2001).

Galactanas sulfatadas extraídas de algas marinhas também ativam macrófagos *in vivo*, especialmente aquelas extraídas de *Porphyra yezoensis* e *Gracilaria verrucosa* (YOSHIZAWA *et al.*, 1993). Ambas apresentam uma estrutura similar, tendo uma unidade dissacarídica repetitiva básica de 3-O-(3,6-anidro-L-galactopiranosil)-β-D-galactopiranosose, o qual pode ser substituído com um metil no C-

6 da unidade D ou com um sulfato no C-6 da unidade L (YOSHIZAWA *et al.*, 1996). Estes polissacarídeos causaram um aumento no número de células da cavidade peritoneal dos animais inoculados, bem como estimularam a produção de TNF, espécies reativas de oxigênio e a atividade fagocítica (YOSHIZAWA *et al.*, 1996), fato este que também é observado quando macrófagos são tratados com uma preparação da parede celular de levedura, constituída de manana e glucana, conhecida como zimosana (BADWAY e KARNOVSKI, 1980; BERTON e GORDON, 1983).

Quando o polímero extraído de *Gracilaria verrucosa* foi digerido enzimaticamente, o produto resultante estimulou linfócitos T, através da ativação de macrófagos (YOSHIZAWA *et al.*, 1996).

MIZUNO e colaboradores (1998) observaram que a administração de uma (1→6),(1→4)- α -D-glucanas extraída do cogumelo *Agaricus blazei* aumentou a população de células T citotóxicas e células NK, em camundongos. Este polímero também exibiu uma atividade antitumoral contra o Sarcoma-180, efeito provavelmente resultante da ativação do sistema imune do animal. Uma (1→3),(1→4)- α -D-glucana (2:1) com um alto grau de polimerização e massa molar de aproximadamente 2000 kDa extraída do líquen *Cetraria islandica*, aumentou a atividade fagocítica de granulócitos do sangue total. Utilizando (1→3),(1→4)- α -D-glucana (3:1) extraídas do líquen *Ramalina celastri*, foi observado uma inibição de crescimento do Sarcoma-180 induzido em camundongos, muito mais acentuada do que quando foi utilizada uma mistura glucana:galactomanana, na proporção de 17:3 (CARNEIRO LEÃO *et al.*, 1998). O mecanismo de ação responsável por esta atividade ainda não foi avaliado.

Um outro mecanismo pelo qual os polissacarídeos podem exercer sua ação antitumoral, é pela interferência na interação células-matriz extracelular, tema que, pela sua importância, será abordado a seguir.

1.7 INTERFERÊNCIA NA INTERAÇÃO CÉLULAS-MATRIZ EXTRACELULAR OCACIONADA POR POLISSACARÍDEOS

Vários estudos demonstram que a matriz extracelular regula o crescimento e diferenciação celular, a regeneração tecidual, a resposta imune, a coagulação sanguínea, além de funcionar como um fator de sobrevivência celular para muitos tipos de células (YURCHENCO e SCHITTNY, 1990, ERICKSON e COUCHMAN, 2000). Estudos têm demonstrado que a falta de aderência em um substrato ativa um processo suicida em células epiteliais e endoteliais que, privadas da adesão, sofrem morte celular com características morfológicas de apoptose (ZHANG *et al.*, 1995). Por outro lado, o processo de adesão celular à matriz extracelular também pode participar na etiologia e patogênese de um grande número de doenças, incluindo câncer (ZETTER, 1990).

Na composição da matriz extracelular são encontradas proteínas como colágeno, elastina, fibronectina, laminina, fibrinogênio, vitronectina, tenascina, entre outras (YURCHENCO e SCHITTNY, 1990). As células ligam-se às proteínas da matriz através de receptores, com regiões ligantes-específicos nestas macromoléculas e, várias respostas biológicas podem ser induzidas, incluindo a reorganização do citoesqueleto, com alteração de forma e espalhamento das células (COLUMBO *et al.*, 1995; ADACHI *et al.*, 1996; SOTTILE e MOSHER, 1997). Esses receptores foram classificados como uma família de receptores integrinas, descritas como proteínas heterodiméricas integrais transmembrânicas, com domínios intra e extracelulares, que promovem a ligação de componentes da matriz extracelular com o citoesqueleto (TAMKUN *et al.*, 1986). A interação entre receptores integrinas e seus ligantes (fibronectina, laminina, colágeno, vitronectina), além dos eventos de adesão, pode ter outras funções em vários processos biológicos tais como a invasão tumoral e metástase, uma vez que células de linhagens tumorais expressam uma variedade de integrinas em suas superfícies (COLUMBO *et al.*, 1995; ZHANG *et al.*, 1995; VARNER e CHERESH, 1996).

A ação de polissacarídeos, particularmente aqueles sulfatados, na interferência do reconhecimento da matriz extracelular com superfícies celulares, é um campo de crescentes estudos (MISHIMA *et al.*, 1998; KAEFFER *et al.*, 1999; LIU *et al.*, 2000; de CARVALHO *et al.*, 2001; ROCHA *et al.*, 2001).

Estudos desenvolvidos com galactanas sulfatadas de ocorrência natural, demonstraram inibição da interação *in vitro* entre células de adenocarcinoma mamário e fibronectina, laminina e colágeno tipo IV. Esta atividade inibitória parece depender da densidade de carga, da massa molecular e da estrutura do polímero (LIU *et al.*, 2000; KAEFFER *et al.*, 1999).

Outro polissacarídeo sulfatado extraído da alga *Spirulina platensis*, composto principalmente de ramnose e chamado espirulana, inibiu a invasão de células tumorais de melanoma, carcinoma de cólon e fibrossarcoma em filtros revestidos com matrigel, laminina e uma mistura de matrigel/fibronectina, porém não teve ação sobre a fibronectina. O pré-tratamento da laminina com espirulana não interferiu na adesão tumoral porém, o pré-tratamento das células tumorais com espirulana inibiu a adesão à laminina e, a metástase pulmonar do melanoma *in vivo*, foi significativamente reduzida pela co-injeção das células tumorais com o polissacarídeo. Os resultados sugeriram que este polímero poderia prevenir a adesão e migração das células tumorais à laminina presente na matriz extracelular (MISHIMA *et al.*, 1998). Resultados similares de inibição de adesão de células de carcinoma pulmonar murino à laminina *in vitro*, também foram obtidos por SOEDA e colaboradores (1994) quando testaram fucanas sulfatadas e supersulfatadas quimicamente, sendo esta última a mais ativa. Do mesmo modo, o pré-tratamento das células tumorais com o polissacarídeo nativo ou supersulfatado reduziu a adesividade à laminina, o que pode ter ocorrido por uma interação física entre as células tumorais e a proteína da matriz extracelular (SOEDA *et al.*, 1994).

Dessa forma, a atividade antitumoral dos polissacarídeos pode se dar por várias maneiras, como, por exemplo, por ativação do sistema imune e/ou por

interferência da adesão das células na matriz extracelular, o que reforça o seu potencial uso como coadjuvante em uma terapia tradicional.

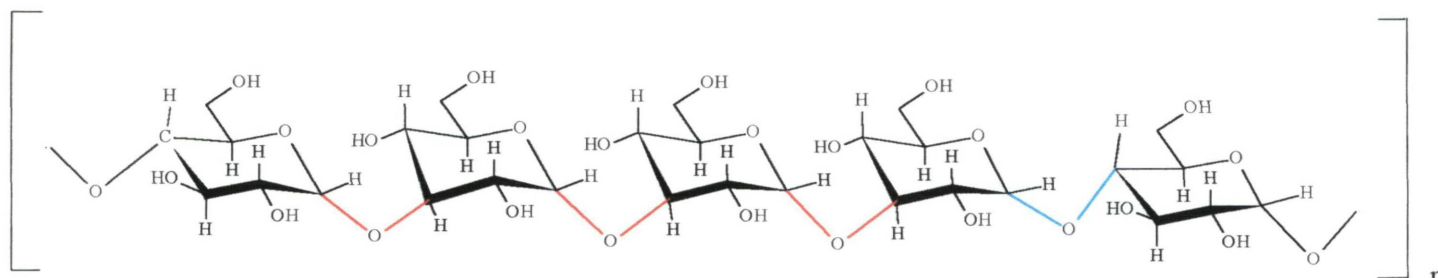
1.8 JUSTIFICATIVA DOS OBJETIVOS

Os líquens são fontes biológicas promissoras de polímeros com potencial atividade biológica (GORIN e IACOMINI, 1984; BARON *et al.*, 1991; STUELP *et al.*, 1999; WORANOVICZ-BARREIRA *et al.*, 1999). Os numerosos estudos mostrando que polissacarídeos de diferentes origens podem atuar como modificadores da resposta biológica (BRM), motivaram o presente trabalho sobre determinação dos efeitos biológicos de uma α -glucana isolada do líquen *Ramalina celastri* e de uma galactoglucomanana ramificada isolada do líquen *Cladonia ibitipocae*.

A α -glucana, cuja estrutura foi caracterizada por STUELP *et al.* (1999), é solúvel em água e constituída por ligações (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4), numa proporção 3:1 (figura 3). Interessantes efeitos contra células HeLa por parte deste polímero foram descritos (CARNEIRO-LEÃO *et al.*, 1997). Os resultados foram significativos principalmente em relação a modificações ultraestruturais, com a formação de “blebs” de membrana demonstrando dano celular. Também foi observado um material elétron-denso disperso pelo citoplasma limitado por vesículas do tipo lisossomos que, segundo a autora, poderiam ter sido originadas pela internalização do polissacarídeo.

A atividade *in vivo* da α -glucana de *R. celastri* foi avaliada contra o Sarcoma-180 em camundongos, sendo demonstrado que a administração do polissacarídeo em dose única de 200 mg.kg⁻¹, 24 horas após a inoculação das células para implantação da forma sólida do tumor, promove 80% de inibição do crescimento tumoral. Porém, há a necessidade de estudos que ajudem a esclarecer o modo de ação deste polímero.

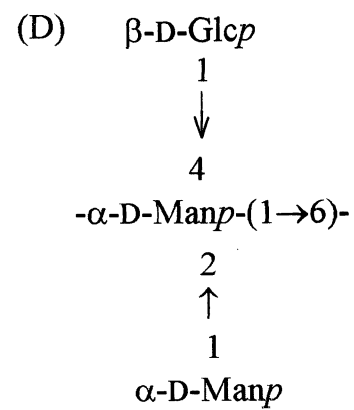
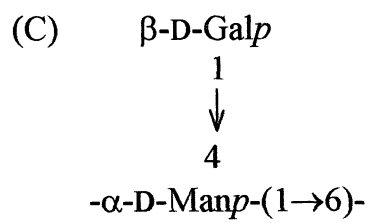
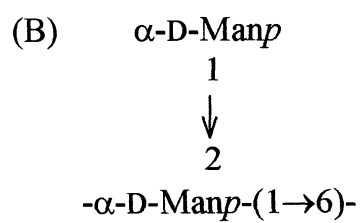
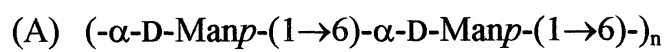
FIGURA 3 – ESTRUTURA PREDOMINANTE DA α -GLUCANA DE *Ramalina celastri* - [α -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)]_n (3:1).



Em vermelho estão representadas as ligações α -(1 \rightarrow 3) e em azul, a α -(1 \rightarrow 4).

O outro polímero estudado no presente trabalho foi uma galactoglucomanana nativa isolada do líquen *Cladonia ibitipocae*. Este polímero foi purificado e caracterizado estruturalmente por WORANOVICZ-BARREIRA e colaboradores (1999), sendo constituído por galactose, manose e glucose numa proporção de 35:60:2 e apresentando massa molecular de 2.000 kDa. Este polissacarídeo tem como principais características estruturais, uma cadeia principal de α -D-manopiranosose (1 \rightarrow 6) (figura 4A), substituída predominantemente em O-2 com α -D-manopiranosose (figura 4B) e em O-4 com β -D-galactopiranosose (figura 4C). A cadeia principal pode estar dissubstituída em O-2 e O-4 com α -D-manopiranosose e com β -D-glucopiranosose (figura 4D) (WORANOVICZ *et al.*, 1999). Também foi utilizada a galactomanana sulfatada quimicamente, que apresentava um grau de sulfatação (DS) de 1,29 (MARTINICHEN, 2001).

FIGURA 4 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA GALACTOGLUCOMANANA EXTRAÍDA DE *Cladonia ibitipocae* COM SUAS PROVÁVEIS RAMIFICAÇÕES.



OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi o de avaliar potenciais atividades biológicas de polímeros obtidos de líquens, sendo portanto objetivos específicos :

1. Avaliar a atividade antitumoral *in vivo* da α -glucana de *R. celastri* frente ao S-180, utilizando administrações do polissacarídeo em doses repetidas e em dias alternados.
2. Avaliar a influência da α -glucana de *R. celastri*, da GM e da GMS de *C. ibitipocae* na adesão de células HeLa sobre proteínas da matriz extracelular (laminina e fibronectina).
3. Avaliar a produção *in vitro* de H_2O_2 ocasionada pelo tratamento de macrófagos da cavidade peritoneal de camundongos com a α -glucana de *R. celastri*, GM de *C. ibitipocae* e seu derivado sulfatado quimicamente.
4. Avaliar os efeitos da α -glucana de *R. celastri* sobre macrófagos da cavidade peritoneal de camundongos tratados com o polímero quanto: atividade elicitora de células, produção de H_2O_2 , atividade fagocítica e produção de NO^\bullet .

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS E REAGENTES

Peroxidase (horseradish, tipo II), forbol 12-miristato, 13-acetato (PMA), naftiletilenodiamina, sulfanilamida, partículas de látex conjugadas com fluoresceína, albumina sérica bovina (BSA), fenilsulfonaftaleína (vermelho de fenol) e azul de Tripán foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (EUA). Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), tioglicolato de sódio, triton X-100, glucose e coomassie brilliant blue G-250 foram adquiridos da Merck do Brasil. As soluções dos reagentes foram preparadas com água bidestilada e autoclavadas quando necessário. As membranas de acetato de celulose com poros de 0,22 μm e os filtros descartáveis estéreis com membrana de acetato de celulose com poros de 0,22 μm foram adquiridos da Millipore e as placas de cultura utilizadas (6, 12 e 96 poços) foram da Corning.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Material de Vidro e Acessórios: Procedimentos de Esterilização

Todo material de vidro utilizado para os procedimentos de cultivo de células HeLa e cultura de macrófagos (garrafas de Roux, frascos de vidro para armazenamento de soluções, laminulas, frascos de vidro, equipamento para filtração sob pressão, rolhas, tampas, pipetas de vidro, ponteiros de pipetas automáticas) foram esterilizados em autoclave (Fanen) a 120°C, durante 30 minutos, a 1 atm.

3.2.2 Soluções Tampão e Meio de Cultura

3.2.2.1 Solução salina tamponada (PBS) sem cálcio e magnésio

A solução salina - fosfato tamponada (PBS), foi preparada como solução estoque (concentrada 5x) sendo, nestas condições, constituída de 680 mmol l⁻¹ de NaCl, 13,4 mmol l⁻¹ de KCl, 40,5 mmol l⁻¹ de Na₂HPO₄ e 7,3 mmol l⁻¹ de KH₂PO₄ e pH ajustado para 7,4. Esta solução foi esterilizada em autoclave (120°C, 1 atm, 30 min) e armazenada a 4°C. Para o uso, a solução foi diluída com água bidestilada estéril, recém-preparada em aparelho Corning Glass Work, modelo AG 10a.

3.2.2.2 Solução balanceada de Hank (HBSS)

A solução balanceada de Hank (HBSS), é constituída da mistura das soluções A e B, as quais são também preparadas como solução estoque (concentrada 20 x), e armazenada a 4°C. Para uso, as soluções A e B foram misturadas (1:1), diluídas com água bidestilada e o pH foi ajustado para 7,4. A solução de Hanks foi esterilizada por filtração em membranas estéreis com poros de 0,22 µm (Millipore®) em câmara de fluxo laminar vertical (VECO).

A solução A era constituída de 2,73 mol l⁻¹ de NaCl, 107 mmol l⁻¹ de KCl, 25 mmol l⁻¹ de CaCl₂ e 27 mmol l⁻¹ de MgSO₄ . 7 H₂O e a solução B por 8,5 mmol l⁻¹ de Na₂HPO₄, 8,8 mmol l⁻¹ de KH₂PO₄ e 111 mmol l⁻¹ de glicose. Ambas são dissolvidas em H₂O milliQ até um volume de 50 ml e armazenadas a 4°C.

3.2.2.3 Meio de cultura

O meio de cultura utilizado foi o meio essencial mínimo de Eagle (MEM – Laboratório Flow), que após a adequada reconstituição em água, foi esterilizado por filtração sob pressão (aparelho Sartorius com membrana de acetato-nitrato de celulose com poros de 0,22 µm da marca Zeiss ou Millipore®) e mantido a 4°C. Para os

experimentos, o MEM foi enriquecido com 10% (v/v) de soro fetal bovino estéril (Laborclin), previamente inativado a 56°C em banho-maria, por 30 minutos antes de sua utilização. O pH do meio foi ajustado com quantidades adequadas de solução de bicarbonato de sódio (7,5% (m/v)) estéril.

3.2.2.4 Solução de tripsina-EDTA

A solução de tripsina-EDTA é constituída de 137 mmol l⁻¹ de NaCl, 5,4 mmol l⁻¹ de KCl, 5 mmol l⁻¹ de glucose, 0,42 mmol l⁻¹ de Na₂HPO₄, 0,44 mmol l⁻¹ de KH₂PO₄, 2,3 mmol l⁻¹ de NaHCO₃, 0,53 mmol l⁻¹ de EDTA, 50 mg% de tripsina (1:250) e 2 mg% de vermelho de fenol, sendo o pH ajustado para 7,4. Quando destinada ao repique celular, esta solução foi esterilizada por filtração a vácuo e armazenada a - 20°C.

3.2.2.5 Soluções de polissacarídeos

As soluções de polissacarídeos preparadas em PBS como soluções concentradas, foram esterilizadas por filtração em membranas de acetato de celulose com poros de 0,22 µm (Millipore[®]) e armazenadas a -20°C. No momento do uso, as soluções foram diluídas adequadamente conforme as concentrações experimentais desejadas.

3.3 MÉTODOS GERAIS

3.3.1 Preparo da Solução de Fehling

A solução de Fehling foi preparada segundo JONES e STOODLEY e foi utilizada para precipitar polissacarídeos por complexação das hidroxilas vicinais do polímero com o cobre presente no reagente (JONES e STOODLEY, 1965). Esta solução é composta pelas soluções A e B, que são armazenadas separadamente e misturada numa proporção de 1:1 no momento do uso. A solução pronta é misturada com os extratos contendo os polissacarídeos a serem purificados em uma proporção também de 1:1.

A solução A é constituída por 34,65g de sulfato de cobre e a solução B é composta por 173 g de tartarato duplo de sódio e potássio (Sal de Rochelle) e 125 g de KOH, ambas preparadas num volume final de 500 ml de água destilada.

3.3.2 Dosagem de Proteínas

A determinação da concentração de proteínas contida em cada poço da placa de cultura em que foram realizados os experimentos de produção de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico por macrófagos tratados com polissacarídeos foi realizada utilizando-se o método de BRADFORD (1976). O método se baseia na ligação do corante Coomassie Brilliant Blue G-250 com moléculas de proteínas da amostra, formando um complexo de cor azul (COMPTOM e JONES, 1985).

Utilizou-se o protocolo original do método, com algumas modificações, conforme descrito. Inicialmente uma solução estoque foi preparada pela dissolução de 40 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 em 20 ml de etanol absoluto, seguindo-se a adição de 40 ml de ácido orto-fosfórico a 85% e água destilada até o volume de 100 ml. No momento do uso, a solução estoque foi diluída em água destilada (1:4, v/v), seguida de filtração por papel de filtro. Para a realização da análise, as

células aderidas nas placas de cultura foram lisadas com triton X-100 (0.05%) e adicionou-se 1 ml da solução de uso a 100 μ l da amostra contendo de 10 a 50 μ g de proteína, sendo o tubo branco constituído por 100 μ l de triton X-100 e 1 ml da solução de uso. A leitura espectrofotométrica foi feita a 595 nm, num período de 2 a 20 min após o início da reação. A concentração de proteínas das amostras desconhecidas foi calculada através de uma curva de calibração utilizando soro albumina bovina (BSA) preparada em triton X-100 (0,05%). Utilizando-se detergente na metodologia, a linearidade do método varia entre 10 e 60 μ g de proteína.

3.3.3 Dosagem de Carboidratos

As dosagens de carboidratos das soluções utilizadas para inoculação nos animais e para uso nas culturas de células, foram realizadas utilizando-se o método de DUBOIS e colaboradores (1956), também conhecido como método de fenol-ácido sulfúrico. O método consiste na formação dos derivados furfural e hidroximetilfurfural a partir de pentoses e hexoses, respectivamente, na presença de ácido sulfúrico, que reage com fenol formando um complexo de cor alaranjada. Foi seguido o protocolo original do método, onde se mistura 0,5 ml de amostra, 0,5 ml de solução de aquosa de fenol 5% (p/v) e 2,5 ml de ácido sulfúrico concentrado. A solução foi agitada e, após resfriamento, foi realizada a leitura espectrofotométrica a 490 nm. Os cálculos de concentração foram feitos através de curva de calibração utilizando glucose como solução padrão.

3.4 α -GLUCANA DO LÍQUEN *Ramalina celastri*

3.4.1 Coleta do Líquen

O líquen *Ramalina celastri* (Sprengel) Krog & Swinscow foi coletado na região de Curitiba (no bairro Jardim Social e no Centro Politécnico da UFPR), foi

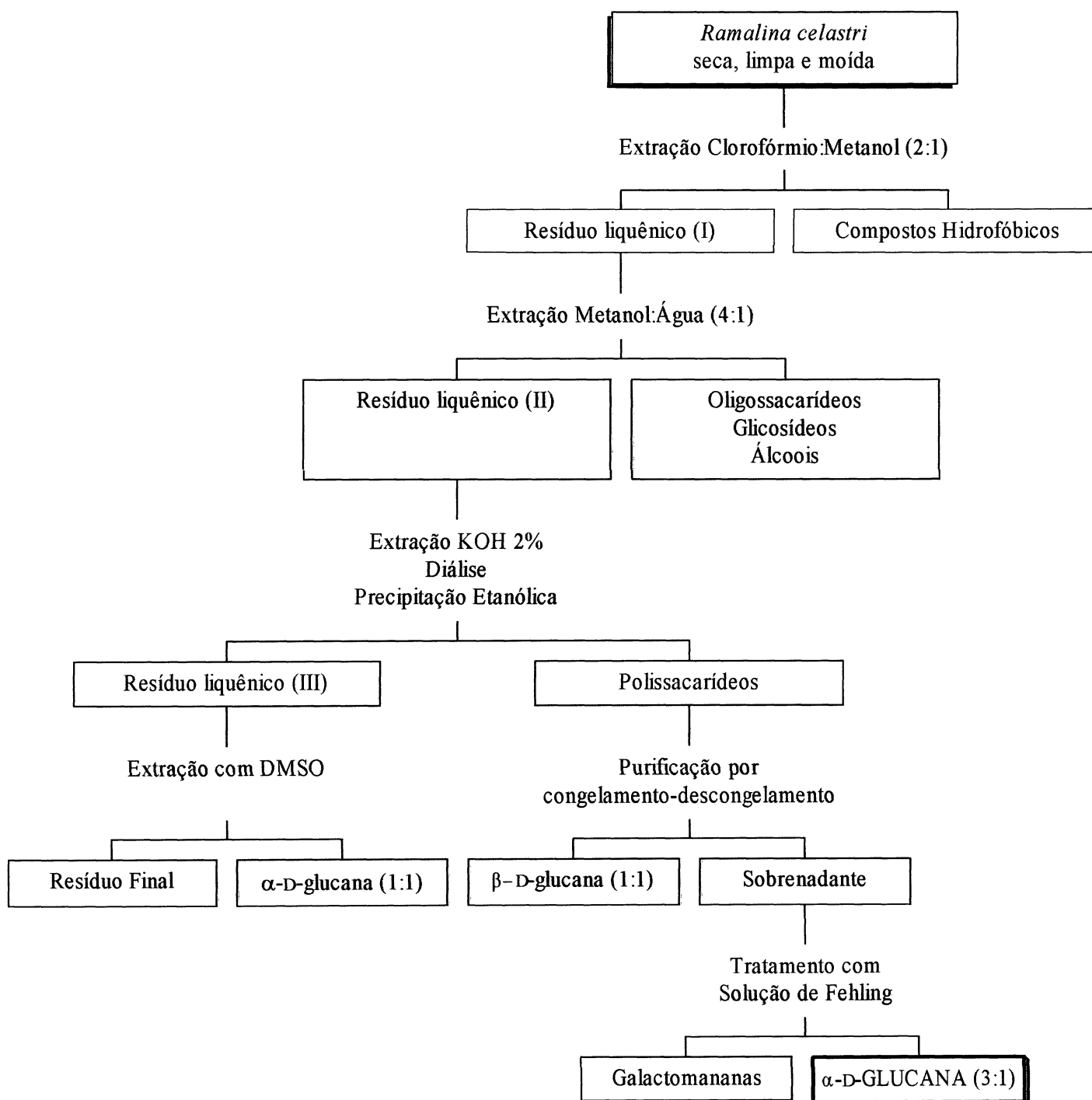
identificado pelo Prof. Marcelo Marcelli, do Instituto de Botânica, São Paulo, e está depositado no Herbário Municipal de Curitiba, com o n° 30911. Este líquen é encontrado nas porções mais elevadas dos troncos das árvores e em seus ramos mais altos, sendo caracterizado por possuir talo arbustivo, sólido e corticóide, ramos lanceolados desprovidos de sorédios, apresentando ascósporos fusiformes e ausência de substâncias medulares. Esta espécie foi chamada também de *Ramalina ecklonii*, *R. lanceolata*, *R. pellucida*, mas em 1993 foram identificadas como *R. celastri* (KASHIWADANI e KALB, 1993). Após a coleta, o líquen foi limpo manualmente para a retirada de musgos, cascas de árvores, terra e outros líquens e moído em Moinho Willey malha n°20, fornecendo um pó seco, que foi então submetido ao processo de extração.

3.4.2 Extração e Purificação dos Polissacarídeos

O líquen seco e moído foi extraído com clorofórmio:metanol (2:1, v/v) a 60°C por 2 horas, seguido pelo refluxo em metanol 80% a 60°C por 3 horas. Após filtração em tecido sintético, o líquen residual foi então tratado duas vezes com solução aquosa de hidróxido de potássio (KOH) 2% (p/v) a 100°C por 2 horas. O extrato foi filtrado em tecido sintético, neutralizado até pH 7,0 com ácido acético glacial e dialisado contra água corrente por 48 horas. O extrato bruto obtido foi evaporado em rotaevaporador (Fisatom, mod. 802) até pequeno volume e, então, foi parcialmente purificado por um processo sucessivo de congelamento e descongelamento, resultando em um precipitado insolúvel em água, que foi centrifugado e identificado por GC-MS, RMN-C¹³ e RMN-H¹ com uma mistura de α -glucana (1→3), (1→4) em uma proporção 1:1 e uma β -glucana (1→3). O sobrenadante deste processo foi evaporado a pequeno volume (aproximadamente 30 ml). Adicionou-se então a solução de Fehling (60 ml) e o precipitado resultante foi separado por centrifugação e identificado por GC-MS, RMN-C¹³ e RMN-H¹ como uma galactomanana. O sobrenadante resultante da precipitação com solução de

Fehling foi exaustivamente dialisado contra água corrente e deionizado com resina trocadora de íons mista. A solução foi então evaporada a pequeno volume, congelada e liofilizada. A análise desta fração por GC-MS, RMN-C¹³ e RMN-H¹ demonstrou a presença da α -glucana (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4) numa proporção 3:1, a qual foi utilizada neste trabalho (STUELP *et al.*, 1999). A figura 5 mostra o esquema deste procedimento.

FIGURA 5 - FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO E OBTENÇÃO DA α -D-GLUCANA (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4) (1:3) DE *Ramalina celastri*



3.5 GALACTOMANANA DO LÍQUEN *Cladonia ibitipocae*

A galactomanana nativa de *Cladonia ibitipocae* foi isolada e caracterizada por WORANOVICZ-BARREIRA *et al.* (1999). O derivado sulfatado deste polímero foi preparado por MARTINICHEN (2001) e gentilmente cedido para este trabalho.

3.6 ANIMAIS

Camundongos albinos suíços *Mus musculus* fêmeas, com 6 a 8 semanas de idade utilizados nos experimentos envolvendo diferentes efeitos sobre macrófagos e nos experimentos de atividade antitumoral, foram obtidos no Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Os animais foram alimentados com ração Purina® e água “ad libidum”.

3.7 CÉLULAS

3.7.1 Sarcoma 180 (S-180): manutenção da linhagem

As células do S-180 foram obtidas do Instituto Nacional do Câncer, RJ, e foram mantidas na forma de tumores ascíticos em camundongos albinos suíços fêmeas, com idade entre 45 e 60 dias e peso médio de 30,0 g. Para a manutenção da linhagem, eram feitos repiques intraperitoneais semanais como descrito por YAMADA e colaboradores (1984). Resumidamente, sete dias após o repique das células, os animais portadores do S-180 na forma ascítica eram sacrificados por anestesia com éter, o líquido ascítico aspirado e mantido em gelo. As células tumorais eram contadas e sua viabilidade estimada pelo método de exclusão do corante azul de Trypan (PHILLIPS, 1973). A contagem das células foi feita em hemocítmetro de Neubauer e o percentual de viabilidade foi calculado pela fórmula:

$$CV (\%) = 100 \times (NC/NC + C)$$

Onde: CV, células viáveis; NC, células não coradas; C, células coradas.

Após o ajuste do número de células da suspensão para 10^6 células.ml⁻¹ com solução salina-fosfato tamponada (PBS) estéril, camundongos fêmeas adultas eram inoculadas intraperitonealmente com 1 ml desta suspensão celular, mantendo-se, desta forma, a linhagem (figura 7).

3.7.2 Células HeLa

Células HeLa provenientes da ATCC (“American Type Cell Collection”) e obtidas do Instituto Adolfo Lutz, SP, foram mantidas no Laboratório de Cultivo Celular do Departamento de Bioquímica da UFPR, utilizando meio mínimo essencial de Eagle (MME) acrescido de soro fetal bovino (10%, v/v) para o cultivo dessas células (meio de crescimento – MC). O pH deste meio foi ajustado para aproximadamente 7,4 pela adição de bicarbonato de sódio 7,5% (p/v) e nenhum antibiótico foi adicionado. Para o procedimento de repique, o MC sobrenadante às monocamadas foi descartado e as monocamadas confluentes foram descoladas das garrafas de crescimento (garrafas de Roux) por tratamento com solução de tripsina-EDTA. Com o início do descolamento das células, a solução de tripsina era descartada e as células eram lavadas e desagregadas com MC. As células eram então repicadas em novas garrafas de cultura ($\sim 2,0 \times 10^6$ células por garrafa) e crescidas em estufa a 37°C (BASTOS *et al.*, 1990).

3.7.3 Macrófagos

Para obtenção dos macrófagos da cavidade peritoneal de camundongos, os animais foram inoculados intraperitonealmente com 5 ml de PBS estéril. Após massagem vigorosa, o líquido da cavidade foi aspirado e centrifugado (3.500 rpm,

5 min), o “pellet” foi lavado e novamente centrifugado (3.500 rpm, 5 min) por duas vezes com PBS (4° C) e as células assim obtidas foram ressuspensas em HBSS (solução salina tamponada de Hank). A contagem do número de células foi feita usando um hemocitômetro de Neubauer e, então, as células foram plaqueadas em placas de cultura de 6, 12 ou 96 poços, conforme o experimento a ser realizado. Depois de duas horas a 37°C, em uma atmosfera de 5% de CO₂, as células foram lavadas 3 vezes com PBS pré-aquecido a 37°C para remover as células não aderidas. Segundo HAWORTH E GORDON (1998), seguindo este método mais de 90% das células aderentes são macrófagos, não sendo necessário purificação posterior da preparação.

3.8 TESTES DE ATIVIDADE BIOLÓGICA

3.8.1 Atividade Antitumoral de Polissacarídeos contra o S-180

Os ensaios de atividade antitumoral foram realizados de acordo com MIZUNO *et al.* (1986) (figura 6). Os testes foram realizados por inoculação subcutânea da forma tumoral ascítica ($5,0 \times 10^6$ células) na região dorsal da pata dianteira direita dos animais, onde ocorreu o desenvolvimento de uma massa tumoral sólida. Para tanto, as células tumorais na forma ascítica foram aspiradas da cavidade peritoneal do camundongo sacrificado, centrifugadas (3000 rpm, 5 min.) e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas em PBS, e a viabilidade celular da preparação foi determinada. Após a contagem, a concentração de células viáveis foi ajustada para 5×10^7 células.ml⁻¹ e um volume de 0,1 ml desta suspensão foi inoculado subcutaneamente na região dorsal da pata direita de cada animal.

A atividade antitumoral de α -glucana extraída de *Ramalina celastri* frente a forma sólida do S-180 foi avaliada segundo o seguinte protocolo experimental: o sarcoma foi implantado subcutaneamente na região dorsal do camundongo no dia 0 e os animais foram tratados com 200 mg.kg⁻¹ do polissacarídeo 1, 7 e 14 dias após o

implante por injeção intraperitoneal. Como grupo controle, os animais foram tratados com solução salina e, como controle positivo, os animais foram tratados com o agente quimioterápico 5-fluorouracil (5-FU, 10 mg.kg⁻¹), seguindo o protocolo experimental utilizado para o tratamento com o polissacarídeo. Em todos os casos, os tumores desenvolvidos foram medidos a cada 7 dias após a implantação, até um tempo máximo de 35 dias, após o que, os animais foram sacrificados por anestesia com éter. Os tumores foram dissecados e pesados para avaliação da taxa de inibição do crescimento tumoral, que foi avaliada como descrito por KOJIMA e colaboradores (1986), pela relação matemática:

$$\% \text{ inibição} = 100 (A - B)/A$$

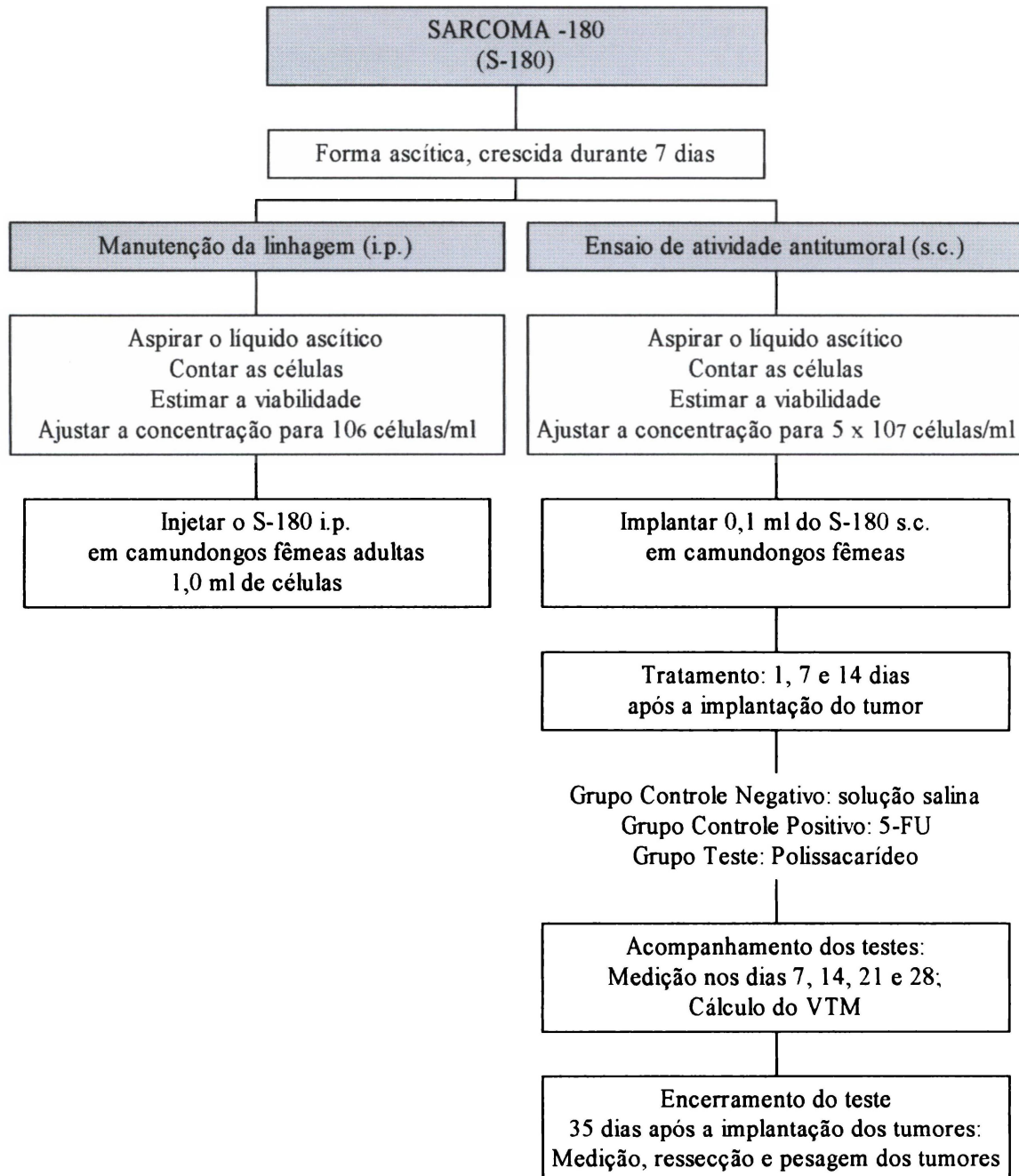
onde A é o peso tumoral médio do grupo controle e B é aquele do grupo tratado.

As medidas perpendiculares dos tumores foram utilizadas para o cálculo do volume tumoral médio (VTM) através da fórmula:

$$\text{VTM} = C (L)^2/2$$

onde VTM é o volume tumoral médio (mm³); C é o comprimento e L é a largura da massa tumoral (mm).

FIGURA 6 – MANUTENÇÃO DA LINHAGEM TUMORAL E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE POLISSACARÍDEOS UTILIZANDO COMO MODELO O SARCOMA-180



3.8.2 Efeito dos Polissacarídeos sobre Macrófagos

Os animais utilizados nos experimentos foram sacrificados por anestesia com éter e as células da cavidade peritoneal (PEC) foram isoladas e plaqueadas para a avaliação da produção de H_2O_2 , produção de NO^* e atividade fagocítica.

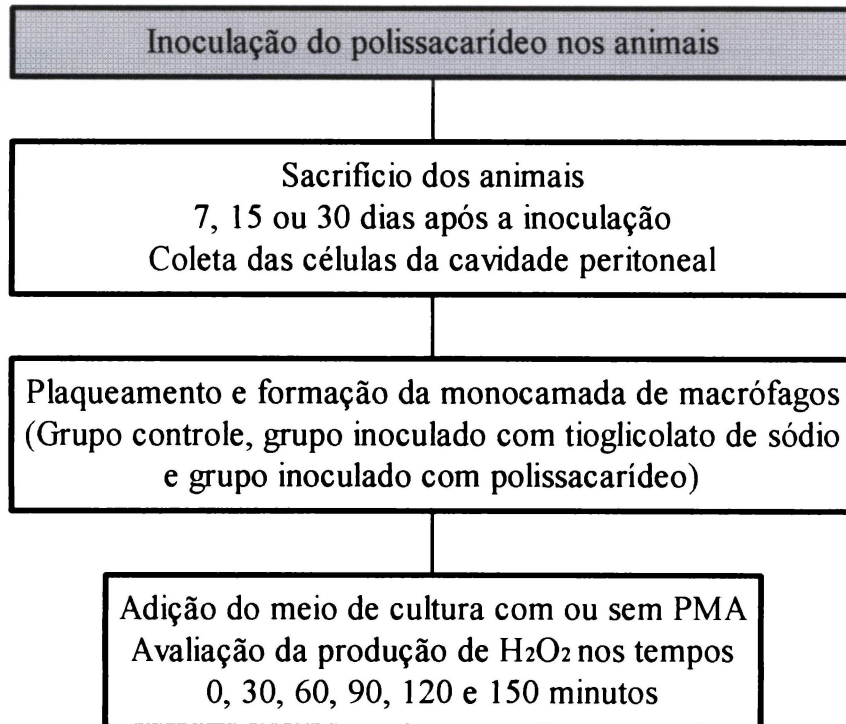
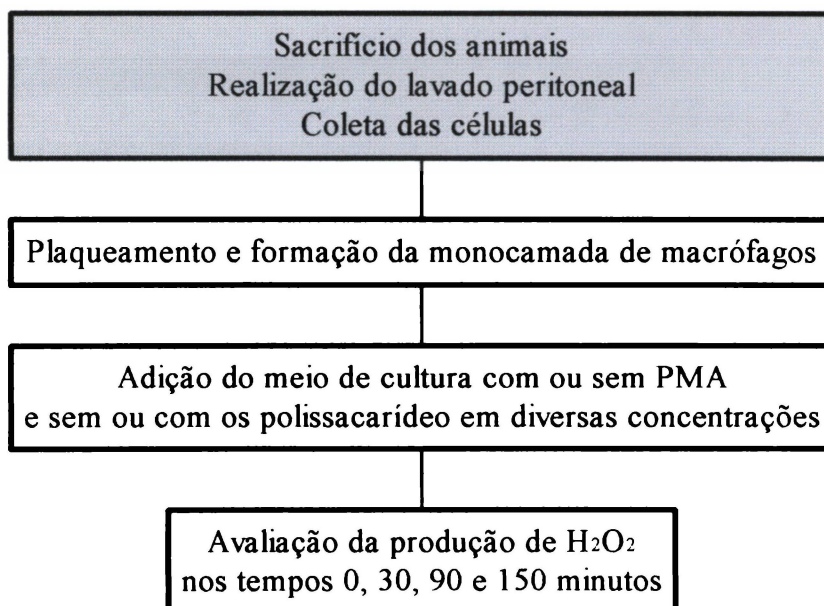
3.8.2.1 Produção de peróxido de hidrogênio

A produção de H_2O_2 foi avaliada *in vivo* e *in vitro* e o procedimento está esquematizado na figura 7. Para os experimentos *in vivo*, a α -glucana de *R. celastri* foi inoculada nos animais, os macrófagos da cavidade peritoneal foram coletados em diferentes tempos após a inoculação do polímero e a produção de H_2O_2 foi avaliada. Nos testes *in vitro*, a α -glucana de *Ramalina celastri* ou a galactomanana sulfatada de *Cladonia ibitipocae* foram adicionadas às culturas de macrófagos, que foram obtidos de animais não tratados, para a verificação da produção de H_2O_2 .

Nos testes *in vivo*, a α -glucana de *R. celastri* (200 mg/kg) foi inoculada intraperitonealmente em camundongos e os macrófagos da cavidade peritoneal foram coletados 7 dias após o tratamento. Outro grupo de animais tratados foi sacrificado aos 15 e 30 dias após a inoculação das soluções. A cada tempo, os macrófagos foram coletados e plaqueados como já descrito (item 3.7.3), utilizando 5×10^6 células por poço, em placas de cultura de 6 poços. Nos grupos controle e controle positivo, os animais foram inoculados com solução salina e com solução de tioglicolato de sódio (20 mg.kg^{-1} , 0,2 ml por animal), respectivamente, sendo adotados os mesmos procedimentos utilizados com os grupos testes. O método de quantificação da produção de H_2O_2 foi baseado na técnica descrita por PICK e KEISARI (1980), que utiliza a oxidação do vermelho de fenol pelo H_2O_2 , dependente de peroxidase. Vermelho de fenol (fenilsulfonaftaleína, 194 mg/l) e peroxidase (horseradish, tipo II, sigma, 19 U/ml) foram dissolvidos em HBSS. Esta solução, acrescida ou não de PMA (forbol 12-miristato 13-acetato, $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$), foi adicionada às monocamadas de macrófagos. Alíquotas de 1 ml foram então retiradas de cada poço a cada 30 min e a

produção de H_2O_2 foi acompanhada ao longo do tempo de incubação máximo de 150 min. A cada alíquota adicionou-se 10 μ l de NaOH 1M. Após centrifugação, as absorbâncias de cada amostra foram medidas a 610 nm. As células das placas de cultura foram lavadas com PBS, lisadas com 1 ml do detergente Triton X-100 a 0,05% e a concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford, conforme descrito no item 3.3.2. Os resultados foram expressos como nmoles de H_2O_2 produzidos. mg^{-1} de proteína celular (TOKURA *et al.*, 1987).

Nos testes *in vitro*, a produção de H_2O_2 foi realizada avaliando-se o efeito frente a diferentes concentrações de α -glucana de *R. celastri* e a galactomanana sulfatada de *C. ibitipocae*. Para tanto, 8 a 10 animais foram sacrificados por anestesia com éter, as células da cavidade peritoneal foram coletadas e plaqueadas em placas de cultura de 12 poços (2×10^6 células por poço), conforme descrito no item 3.7.3. Às células aderidas, adicionou-se o meio de cultura para teste, que consistia de vermelho de fenol e peroxidase, acrescidos ou não de PMA, e polissacarídeo nas concentrações de 100, 500 e 1000 μ g. ml^{-1} para α -glucana de *R. celastri* e 10, 50 e 100 μ g. ml^{-1} para a galactomanana sulfatada de *C. ibitipocae*. Nos tempos 0, 30, 90 e 150 minutos foram retiradas alíquotas de 1,0 ml para a quantificação do H_2O_2 produzido *in vitro*, que foi realizada conforme metodologia descrita por PICK e KEISARI (1980).

FIGURA 7 – ESQUEMA EXPERIMENTAL DA INFLUÊNCIA *IN VIVO* (A) E *IN VITRO* (B) DO POLISSACARÍDEO NA PRODUÇÃO DE H₂O₂ POR MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGOS(A) TESTE *IN VIVO*:(B) TESTE *IN VITRO*

3.8.2.2 Atividade fagocítica

A atividade fagocítica foi avaliada segundo o método descrito por POPOV e colaboradores (1999) com pequenas modificações. Para estes experimentos utilizou-se macrófagos de animais tratados com α -glucana de *R. celastri* (200 mg/kg), por 7, 15 ou 30 dias e animais inoculados com solução salina (controle). A monocamada de macrófagos (3×10^6 células por poço) foi incubada com 5 μ l de partículas de látex conjugadas com fluoresceína, diluídas em 1,5 ml de MEM a 37°C por 4 horas, em uma atmosfera de 5% de CO₂. As monocamadas foram lavadas 5 vezes com PBS à 37°C para remover quaisquer partículas de látex não fagocitadas. As células foram então lisadas e a intensidade de fluorescência medida em um fluorímetro (Aminco) com excitação em 485 nm e emissão em 540 nm. Foram realizados experimentos controles, onde as células foram fixadas por 10 minutos com metanol gelado, previamente à adição das partículas de látex fluorescente. O valor de fluorescência obtido nestes poços foi então descontado daqueles observados nos poços com as células viáveis.

3.8.2.3 Produção de óxido nítrico

A produção de NO[•] foi determinada pela quantificação de nitrito nos sobrenadantes das culturas de macrófagos isolados de camundongos inoculados com α -glucana de *Ramalina celastri* (7, 15 e 30 dias) (REMENTERÍA *et al.*, 1997). A monocamada de macrófagos (5×10^5 células/poço, placa de 96 poços) foi incubada por 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, na presença ou ausência de LPS (25 ng.ml⁻¹) e IFN- γ (26 U.ml⁻¹). Após a incubação, 100 μ l do sobrenadante das culturas foi misturado com igual volume de Reagente de Griess, incubado por 10 minutos a temperatura ambiente e a absorbância foi medida em 550 nm, em leitor de microplaca (Benchmark, Biorad), utilizando uma curva padrão de NaNO₂ (0-25 μ M) para quantificação.

O Reagente de Griess é constituído por duas soluções, A e B, que devem ser misturadas 1:1 no momento do uso. A solução A consiste de 0,5g% de

naftiletilenodiamina em ácido fosfórico 2,5% e a solução B é constituída de 1g% de sulfanilamida em ácido fosfórico 2,5% (HAWORTH e GORDON, 1998).

3.8.2.4 Determinação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT (REILLY *et al.*, 1998; KIHU *et al.*, 1992; SLADOWSKI *et al.*, 1993). A reação de redução do MTT decorrente da atividade respiratória de células viáveis, produz um sal de formazan insolúvel em água (cor avermelhada) que deve ser solubilizado para posterior quantificação por espectrofotometria. A concentração do produto colorido é proporcional ao número de células viáveis.

A monocamada de macrófagos (5×10^5 células/poço), obtida como anteriormente descrito (item 3.7.3), foi incubada por 3 horas a 37°C e 5% CO₂ com α -glucana de *R. celastri*, ou galactomanana sulfatada de *C. ibitipocae*, nas concentrações de 100, 200 e 500 μ g/ml. As células foram lavadas com PBS e então adicionou-se 100 μ l de MEM e 20 μ l de MTT (5mg/ml), seguindo-se de incubação por 4 horas. Após este tempo, o meio de reação foi removido e o precipitado de formazan resultante da redução do MTT, foi solubilizado com 100 μ l de DMSO. A leitura das absorbâncias foi realizada em leitor de microplaca (Benchmark, Biorad), a 550 nm (REILLY *et al.*, 1998; KIHU *et al.*, 1992).

3.8.3 Adesão de Células HeLa às Moléculas da Matriz Extracelular

As moléculas de matriz extracelular – laminina e fibronectina – utilizadas no presente trabalho foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga, do Departamento de Biologia Celular da UFPR. Os experimentos de adesão frente a estas proteínas foram realizados segundo a metodologia descrita por TARABOLETTI e colaboradores (1993), utilizando a α -glucana de *Ramalina celastri* e a galactomanana sulfatada de *Cladonia ibitipocae*. Previamente à realização dos ensaios, placas de cultura de 96 poços foram tratadas com a proteína da matriz extracelular (PME)

específica, numa concentração de $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Os poços branco e controle negativo não receberam as proteínas de matriz. Após 12 h a 4°C em câmara úmida, os poços foram lavados 3 vezes com solução PBS estéril, à 25°C . A seguir, os sítios dos poços onde não havia PME foram bloqueados pelo tratamento com solução de BSA 1% por 1 h a 37°C , em estufa com atmosfera de 5% de CO_2 e então, as placas foram lavadas com PBS. Uma suspensão de células HeLa foi preparada em meio MEM sem soro fetal bovino, da qual alíquotas de $50 \mu\text{l}$ foram retiradas e colocadas nos poços de forma a se obter 1×10^5 células/poço. Imediatamente, adicionou-se $50 \mu\text{l}$ das soluções dos polissacarídeos a serem testados, de forma a se obter as concentrações finais de 10, 40, 80, 160 e $320 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Após 2 h, as células não aderidas foram aspiradas e as placas foram lavadas cuidadosamente 3 x com PBS a 37°C . A camada de células aderidas foi fixada por 10 min com metanol, novamente lavadas com PBS (3x) e então coradas com cristal violeta (0,2% em etanol 2%) por 5 min. Após este tempo, os poços foram lavados por 10 x sucessivas utilizando solução PBS, após o que as células foram lisadas com solução de citrato de sódio $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ e etanol (1:1). A absorbância foi medida em leitor de microplaca a 550 nm (Benchmark, Biorad), sendo o branco constituído pela solução de lise. O controle negativo do experimento era constituído de células aderidas aos poços da placa de cultivo não tratados com as proteínas da matriz extracelular.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

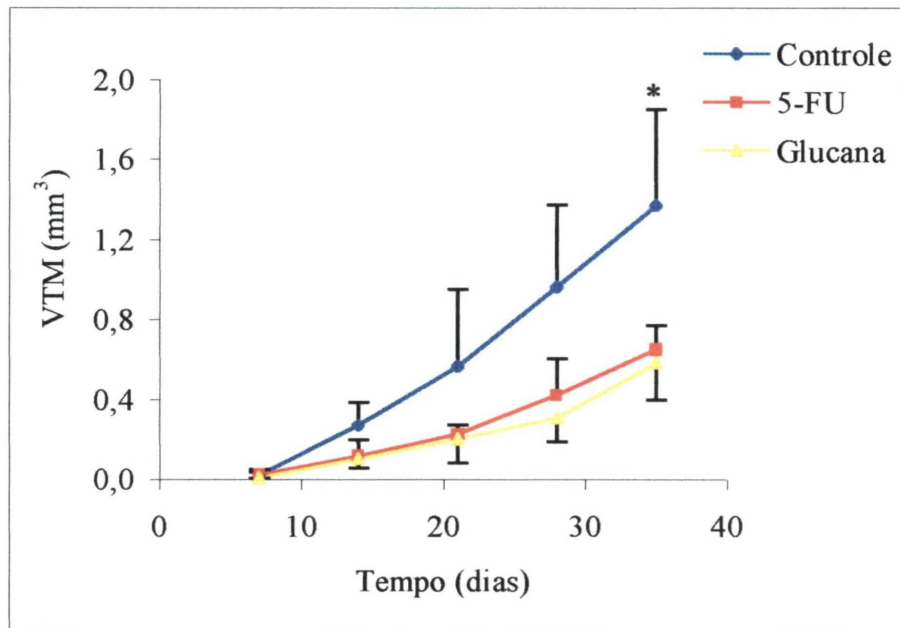
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ATIVIDADE ANTITUMORAL

Estudos prévios desenvolvidos por CARNEIRO-LEÃO (1998) indicaram que a α -glucana de *R. celastri* apresentava atividade contra células de S-180. Nas condições experimentais utilizadas pela autora, o polissacarídeo administrado em dose única de 200 mg.kg^{-1} , 24 h após a implantação do tumor, promovia uma inibição do crescimento tumoral de aproximadamente 80%, resultado que de acordo com MIZUNO *et al.* (1986) foi classificado como “notavelmente efetivo”.

Considerando a possibilidade de que a administração de doses repetidas do polissacarídeo poderia melhorar a resposta do animal frente ao S-180, um outro protocolo de tratamento foi desenvolvido no presente trabalho, no qual 200 mg.kg^{-1} de α -glucana foram inoculados por i.p. nos animais, em doses repetidas e a intervalos regulares (1, 7 e 14 dias), após a implantação da forma sólida do S-180. Dois grupos de animais controle foram incluídos, os quais foram tratados com solução salina (grupo controle negativo) ou com 5-fluorouracil (5-FU) (1 mg.kg^{-1}), um quimioterápico empregado clinicamente contra vários tipos de tumores (WEISS, 1993).

A figura 8 e a tabela 3 apresentam os resultados de tais experimentos. Verifica-se a redução do desenvolvimento tumoral no grupo de animais tratados com 5-FU e com a α -glucana. Em ambos os casos, o desenvolvimento da forma sólida do tumor foi aproximadamente 60% inferior em relação aos animais do grupo controle tratados apenas com solução salina. Vale destacar ainda que dois animais do grupo de oito tratados com 5-FU e dois animais do grupo de sete tratados com o polissacarídeo apresentaram inibição completa do crescimento tumoral, sugerindo uma boa eficácia do polímero, comparável com aquela exibida por um quimioterápico considerado clássico.

FIGURA 8 – PERFIL DO CRESCIMENTO DO S-180 EM ANIMAIS TRATADOS COM α -GLUCANA DE *R. celastri*

O polissacarídeo (200 mg.kg^{-1}) foi administrado intraperitonealmente nos dias 1, 7 e 14 após a implantação do tumor. Para o grupo controle foram utilizados 10 animais, para o grupo tratado com 5-FU, 8 animais e para o grupo tratado com α -glucana, 7 animais. Os resultados foram obtidos com a medida do tumor a cada 7 dias. O volume tumoral médio (VTM) foi calculado pela fórmula: $\text{VTM} = C (L)^2/2$, onde C: comprimento da massa tumoral (mm) e L: largura da massa tumoral (mm). *: diferença significativa do grupo teste com relação ao grupo controle pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

TABELA 3 – ATIVIDADE ANTITUMORAL DE α -GLUCANA DE *R. celastri* CONTRA S-180

Grupo	Vtm ₃₅ (mm ³ ; X \pm sd)	Peso Tumoral (g; X \pm sd)	Inibição Tumoral (%)	Completa Regressão
Controle negativo	1,37 \pm 0,48	2,46 \pm 0,75	-	0/10
Controle positivo	0,65 \pm 0,12	1,80 \pm 0,24	49,7	2/8
Glucana	0,58 \pm 0,18	1,04 \pm 0,13	57,5	2/7

Os resultados foram obtidos após 35 dias. X: média, sd: desvio padrão, VTM₃₅: volume tumoral médio após 35 dias, completa regressão: animais sem tumor no final do experimento/total de animais usados no experimento, controle negativo: animais inoculados com solução salina, controle positivo: animais inoculados com 5-fluorouracil (1 mg.kg^{-1}).

Embora o protocolo utilizado não tenha promovido melhoria na qualidade da resposta descrita anteriormente por CARNEIRO LEÃO (1998), os resultados confirmam o efeito antitumoral da α -glucana de *R. celastri*, sendo que o tratamento por doses repetidas de 200 mg.kg⁻¹ pode ser classificado como “efetivo” segundo os critérios estabelecidos por MIZUNO *et al.* (1986).

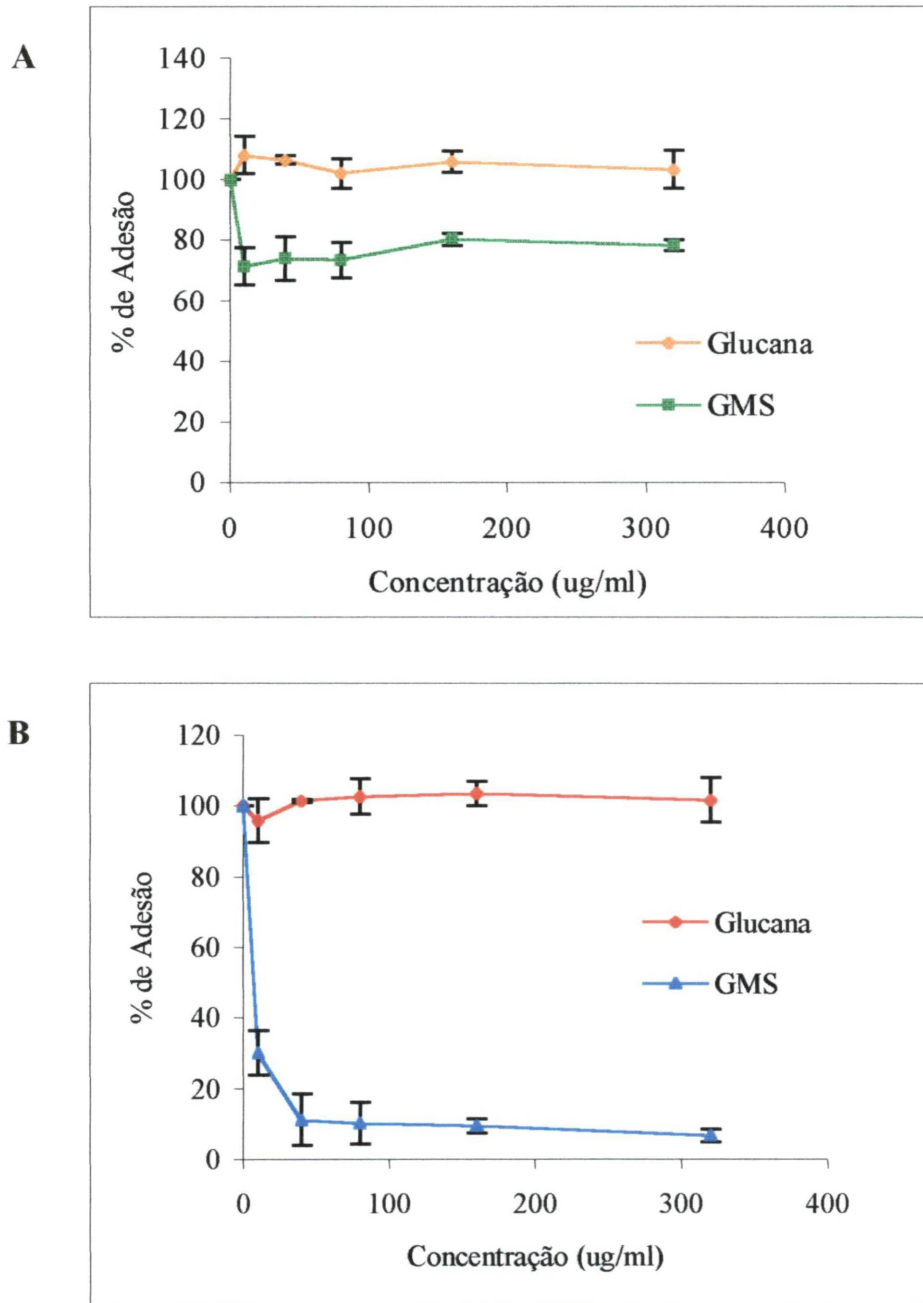
Protocolos de tratamento por doses fracionadas, em dias consecutivos ou alternados, têm sido utilizados por alguns autores (SASAKI *et al.*, 1983; KIHIO *et al.*, 1989). Neste aspecto, os resultados alcançados com a α -glucana de *R. celastri* quanto a inibição do desenvolvimento do S-180, foram similares àqueles observados para uma (1→3)- α -D-glucana linear extraída do cogumelo *Agrocybe cylindracea*, na dose fracionada de 10 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ (KIHIO *et al.*, 1989). Por outro lado, uma (1→3)- β -D-glucana extraída da bactéria *Alcaligenes faecalis*, nas doses de 10 e 30 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ apresentou uma inibição do desenvolvimento dos tumores de S-180 em 43 e 13%, respectivamente (SASAKI *et al.*, 1983). Desta forma os resultados sugerem que a utilização de uma dose maciça única de polissacarídeo parece ser mais eficaz do que a sua administração repetida a intervalos regulares ou ainda o seu fracionamento em doses menores associado a uma administração prolongada.

Algumas possibilidades podem ser levadas em consideração para explicar o efeito da α -glucana de *R. celastri*. Uma delas seria que, devido a administração do polímero 24 horas após a inoculação das células tumorais no animal, a implantação destas poderia estar sendo impedida pelo polissacarídeo, por exemplo por uma interferência em componentes da matriz extracelular. A adesão celular é um fator crucial no desenvolvimento de células individuais nos tecidos animais, portanto a habilidade de células cancerosas aderirem às moléculas da matriz extracelular desempenha uma função decisiva no desenvolvimento tumoral e de metástases (LIU *et al.*, 2000). Diferentes mecanismos regulam a adesão de células à moléculas de matriz extracelular e, agentes que interfiram nesta interação, poderiam modular os processos de invasão e migração celular, dependendo da molécula de matriz envolvida (VACCARI *et al.*, 2000). Neste aspecto, vale destacar os efeitos de CARNEIRO

LEÃO *et al.* (1997) obtidos com células HeLa, mostrando que a presença desta α -glucana, embora não impeça a formação de monocamadas, leva a um sofrimento celular que, embora discreto, sugere uma interferência do polímero na adesão das células à proteínas da matriz extracelular.

Com a finalidade de avaliar tal possibilidade, experimentos utilizando como modelo a adesão de células HeLa à laminina e fibronectina foram desenvolvidos. Além da α -glucana foi testado também a galactoglucomanana isolada do líquen *C. ibitipocae* e sulfatada quimicamente, visto que polímeros sulfatados são descritos interferir na adesão celular (SOEDA *et al.*, 1994; ROCHA *et al.*, 2001; STEVAN, 2001). Os resultados destes experimentos estão mostrados na figura 9 e na tabela 4, onde se verifica que a α -glucana não interfere na adesão de células HeLa tanto em relação à fibronectina, como em relação à laminina. Por outro lado, a GMS diminui a adesão celular na fibronectina em aproximadamente 25%, sendo que a menor dose utilizada do polímero já foi suficiente para causar o efeito máximo obtido. A interferência de polissacarídeos sulfatados na adesão de células sobre várias moléculas de matriz extracelular tem sido discutida por vários autores (MISHIMA *et al.*, 1998; LIU *et al.*, 2000; ROCHA *et al.*, 2001). STEVAN (2002) demonstrou que fucanas obtidas da alga *Sargassum stenophyllum* com variadas densidades de carga também não apresentam um efeito pronunciado na interação das células HeLa com fibronectina. Da mesma forma, SOEDA e colaboradores (1994), mostraram que fucanas sulfatadas e supersulfatadas não interferem na adesão de células 3LL com fibronectina. Porém, ROCHA e colaboradores (2001) mostraram que o tratamento de células CHO-K1 e CHO-745 com fucanas de alga parda extraída de *Spatoglossum schröderi* promoveram inibição na adesão nesta proteína de matriz.

FIGURA 9 – EFEITO DA α -GLUCANA DE *R. celandri* E DA GALACTOMANANA DE *C. ibitipocae* SULFATADA QUIMICAMENTE (GMS) NA ADESÃO DE CÉLULAS HeLa SOBRE AS PROTEÍNAS DE MATRIZ EXTRACELULAR FIBRONECTINA (A) E LAMININA (B)



Células HeLa (1×10^5 células/poço) foram colocadas para aderir em placas de cultura pré-tratadas com fibronectina ou laminina, na concentração de $10 \mu\text{g/ml}$. Os polissacarídeos foram utilizados nas concentrações indicadas. Controle (células aderentes na ausência de polissacarídeo) corresponde a 100% de adesão. Os resultados correspondem a média \pm desvio padrão de 3 experimentos independentes; $p < 0,05$

TABELA 4 – EFEITO DA α -GLUCANA DE *R. celastri* E DA GALACTOMANANA SULFATADA (GMS) DE *C. ibitipocae* NA ADESÃO DE CÉLULAS HeLa SOBRE AS PROTEÍNAS DE MATRIZ EXTRACELULAR LAMININA E FIBRONECTINA

CONCENTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEO ($\mu\text{g/ml}$)	% ADESÃO			
	FIBRONECTINA		LAMININA	
	α -GLUCANA	GMS	α -GLUCANA	GMS
10	108,18 \pm 5,34	71,31 \pm 7,22	95,89 \pm 6,20	30,11 \pm 6,22
40	106,57 \pm 1,24	74,04 \pm 5,23	101,56 \pm 0,49	11,19 \pm 7,23
80	102,09 \pm 5,61	73,40 \pm 6,89	102,72 \pm 4,99	10,24 \pm 5,89
160	105,93 \pm 4,96	80,29 \pm 0,96	103,50 \pm 3,51	9,48 \pm 1,96
320	103,37 \pm 6,88	78,21 \pm 2,59	101,81 \pm 6,28	6,77 \pm 1,88

Os valores estão expressos em % de adesão, considerando as células sem tratamento (grupo controle) como 100%.

Em contraste, quando a molécula de matriz utilizada foi a laminina, 40 $\mu\text{g/ml}$ de GMS inibiu a adesão celular em aproximadamente 90%. Resultados semelhantes foram obtidos por STEVAN (2002) para frações parcialmente hidrolisadas e posteriormente carboxirreduzidas e sulfatadas de uma fucana complexa extraída da alga *Sargassum stenophyllum*, as quais apresentaram um efeito antiproliferativo *in vitro* sobre células HeLa.

De modo semelhante, galactanas e fucanas sulfatadas e fucanas supersulfatadas foram ativas na inibição da adesão de células de adenocarcinoma mamário sobre laminina, sendo o primeiro polímero o mais efetivo (LIU *et al.*, 2000). Porém, quando foram introduzidos grupos amônio que são carregados positivamente e, portanto, diminuem a densidade de carga do polímero, nas fucanas supersulfatadas, ocorreu um aumento na adesão de células 3LL sobre a matriz formada por um peptídeo extraído de uma das cadeias da laminina (SOEDA *et al.*, 1994). Dessa forma, os resultados sugerem que esta atividade inibitória depende da densidade de carga relacionada com os grupos sulfato, a massa molecular e a composição monossacarídica do polímero. A maioria dos resultados relatados em literatura com relação a interferência de polissacarídeos sulfatados na adesão de células está relacionado com a

laminina (SOEDA *et al.*, 1994; MISHIMA *et al.*, 1998; LIU *et al.*, 2000).

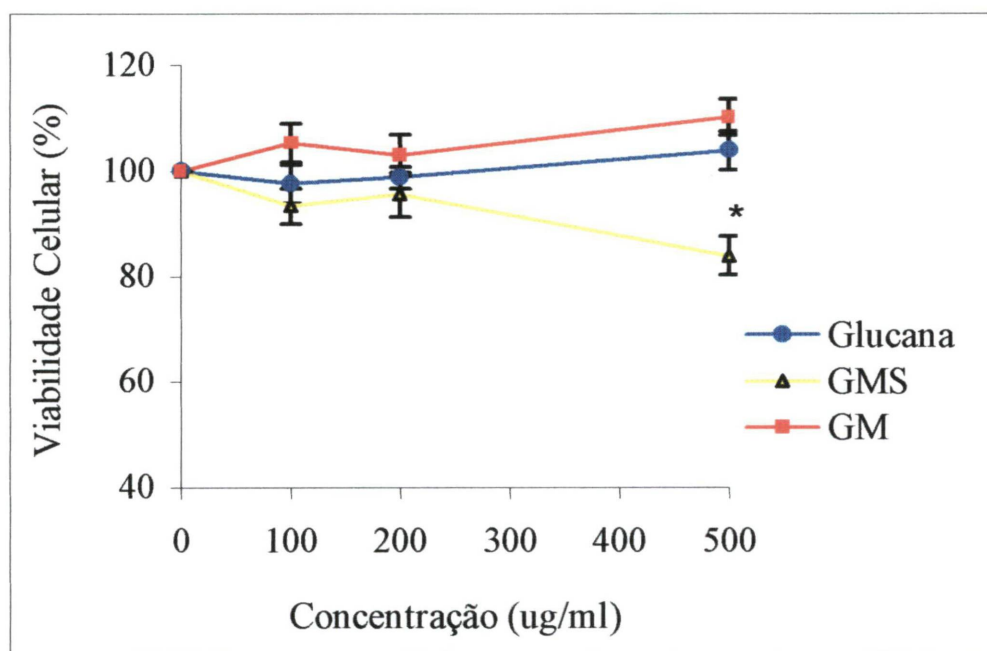
Dessa forma, em que pese o fato dos estudos de adesão celular terem sido feitos com células HeLa e não com células de S-180, é pouco provável que a ação antitumoral exercida pela α -glucana seja devido a uma interferência na adesão das células tumorais no animal, particularmente porque os receptores destas moléculas são proteínas altamente conservadas (RUOSLAHTI, 1997). Além disso, o S-180 parece não expressar receptores para laminina enquanto que os receptores para a fibronectina parecem estar dispostos principalmente na região externa do tumor (ASSEF, 1998).

Uma outra possibilidade a ser considerada para explicar o efeito da α -glucana de *R. celastri* seria uma resposta imune não-específica apresentada pelos animais tratados. Esta possibilidade foi levantada a partir das análises histológicas do tumor ressecado dos animais tratados com a α -glucana de *R. celastri*, realizadas por CARNEIRO LEÃO (1998), as quais revelaram a presença de um infiltrado de células linfocíticas ao seu redor, levantando a possibilidade de que esta molécula poderia ocasionar um estímulo imunológico do animal. De fato, vários autores acreditam que a forma de ação de polissacarídeos com atividade antitumoral possa ser dependente da reação desenvolvida pelo hospedeiro, que parece ser muito mais uma resposta celular do que humoral (WHISTLER *et al.*, 1976; BOHN e BeMILLER, 1995).

4.2 EFEITOS *IN VITRO* DE POLISSACARÍDEOS DE LIQUENS EM MACRÓFAGOS EXTRAÍDOS DA CAVIDADE PERITONEAL DE CAMUNDONGOS

A imunidade celular ou imunidade mediada por células envolve os linfócitos T, que freqüentemente ativam e atuam conjuntamente com um mecanismo efetor realizado pelos macrófagos (ABBAS *et al.*, 1994). Por sua vez, a ativação de macrófagos por polissacarídeos que apresentam atividade antitumoral tem sido demonstrada por vários autores (KIHO *et al.*, 1992; LADÁNYI *et al.*, 1993; USUI *et al.*, 1995; ITO *et al.*, 1997). Farmacologicamente tais polímeros são classificados como modificadores da resposta biológica (BRM) ou biomoduladores (BOHN e BeMILLER, 1995) e, dentre os polímeros que exercem tais efeitos destacam-se as (1→3)-β-D-glucanas, sendo aquelas isoladas de fungos as mais estudadas (BOHN e BeMILLER, 1995). Os líquens também são fontes de interessantes polissacarídeos e considerando a atividade antitumoral da α-glucana de *R. celastri*, a possibilidade de um efeito sobre macrófagos foi então avaliada. Além da α-glucana, utilizou-se também uma galactoglucomanana isolada do líquen *C. ibitipocae* e seu derivado sulfatado quimicamente, com finalidade comparativa quanto à ativação de macrófagos isolados da cavidade peritoneal de camundongos. Os experimentos *in vitro* avaliaram a produção de H₂O₂ e a viabilidade celular. *In vivo*, os parâmetros avaliados foram a atividades elicitora de células, a atividade fagocítica, a produção de H₂O₂ e NO*.

Para o estudo *in vitro*, o estabelecimento das concentrações limítrofes em que os polímeros não iriam afetar a viabilidade dos macrófagos era importante. A figura 10 mostra os resultados de experimentos desenvolvidos com tal finalidade. Verifica-se que os polímeros não exercem efeito na viabilidade celular, com exceção da galactomanana sulfatada de *C. ibitipocae* que, na dose de 500 µg/ml, apresentou uma discreta redução de 15% na viabilidade celular dos macrófagos, após 3 horas de incubação.

FIGURA 10 – EFEITO DO TRATAMENTO *IN VITRO* COM POLISSACARÍDEOS SOBRE A VIABILIDADE DE MACRÓFAGOS

A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT (REILLY *et al.*, 1998; KIHU *et al.*, 1992). A monocamada de macrófagos (5×10^5 células/poço) foi incubada com α -glucana de *R. celastri*, galactomanana de *C. ibitipocae* (GM) ou seu derivado sulfatado quimicamente (GMS), nas doses de 100, 200 e 500 $\mu\text{g/ml}$, por 3 horas a 37°C e 5% CO_2 . Após, as células foram lavadas com PBS e 100 μl de MEM e 20 μl de MTT (5mg/ml) foram adicionados, seguindo-se a incubação por 4 horas. Após este tempo, o meio de reação foi removido e o produto formado foi solubilizado com 100 μl de DMSO. A leitura das absorbâncias foi realizada em leitor de microplaca a 550 nm (Benchmark, Biorad). Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão de 3 experimentos independentes. * diferença significativa entre GMS e os outros dois grupos.

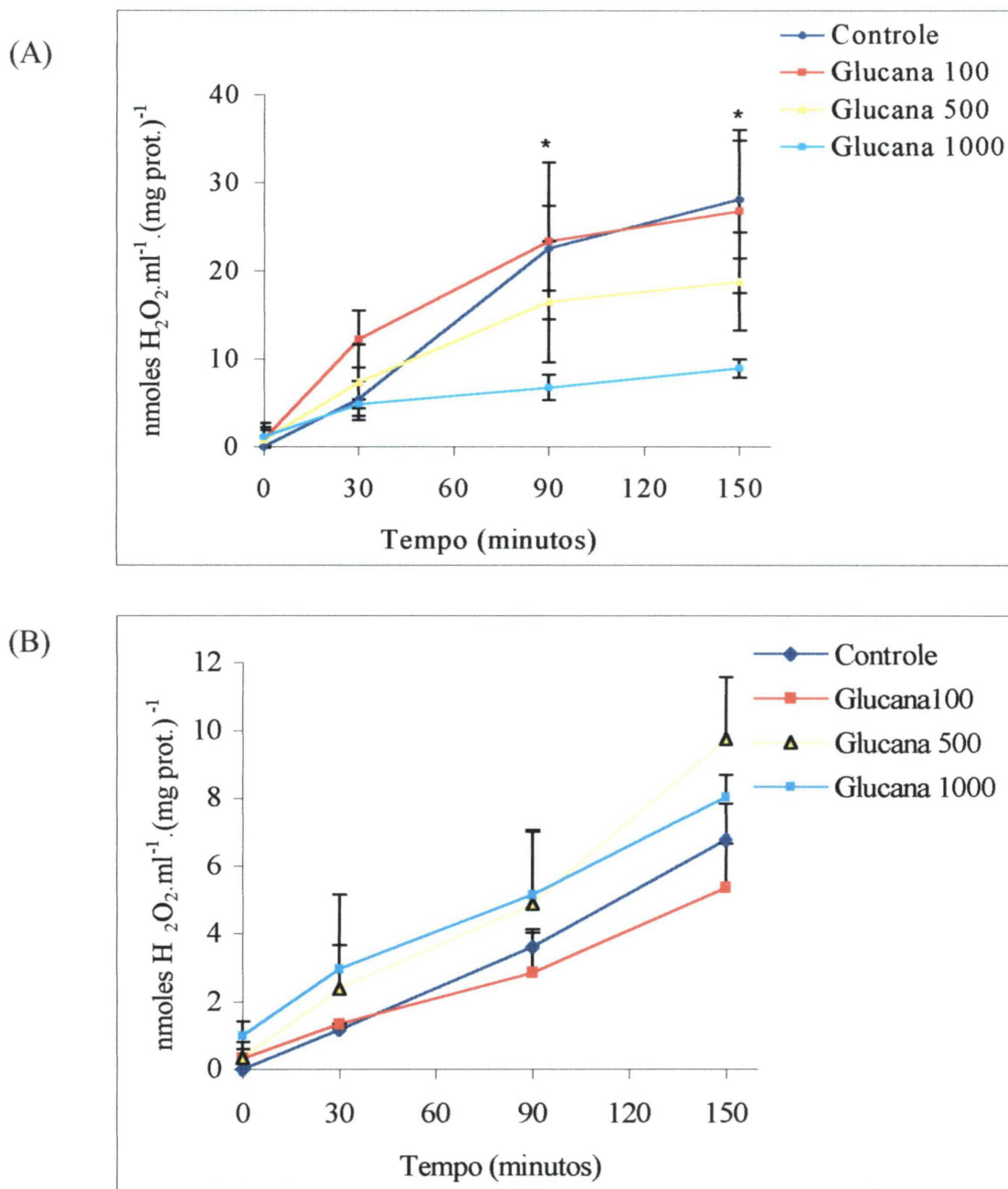
A ausência de efeitos citotóxicos drásticos sobre os macrófagos permitiu o uso destes polímeros para testes sobre os parâmetros funcionais destas células.

O efeito *in vitro* da α -glucana de *R. celastri*, da GM de *C. ibitipocae* e da GMS foram também avaliados quanto à capacidade de interferir no “burst” respiratório de macrófagos, conseqüente à ativação da NADPH oxidase (COTRAN *et al.*, 1994). Este parâmetro bioquímico da atividade de macrófagos pode ser avaliado pela produção de $O_2^{\bullet-}$ ou através da produção de H_2O_2 , devido à ação da enzima superóxido dismutase sobre o $O_2^{\bullet-}$ formado inicialmente (SEGAL e ABO, 1993; COTRAN *et al.*, 1994).

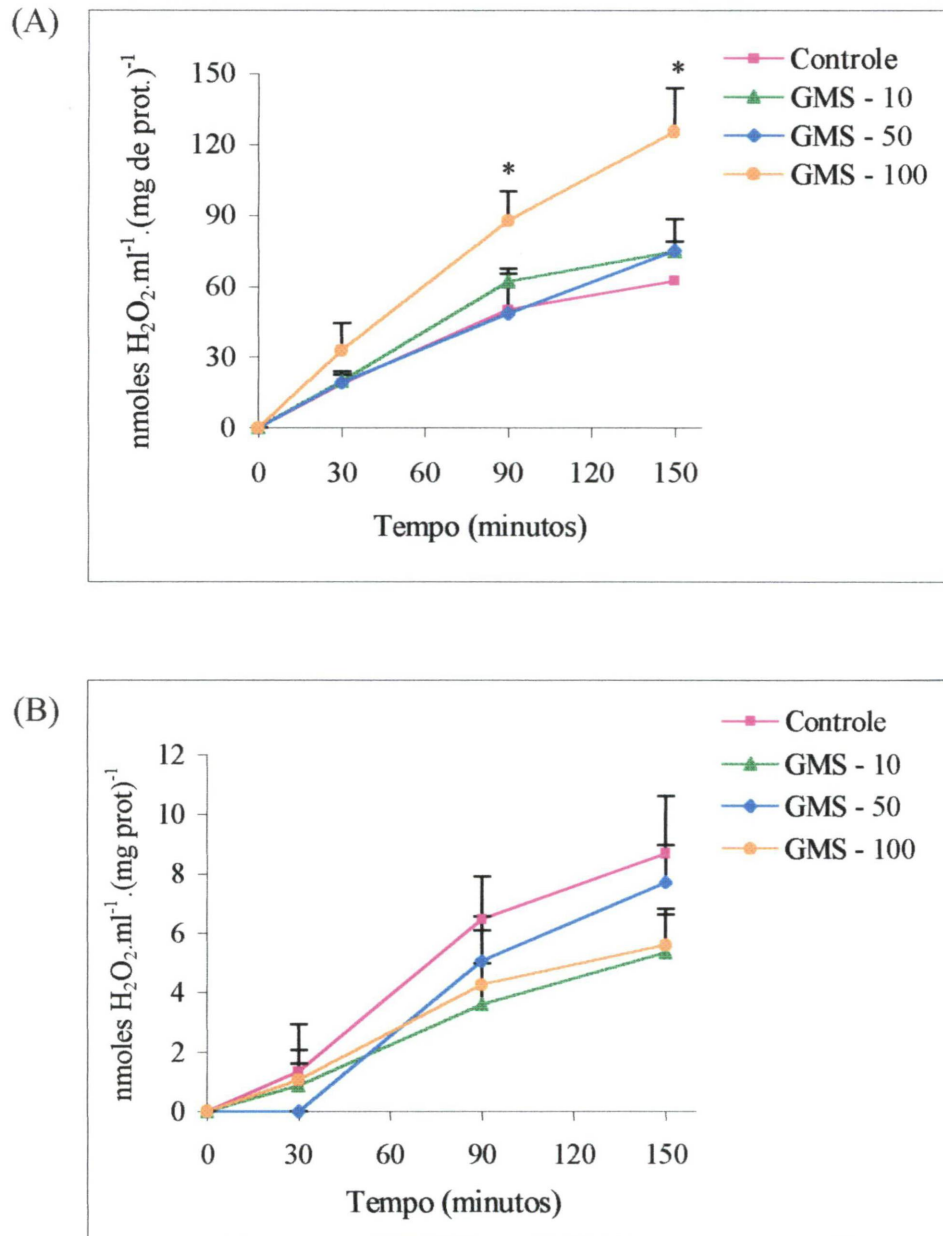
Nos experimentos cujos resultados estão mostrados nas figuras 11 e 12, as células aderentes foram incubadas por diferentes tempos e concentrações dos polímeros. As condições experimentais incluíram também a adição de PMA, um agente conhecido por seu efeito estimulador do “burst” respiratório *in vitro* (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

A figura 11, que apresenta o efeito da α -glucana, mostra que as células estavam respondendo ao PMA com acentuada produção de H_2O_2 (figura 11-A). Na ausência deste efector, a produção de H_2O_2 , embora mensurável pela metodologia empregada, se manteve em níveis muito baixos (figura 11-B). O mesmo perfil foi observado na figura 12, que mostra o efeito ocasionado pela GMS (figura 12-A e B).

Concentrações crescentes de α -glucana de *R. celastri* promoveram uma diminuição dose-dependente da produção de H_2O_2 , sendo que na dose de 1000 μ g/ml o decréscimo chegou a aproximadamente 70% (figura 11-A). Na ausência do PMA, os resultados não apresentaram diferença em relação ao controle (figura 11-B), indicando que a α -glucana não estimulou “per se” a produção de H_2O_2 . Em contraste, utilizando a GMS de *C. ibitipocae*, observou-se um aumento na produção de H_2O_2 (cerca de 100%) quando esse polímero foi incubado em uma concentração de 100 μ g/ml, em presença de PMA (figura 12-A). Na ausência deste efector, o polímero também não apresentou resultado diferente do controle (figura 12-B).

FIGURA 11 – EFEITO *IN VITRO* DA α -GLUCANA DE *R. celastri* SOBRE A PRODUÇÃO DE H_2O_2 POR MACRÓFAGOS

Macrófagos de camundongos foram coletados e plaqueados (5×10^6 células/poço) para adesão por 2 h a 37°C , em uma atmosfera de 5% de CO_2 . Após este tempo a placa foi lavada para remoção das células não aderentes e foi adicionado o meio de cultura contendo as moléculas testes nas concentrações adequadas (α -glucana: 100, 500 e 1000 $\mu\text{g/ml}$) na presença (A) e ausência (B) de PMA (1 $\mu\text{g/ml}$). Aliquotas (1ml) de cada poço foram retiradas nos tempos 0, 30, 90 e 150 min, e 10 μl de NaOH 1M foi adicionado. A oxidação do vermelho de fenol foi quantificada por espectrofotômetro em 610nm. Os resultados são expressos como média \pm sd de três experimentos independentes e são apresentados como nmoles de H_2O_2 produzido por ml de solução por 1mg de proteína. *- em A: dose de 1000 $\mu\text{g/ml}$ difere estatisticamente dos outros grupos. Para todos os testes foi considerado $p < 0,05$.

FIGURA 12 – EFEITO *IN VITRO* DA GALACTOMANANA SULFATADA DE *C. ibitipocae* SOBRE A PRODUÇÃO DE H₂O₂ POR MACRÓFAGOS

Macrófagos de camundongos foram coletados e plaqueados (5×10^6 células/poço) para adesão por 2 h a 37°C, em uma atmosfera de 5% de CO₂. Após este tempo a placa foi lavada para remoção das células não aderentes e foi adicionado o meio de cultura contendo as moléculas testes nas concentrações adequadas (GMS 10, 50 e 100 µg/ml) na presença (A) e ausência (B) de PMA (1µg/ml). Aliquotas (1ml) de cada poço foram retiradas nos tempos 0, 30, 90 e 150 min, e 10 µl de NaOH 1M foi adicionado. A oxidação do vermelho de fenol foi quantificada por espectrofotômetro em 610 nm. Os resultados são expressos como média \pm sd de três experimentos independentes e são apresentados como nmoles de H₂O₂ produzido por ml de solução por 1 mg de proteína. *: dose de 100 µg/ml difere estatisticamente dos outros grupos. Para todos os testes foi considerado $p < 0,05$.

Portanto, pode-se propor que a presença do grupo sulfato nesta molécula seja um fator importante para a sua atividade, uma vez que a galactomanana nativa não demonstrou qualquer estímulo dos macrófagos nos testes realizados. Vale destacar que a ação inibitória na produção de H_2O_2 e observada para a α -glucana de *R. celandri*, não é decorrente da perda da viabilidade celular, visto que nestas concentrações o polímero não exerceu efeito significativo sobre este parâmetro (figura 10).

O efeito da α -glucana de *R. celandri* sobre o “burst” respiratório difere daquele observado para a zimosana, uma mistura de manana e glucana extraída de *Saccharomyces cerevisiae*, que é utilizada para induzir tal efeito em células fagocíticas tais como macrófagos e neutrófilos (BADWAY e KARNOVSKI, 1980; BERTON e GORDON, 1983; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). O efeito, porém, foi similar ao descrito por NOLETO e colaboradores (2002) para uma manana extraída de *Saccharomyces cerevisiae* e uma galactomanana extraída de *R. celandri*, os quais diminuíram a produção de H_2O_2 e de $O_2^{\bullet-}$. A ação inibitória da α -glucana sobre a produção de H_2O_2 pelos macrófagos estimulados com PMA sugere, a exemplo do que foi observado por NOLETO e colaboradores (2002) que uma ação antioxidante seja exercida por esses polissacarídeos. Tal atividade foi descrita por TSIAPALI e colaboradores (2001) para vários polímeros, sendo sugerido que estes polissacarídeos apresentariam uma atividade antioxidante maior que aquela relacionada com as unidades monoméricas, devido a uma maior facilidade de retirada do próton do carbono anomérico (TSIAPALI *et al.*, 2001). Esses autores destacam ainda que o efeito dos polissacarídeos que apresentam uma fraca atividade como “scavenger” de radicais livres *in vitro*, não está correlacionado com o tipo de ligação intracadeia, massa molecular ou grau de polimerização do polímero, mas parece estar mais associada com o tipo de monossacarídeo constituinte do mesmo, com as mananas e glucanas apresentando efeito mais pronunciado (TSIAPALI *et al.*, 2001).

Uma possibilidade que não pode ser descartada para explicar o efeito da α -glucana, seria uma interferência na ativação da NADPH oxidase que, por estímulo do PMA, ocorre via proteína quinase C (RYVES *et al.*, 1991). A diminuição do

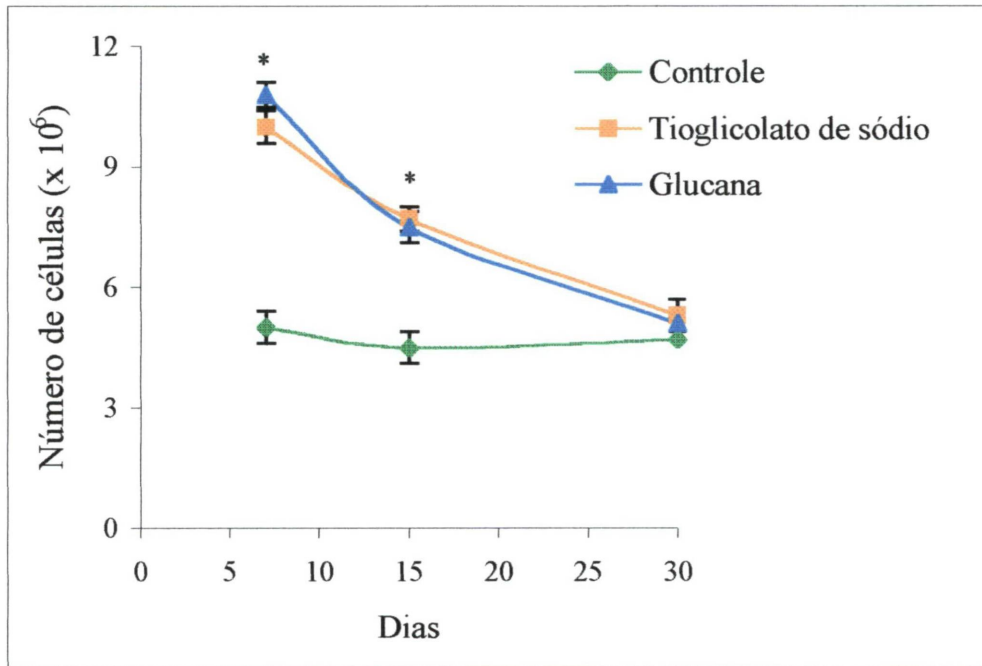
“burst” respiratório de macrófagos *in vitro* não significa que o polímero não exerça efeitos *in vivo*. TSIAPALI e colaboradores (2001) demonstraram que glucanas podem apresentar uma atividade como “scavenger” de radicais livres em altas doses, porém, em doses mais baixas este efeito pode desaparecer e o efeito indutor dessas moléculas pode predominar, resultando na ativação do sistema imune.

Sendo assim, avaliou-se o efeito *in vivo* da α -glucana sobre os macrófagos dos animais tratados com este polissacarídeo. Nestes experimentos camundongos albinos suíços fêmeas foram inoculados uma única vez com α -glucana de *R. celastri* (200 mg.kg⁻¹) e, 7, 15 e 30 dias após a inoculação, as células da cavidade peritoneal foram coletadas e utilizadas para avaliação da atividade elicitora de células, atividade fagocítica e produção de H₂O₂ e NO[•]. A opção pela dose única foi decorrente do fato de que a repetição de doses não resultou em otimização do efeito antitumoral frente às células de S-180, que havia sido descrito por CARNEIRO LEÃO (1998).

4.3 EFEITOS *IN VIVO* DA α -GLUCANA DE *R. celastri* EM MACRÓFAGOS EXTRAÍDOS DA CAVIDADE PERITONEAL DE CAMUNDONGOS

4.3.1 Atividade Elicitora de Células da Cavidade Peritoneal (PEC)

Nos experimentos visando avaliar a atividade elicitora de células, o grupo teste foi constituído por 4 animais e o número total de PEC foi determinado por contagem do lavado peritoneal realizado 7, 15 e 30 dias depois da injeção i.p. do polissacarídeo. Para comparação e controle, células da cavidade peritoneal de animais inoculados com solução salina (grupo controle) ou solução de tioglicolato de sódio (controle positivo) também foram examinados. Os resultados destes experimentos estão mostrados na figura 13, onde se verifica que o número de PEC do grupo tratado com α -glucana foi aproximadamente 130% maior que o grupo controle, 7 dias depois da administração.

FIGURA 13. ATIVIDADE ELICITORA DE CÉLULAS PARA A CAVIDADE PERITONEAL REALIZADA PELA α -GLUCANA ADMINISTRADA INTRAPERITONEALMENTE EM CAMUNDONGOS

Os camundongos ($n=4$, para cada grupo, em cada tempo) foram inoculados intraperitonealmente com α -glucana (200 mg.kg^{-1}), ou tioglicolato de sódio (20 mg.kg^{-1}), ou solução salina ($0,2 \text{ ml/animal}$). As células da cavidade peritoneal (PEC) foram coletadas 7, 15 ou 30 dias depois. Após centrifugação, o “pellet” de células foi lavado duas vezes com PBS a 4°C e ressuspensão em HBSS a 4°C . As células foram contadas usando um hemocitômetro de Neubauer. O resultado foi expresso como média \pm sd. *: refere-se a uma diferença significativa com relação ao grupo controle pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

Após 15 dias, evidenciava-se ainda o maior número de células na cavidade peritoneal dos animais tratados com o polissacarídeo, em relação ao controle, embora fosse menor do que aquele observado em 7 dias. Trinta dias após a injeção do polímero, a atividade elicitora de PEC demonstrada pela glucana retornou aos mesmos valores observados para o grupo controle.

Atividade elicitora de células para a cavidade peritoneal também foi descrita para a lentinana, uma β -glucana com ligações do tipo (1 \rightarrow 3) de origem fúngica. O tratamento i.p. dos camundongos com 10 mg.kg⁻¹ desta molécula, 3 dias antes da coleta das células, aumentou o número de PEC (aproximadamente 75%), bem como o seu espalhamento em cultura, quando comparado com o grupo de animais não inoculados (controle), dados que podem ser considerados sinais da ativação dos macrófagos (LADÁNYI *et al.*, 1993). Vale destacar que esta lentinana, a exemplo da α -glucana de *R. celastri*, também apresentou uma atividade antitumoral contra o S-180 quando foi inoculada durante 5 dias, em uma concentração de 4 mg.kg⁻¹ (SUGA *et al.*, 1984). O efeito da α -glucana de *R. celastri* parece ser mais persistente que aquele observado para uma fração polissacarídica degradada enzimaticamente obtido de uma alga marinha (*Gracilaria verrucosa*), o qual promoveu um aumento de 100% no número de células em 5 dias (YOSHIZAWA *et al.*, 1996). E ainda, similar aos resultados obtidos com a α -glucana foram aqueles obtidos por SAKURAI e colaboradores (1992) com uma β -glucana de *Sclerotinia sclerotiorum*, que foi capaz de manter o estímulo por até 12 dias, com um aumento de 140% em relação ao grupo controle.

Embora no presente trabalho não se tenha procedido a contagem diferencial dos tipos celulares presentes no PEC, alguns pesquisadores observaram que a infiltração celular ocasionada pela inoculação i.p. de uma (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4)- β -D-glucana extraída de aveia (O β G - 500 μ g/animal), consistia quase que exclusivamente de macrófagos, sendo o resultado 66% superior aos valores encontrados para o grupo controle (ESTRADA *et al.*, 1997). Da mesma forma, para a zimosana, a resposta da inoculação i.p. também foi um aumento do recrutamento de macrófagos

(aproximadamente 70%), porém o principal aumento se deu na eliciação de neutrófilos (cerca de 400%), com um aumento no número total de células de aproximadamente 100% em 10 dias (ESTRADA *et al.*, 1997). Portanto, embora o tipo de células possa ser variável, estas serão sempre células de defesa.

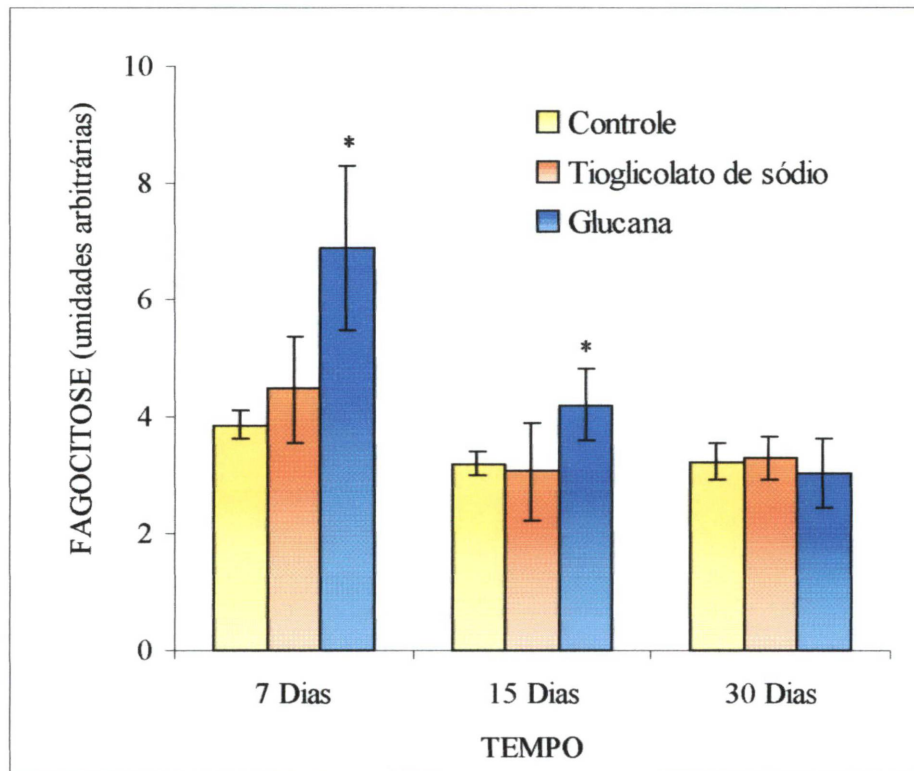
Os resultados evidenciaram, portanto, que a α -glucana de *R. celastri* recruta células para a cavidade peritoneal, ainda não se podendo diferenciar se este estímulo é elicitor, como aquele desempenhado pelo tioglicolato de sódio, ou ativador, como aquele desenvolvido pelo BCG. Vale destacar ainda que o recrutamento de células para a cavidade peritoneal de camundongos é na maioria das vezes relatado para β -glucanas e, provavelmente, este é o primeiro relato para uma α -glucana.

4.3.2 Atividade Fagocítica

A fagocitose representa o passo final e indispensável do sistema de defesa imunológico (van OSS, 1986) e, uma vez que os fagócitos atuam como as células efetoras e regulatórias, um estímulo da função fagocítica deve contribuir na terapia contra infecções bacterianas e invasões tumorais (POPOV *et al.*, 1999).

A figura 14 e a tabela 5 mostram os resultados da atividade fagocítica de macrófagos isolados de animais tratados com α -glucana de *R. celastri*, avaliada através da fagocitose de partículas de látex fluorescentes. Verifica-se que 7 dias após a inoculação do polissacarídeo a fagocitose aumentou aproximadamente 70%, diminuindo gradativamente até que ao 30º dia após o tratamento dos animais, os resultados retornaram àqueles obtidos para o grupo controle. Vale destacar que 15 dias após a injeção, os valores obtidos com as células dos animais tratados eram ainda aproximadamente 30% superiores comparado à atividade obtida com as células isoladas dos animais não tratados.

FIGURA 14. EFEITO DO TRATAMENTO DE CAMUNDONGOS COM α -GLUCANA NA FAGOCITOSE DE PARTÍCULAS DE LÁTEX FLUORESCENTES POR MACRÓFAGOS ISOLADOS DA CAVIDADE PERITONEAL



Macrófagos obtidos de animais tratados ($n=4$, para cada grupo, em cada tempo, 3×10^6 células/poço) com α -glucana, tioglicolato de sódio (10 mg/animal) ou solução salina (0.5 ml/ animal) foram incubados com partículas de látex fluorescente por 4 h a 37°C , sob uma atmosfera de 5% de CO_2 . Após este período, as células foram lavadas e lisadas para a determinação da fluorescência em aparelho Aminco. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão da intensidade de fluorescência de três experimentos independentes. O asterisco indica uma diferença significativa do grupo teste com relação aos outros dois grupos pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

TABELA 5 – ATIVIDADE FAGOCÍTICA DE MACRÓFAGOS OBTIDOS DA CAVIDADE PERITONEAL DE CAMUNDONGOS

	CONTROLE	CONTROLE POSITIVO	GRUPO TESTE
7 DIAS	3,9 \pm 0,3	4,5 \pm 0,9	6,9 \pm 1,4
15 DIAS	3,2 \pm 0,2	3,1 \pm 0,8	4,2 \pm 0,6
30 DIAS	3,2 \pm 0,3	3,3 \pm 0,4	3,0 \pm 0,6

Controle: animais inoculados com solução salina; Controle Positivo: animais inoculados com solução de tioglicolato de sódio; Grupo Teste: animais inoculados com α -glucana. Os valores estão expressos como média \pm desvio padrão da intensidade de fluorescência de três experimentos independentes.

O padrão da resposta obtida com o tratamento com α -glucana de *R. celastri* pode ser considerado bastante eficaz, visto que uma arabinogalactana fracamente ácida e polissacarídeos pécticos extraídos da planta intacta e de calos de *Silene vulgaris*, apresentaram um estímulo da atividade fagocítica variando entre 5 e 32,5% em relação ao controle (POPOV *et al.*, 1999). O padrão de resposta da α -glucana de *R. celastri* foi comparável àquele obtido com uma β -glucana (1 \rightarrow 3) altamente ramificada em (1 \rightarrow 6) e também solúvel em água, extraída do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (SUGA *et al.*, 1984).

Contudo, BRATTGJERD *et al.* (1994) descreveram 100 a 150% de estímulo da fagocitose quando salmões do atlântico foram inoculados por 3 a 6 semanas com glucanas isoladas de parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*.

O efeito da α -glucana foi mais persistente que aquele descrito para uma galactana sulfatada, extraída da alga *Gracilaria verrucosa*. Inoculada i.p. em camundongos (4 mg/animal), este último polímero causou um aumento no número de PEC bem como da atividade fagocítica, porém enquanto o aumento de PEC foi persistente por 5 dias, a atividade fagocítica começou a declinar no segundo dia após a inoculação (YOSHIZAWA *et al.*, 1996). Outros estudos *in vitro* utilizando macrófagos pré-incubados com 200 μ g/ml de uma β -(1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 6)-glucana extraída do fungo *Glomerella cingulata*, demonstraram que sua ação é tempo dependente, ou seja, pré-incubações rápidas de 30 minutos, por exemplo, não afetaram a fagocitose de partículas de zimosana, enquanto tratamentos prolongados (15 horas) ocasionaram um aumento de 93% (GOMAA *et al.*, 1992). Uma α -glucana do tipo isoliquenana (α -(1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4)-glucana, 2:1) extraída de *Cetraria islandica*, também foi testada *in vitro* na concentração de 100 μ g/ml. Este polímero aumentou a fagocitose em 50% quando comparado com o controle, porém neste estudo, as células fagocíticas utilizadas foram granulócitos de sangue total (OLAFSDOTTIR *et al.*, 1999) e portanto os resultados não podem ser comparados com a α -glucana de *R. celastri*.

Sendo assim, tem-se sugerido que nem sempre a indução da fagocitose e das outras respostas celulares a ela relacionadas (produção de espécies reativas de

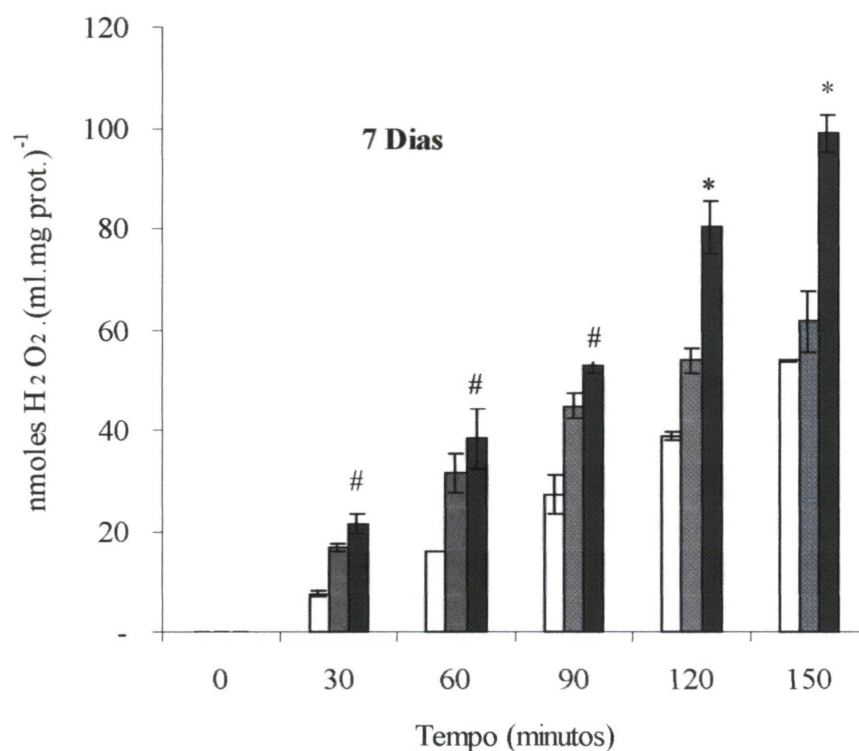
oxigênio e NO[•]) ocorram da mesma maneira, embora a resposta imuno-inflamatória possa ser funcionalmente relacionada uma com a outra (OKASAKI *et al.*, 1996). Uma possível explicação para as várias respostas encontradas para os polissacarídeos é a existência de múltiplos sítios de reconhecimento de polissacarídeos nos macrófagos, o que desencadearia diferentes mecanismos sinais no seu interior, suscitando uma resposta específica (OKAZAKI *et al.*, 1996; REMENTERÍA *et al.*, 1997).

Quando macrófagos e células fagocíticas estão realizando o processo da fagocitose de bactérias ou células tumorais, há uma associação desta ação com a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que causam danos celulares por lipoperoxidação, destruição de proteínas e danos no DNA, destruindo os invasores (PASQUIER *et al.*, 1997). Embora exceções a esta regra existam, como aqueles descritos por REMENTERÍA *et al.* (1997) para uma quitina (polímero composto por *N*-acetil- β -D-glucosamina ligadas por ligações β -(1 \rightarrow 4)) extraída de *Candida albicans* que causou um aumento da capacidade fagocítica sem, no entanto, aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio, a α -glucana de *R. celastri* foi avaliada quanto a estes parâmetros.

4.3.3 Produção de H₂O₂

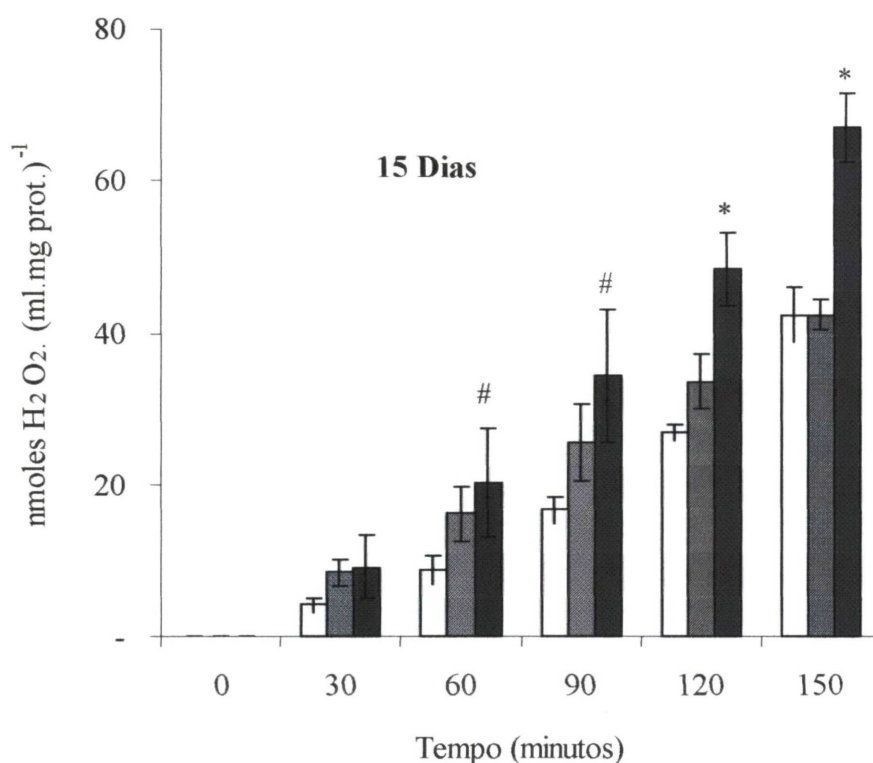
A produção de H₂O₂ por macrófagos peritoneais de animais tratados *in vivo* com α -glucana de *R. celastri* é mostrada na figura 15 - A, B, C - e na tabela 6 - A, B e C. Estes experimentos foram realizados sob duas condições experimentais: a primeira na ausência e a outra em presença de PMA, o qual induz os macrófagos a produzir O₂^{•-} e conseqüentemente H₂O₂ (ARTHUR *et al.*, 1986; SEGAL e ABO, 1993). Na ausência de PMA, verifica-se que os macrófagos foram estimulados quanto à produção de H₂O₂ (30%) pelo tratamento com α -glucana 7 dias após a injeção, não existindo diferença entre os grupos controle, controle positivo e tratado com α -glucana em tempos superiores (15 e 30 dias).

Figura 15 – (A) CURVA DE TEMPO DE PRODUÇÃO DE H₂O₂ POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS INOCULADOS COM α -GLUCANA DE *R. celastri*



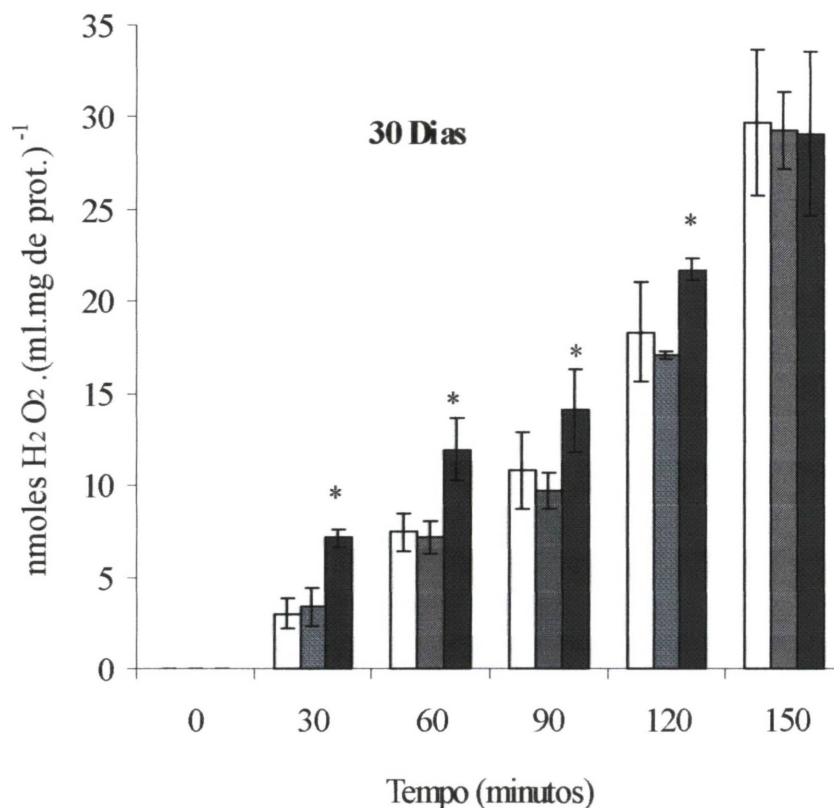
Camundongos ($n=4$, para cada grupo) foram inoculados i.p. com uma dose única de α -glucana (200 mg.kg^{-1}) (▀), solução de tioglicolato de sódio ($20 \text{ mg.kg}^{-1}/\text{animal}$) (■), ou solução salina ($0.2 \text{ ml}/\text{animal}$) (□). Em 7 dias (A), os animais foram sacrificados e as células da cavidade peritoneal foram coletadas e plaqueadas (5×10^6 células/poço). Após 2 h a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO_2 , as células foram lavadas e foi adicionado uma solução de vermelho de fenol contendo peroxidase horseradish (19 U.ml^{-1}) e PMA ($1 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$). Aliquotas de 1 ml de cada poço foram retiradas em intervalos de 30 min até 150 min, e $10 \text{ }\mu\text{l}$ de NaOH 1M foi adicionado. A oxidação do vermelho de fenol foi quantificada espectrofotometricamente em 610 nm. Os resultados foram expressos como média \pm SD de três experimentos independentes e são apresentados como nmoles de H₂O₂ produzido por 1 mg de proteína. * - grupo teste difere estatisticamente dos outros dois grupos; # - grupo teste e tioglicolato de sódio diferem estatisticamente do controle ($p<0,05$).

Figura 15 – (B) CURVA DE TEMPO DE PRODUÇÃO DE H₂O₂ POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS INOCULADOS COM α -GLUCANA DE *R. celastri*



Camundongos ($n=4$, para cada grupo) foram inoculados i.p. com uma dose única de α -glucana (200 mg.kg^{-1}) (■), solução de tioglicolato de sódio ($20 \text{ mg.kg}^{-1}/\text{animal}$) (■), ou solução salina (0.2 ml/ animal) (□). Em 15 dias (B), os animais foram sacrificados e as células da cavidade peritoneal foram coletadas e plaqueadas (5×10^6 células/poço). Após 2 h a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO_2 , as células foram lavadas e foi adicionado uma solução de vermelho de fenol contendo peroxidase horseradish (19 U.ml^{-1}) e PMA ($1 \mu\text{g.ml}^{-1}$). Aliquotas de 1 ml de cada poço foram retiradas em intervalos de 30 min até 150 min, e $10 \mu\text{l}$ de NaOH 1M foi adicionado. A oxidação do vermelho de fenol foi quantificada espectrofotometricamente em 610 nm. Os resultados foram expressos como média \pm SD de três experimentos independentes e são apresentados como nmoles de H₂O₂ produzido por 1 mg de proteína. * - grupo teste difere estatisticamente dos outros dois grupos; # - grupo teste e tioglicolato de sódio diferem estatisticamente do controle ($p<0,05$).

Figura 15 – (C) CURVA DE TEMPO DE PRODUÇÃO DE H₂O₂ POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS INOCULADOS COM α -GLUCANA DE *R. celastri*



Camundongos ($n=4$, para cada grupo) foram inoculados i.p. com uma dose única de α -glucana (200 mg.kg^{-1}) (■), solução de tioglicolato de sódio ($20 \text{ mg.kg}^{-1}/\text{animal}$) (■), ou solução salina (0.2 ml/ animal) (□). Em 30 dias (C), os animais foram sacrificados e as células da cavidade peritoneal foram coletadas e plaqueadas (5×10^6 células/poço). Após 2 h a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO_2 , as células foram lavadas e foi adicionado uma solução de vermelho de fenol contendo peroxidase horseradish (19 U.ml^{-1}) e PMA ($1 \mu\text{g.ml}^{-1}$). Aliquotas de 1 ml de cada poço foram retiradas em intervalos de 30 min até 150 min, e $10 \mu\text{l}$ de NaOH 1M foi adicionado. A oxidação do vermelho de fenol foi quantificada espectrofotometricamente em 610 nm. Os resultados foram expressos como média \pm SD de três experimentos independentes e são apresentados como nmoles de H₂O₂ produzido por 1 mg de proteína. * - grupo teste difere estatisticamente dos outros dois grupos ($p<0,05$).

TABELA 6 – PRODUÇÃO DE H₂O₂ POR MACRÓFAGOS ISOLADOS DA CAVIDADE PERITONEAL DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM α -GLUCANA DE *R. celastri* APÓS 7 (A), 15 (B) OU 30 (C) DIAS DE INOCULAÇÃO.

A - 7 DIAS

TEMPO (min)	CONTROLE CONTROLE POSITIVO GRUPO TESTE		
	nmoles de H ₂ O ₂ .(ml.mg de prot.) ⁻¹		
0	0	0	0
30	7,49 ± 0,69	16,66 ± 0,64 [#]	21,31 ± 2,06 [#]
60	15,85 ± 0,06	31,50 ± 3,82 [#]	38,33 ± 5,95 [#]
90	27,16 ± 3,74	44,85 ± 2,59 [#]	52,85 ± 1,63 [#]
120	38,72 ± 0,67	53,83 ± 2,67	80,24 ± 5,16 [*]
150	53,79 ± 0,25	61,65 ± 6,00	98,90 ± 3,76 [*]

B - 15 DIAS

TEMPO (min)	CONTROLE CONTROLE POSITIVO GRUPO TESTE		
	nmoles de H ₂ O ₂ .(ml.mg de prot.) ⁻¹		
0	0	0	0
30	4,80 ± 0,96	8,38 ± 1,75	9,25 ± 4,06
60	9,8 ± 1,86	16,19 ± 3,59 [#]	20,15 ± 7,15 [#]
90	17,95 ± 1,62	25,53 ± 5,15 [#]	34,85 ± 8,70 [#]
120	26,81 ± 1,11	33,41 ± 3,60	48,75 ± 4,90 [*]
150	42,37 ± 3,57	42,37 ± 2,10	67,0 ± 4,55 [*]

C - 30 DIAS

TEMPO (min)	CONTROLE CONTROLE POSITIVO GRUPO TESTE		
	nmoles de H ₂ O ₂ .(ml.mg de prot.) ⁻¹		
0	0	0	0
30	2,67 ± 1,34	2,70 ± 1,81	5,44 ± 3,19 [*]
60	6,47 ± 2,47	5,81 ± 2,46	10,26 ± 4,42 [*]
90	10,82 ± 2,11	8,67 ± 0,96	15,05 ± 3,95 [*]
120	18,78 ± 2,68	17,55 ± 0,22	21,73 ± 0,59 [*]
150	29,72 ± 3,99	28,62 ± 3,79	30,4 ± 6,58

Em (A), (B) e (C): Controle: animais inoculados com solução salina; Controle Positivo: animais inoculados com solução de tioglicolato de sódio; Grupo Teste: animais inoculados com α -glucana. #: Grupo teste e tioglicolato de sódio diferem estatisticamente do controle (p<0,05); *: Grupo teste difere estatisticamente dos outros grupos. (p<0,05).

Porém, quando as células tratadas com a α -glucana foram estimuladas *in vitro* por PMA, o aumento na produção de H_2O_2 com diferenças significativas em relação ao controle, foi observado após 7 e 15 dias da inoculação do polissacarídeo, sendo o estímulo de aproximadamente 85 e 60%, respectivamente. Após 30 dias do tratamento, os valores retornaram aos níveis do controle. Desta forma, os resultados sugerem que a α -glucana favorece a ação do PMA, sendo um fraco indutor “per se”.

Como os macrófagos necessitaram de um estímulo adicional para aumentar a produção de H_2O_2 , ou seja, a adição de PMA, pode-se sugerir que a ação do polissacarídeo seja elicitor das células, semelhante ao efeito ocasionado pelo tioglicolato de sódio, antes que ativador, como aquele desempenhado pelo BCG. Dessa forma, pode-se especular que o efeito desta molécula nos organismos levaria a elicitação de macrófagos dependentes de citocinas para tornarem-se ativados.

Resultados similares àqueles aqui descritos foram obtidos para macrófagos isolados de rim de salmão tratados i.p. com uma β -(1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 6)-glucana insolúvel (120mg.kg⁻¹), extraída da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* (BRATTGJERD *et al.*, 1994). Da mesma forma, em camundongos tratados por injeção endovenosa de uma β -(1 \rightarrow 3)-glucana a uma concentração de 20 mg.kg⁻¹, o número de células da cavidade peritoneal, a fagocitose e a produção de H_2O_2 mantiveram-se estimulados por um período de 10 dias, sendo que a produção máxima deste último se deu 2 dias após o início do teste. No presente estudo, o efeito da glucana de *R. celandri* sobre a produção de citocinas não foi avaliado, porém, alguns autores descrevem que a produção de IL-1 pode apresentar-se transitoriamente aumentada, voltando rapidamente a valores similares ao controle poucos dias após a inoculação dos polissacarídeos. Esta secreção aumentada de IL-1, logo após a administração do polissacarídeo, tem uma importância chave na ativação das células T, que por sua vez, ativariam mais macrófagos (SAKURAI *et al.*, 1992). Dessa forma, a possibilidade que a α -glucana de *R. celandri* possa estimular macrófagos a produzir citocinas fica em aberto para investigação futura.

Vários outros dados da literatura podem ser utilizados para comparação dos

efeitos da α -glucana de *R. celastri*. Por exemplo, experimentos utilizando uma quitina 70% deacetilada (DAC) ou uma quitina 80% carboximetilada (CM) em C-6, por inoculação i.p. (20 mg.kg^{-1}) em camundongos (TOKURA *et al.*, 1987), demonstraram uma estimulação na produção de H_2O_2 , e aumento da lise e diminuição da proliferação de células tumorais *in vitro* e *in vivo*, com um efeito persistente por 15 e 3 dias, para cada polissacarídeo respectivamente. A quitina-DAC, mas não a quitina nativa ou a quitina superacetilada, ainda apresentou a capacidade de estimular a secreção de IL-1 e seus efeitos foram drasticamente reduzidos pela *N*- ou *O*-sulfatação. Os autores sugerem que o efeito, neste caso, seja devido aos grupos químicos envolvidos, cujo pK em cerca de 6,4, manteria a efetividade da estrutura molecular como um adjuvante terapêutico e que sua atividade poderia ser controlada através de modificações químicas. Outro exemplo trata-se de uma heteroglucana solúvel em água extraída do fungo *Armillariella tabescens*, a qual, semelhante a α -glucana de *R. celastri*, estimulou a produção do $\text{O}_2^{\bullet-}$ *in vivo mas não in vitro*, sugerindo a necessidade de algum sinal mediado por outras células, como por exemplo, linfócitos T (KIHO *et al.*, 1992). Apesar de sua solubilidade em água, o modo de ação da heteroglucana parece ser similar aquele desenvolvido por β -glucanas insolúveis. Já uma α -(1 \rightarrow 3)-glucana insolúvel em água extraída do mesmo fungo parece ativar os macrófagos por uma via diferente, visto que tanto *in vivo* quanto *in vitro* ela induziu a produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$.

4.3.4 Produção de NO^{\bullet}

Outra via de importância para os macrófagos e através da qual exercem sua função é a via de produção de NO^{\bullet} , que atua como parte da resposta inflamatória contra patógenos, tais como bactérias, viroses e células tumorais, tendo sido proposto como um dos mais importantes efetores da atividade tumoricida (MIWA *et al.*, 1997).

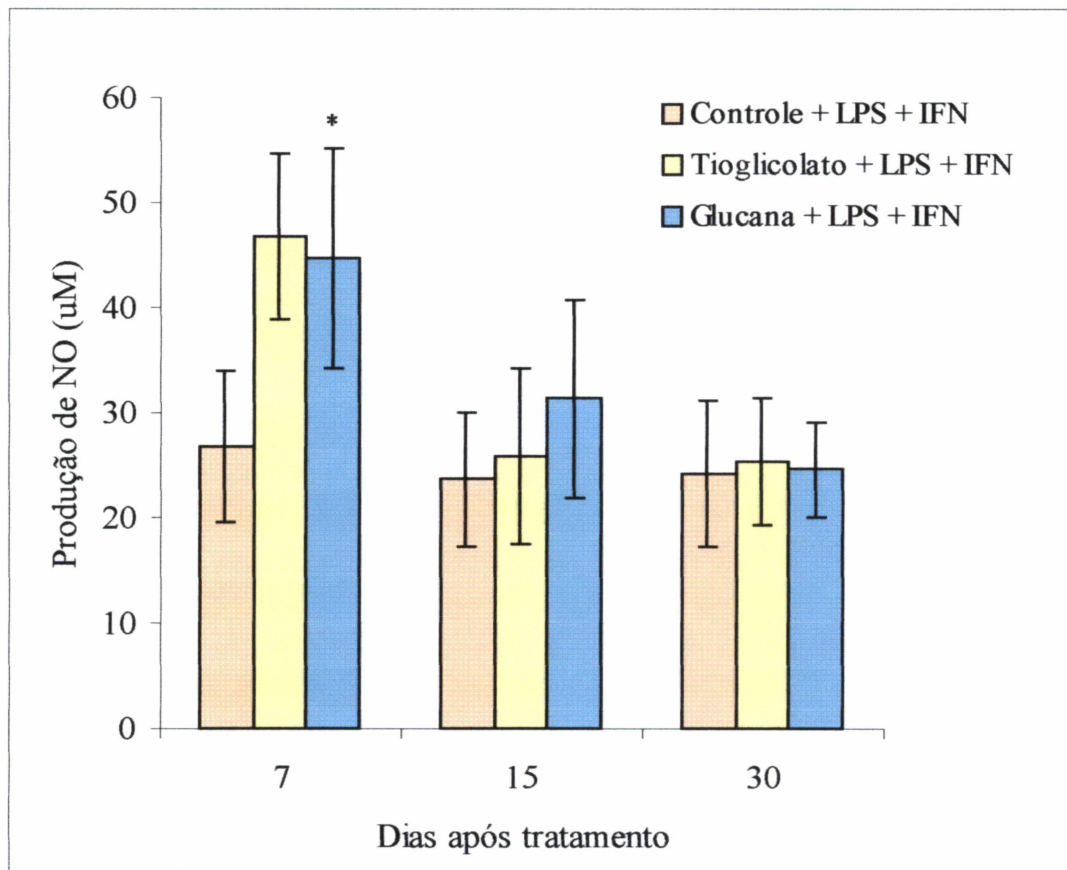
O efeito da α -glucana de *R. celastri* foi avaliado seguindo o mesmo protocolo experimental utilizado na avaliação da produção *in vivo* de H_2O_2 , ou seja, camundongos foram inoculados com a α -glucana de *R. celastri* (200 mg.kg^{-1}) e após 7,

15 ou 30 dias, as células da cavidade peritoneal foram coletadas, plaqueadas e foi avaliada a produção de NO[•]. INF- γ e LPS também foram utilizados, visto que o primeiro é indutor da NOS (JAMES, 1995) e o segundo atua como um co-sinal (CUNHA *et al.*, 1993). Os níveis basais de produção de NO[•] por macrófagos não estimulados por estes dois agentes indutores permaneceu em aproximadamente 8 $\mu\text{M}/5 \times 10^5$ células, em todos os dias testados e nos três grupos. Nas situações em que LPS e INF- γ foram adicionados ao meio, os macrófagos coletados 7 dias após a inoculação com tioglicolato de sódio ou α -glucana demonstraram um aumento na produção de NO[•] em cerca de 50%. Esse estímulo diminuiu progressivamente, voltando aos valores similares ao controle em 30 dias após a administração do polímero (figura 16 e tabela 7).

Este efeito obtido com a α -glucana de *R. celastri* foi mais expressivo do que aquele apresentado por uma fração rica em polissacarídeos extraída de raiz de *Codonopsis pilosula* e administrada oralmente em camundongos (WANG *et al.*, 1996), onde os autores descrevem o estímulo da produção de NO[•] após 8 semanas da administração do extrato (10 mg/l, estimando-se que o consumo diário dos animais tenha sido 3,5 mg.kg⁻¹). Cabe ressaltar que, quando os animais foram tratados da mesma forma por 4 semanas, a produção de NO[•] foi inibida (WANG *et al.*, 1996).

Portanto a α -glucana de *R. celastri*, propicia o aumento da produção de H₂O₂ bem como da produção de NO[•]. Neste aspecto, MARCINKIEWICZ e colaboradores (1995) demonstraram que aumento nos níveis de NO[•] aumenta a liberação de espécies reativas de oxigênio. A interação entre espécies reativas de oxigênio e nitrogênio fornece a base molecular para o sinergismo entre o “burst” respiratório e a síntese de NO[•]. A combinação de H₂O₂ e NO[•] parece determinar uma forte atividade de defesa, possivelmente resultando da formação do potente oxidante radical hidroxil, na presença de íons ferro (FANG, 1997).

FIGURA 16. PRODUÇÃO DO NO[•] POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM α -GLUCANA DE *R. celastris*



Camundongos ($n=4$, para cada grupo, em cada tempo) foram inoculados intraperitonealmente com uma dose única de α -glucana (200 mg.kg^{-1}), tioglicolato de sódio (20 mg.kg^{-1} /animal), ou solução salina ($0,2 \text{ ml/ animal}$). Em 7, 15 ou 30 dias, os animais foram sacrificados e as células do lavado peritoneal foram coletadas e plaqueadas (5×10^5 células/poço) com meio de cultura contendo LPS e IFN- γ . Depois de 24 h a 37°C , em uma atmosfera de 5% de CO_2 , $100 \mu\text{l}$ do sobrenadante da cultura foi misturado com $100 \mu\text{l}$ do reagente de Griess e após 10 minutos a absorbância desenvolvida foi lida em leitor de microplaca (550 nm). Os níveis basais de produção de NO[•] por macrófagos não estimulados por estes dois agentes indutores permaneceu em aproximadamente $8 \mu\text{M}/5 \times 10^5$ células, em todos os dias testados e nos três grupos. Os resultados são dados como média \pm SD de 4 experimentos independentes. *: Grupo teste e tioglicolato de sódio diferem estatisticamente do controle ($p < 0,05$).

Outros estudos da produção de NO[•] estimulada *in vitro* por polissacarídeos têm demonstrado que muitos deles funcionam como o LPS, que é o principal ativador de macrófagos para produção de NO[•] (REMENTERÍA *et al.*, 1997; JEON *et al.*, 1999; JEON *et al.*, 2001). Estes estudos reforçam a idéia do uso dessas moléculas como modificadores da resposta biológica, atuando como imunomoduladores.

MIZUNO e colaboradores (2000) estudaram uma fucogalactana extraída do cogumelo *Sarcodon aspratus* e observaram que este polissacarídeo, *in vitro*, em uma dose de 500 µg/ml, estimulou a produção de NO[•] em cerca de 150%. Os autores sugeriram que esta atividade imunomodulatória esteja envolvida na atividade antitumoral contra o S-180 demonstrada por este polímero.

Vários autores têm estudado a influência da produção de NO[•] na atividade antitumoral exercida por polissacarídeos buscando um entendimento do mecanismo de ação exercido por estes polímeros. UM e colaboradores (2002) testaram a ativação tumoricida de macrófagos induzida por um polissacarídeo capsular de *Streptococcus pneumoniae*, denominado PS, formado por unidades repetidas de um hexassacarídeo composto por uma unidade de ácido glucurônico, duas unidades de α-glucose e três unidades de rhamnose. Neste estudo, os autores demonstraram que os mecanismos pelos quais PS ativa os macrófagos poderiam envolver PKC e PTK (proteína tirosina quinase), ambas envolvidas na transdução de sinais que culminam na produção de espécies reativas de oxigênio e de NO[•] (PETERS-GOLDEN *et al.*, 1991; DONG *et al.*, 1993). Inibidores dessas duas enzimas anulam o efeito de PS na ativação da atividade tumoricida de macrófagos, na produção de TNF-α e NO[•]. Mesmo assim, não foi descartada a hipótese que, para a ativação de macrófagos, PS possa atuar direta e indiretamente sobre outras vias de transdução de sinal (UM *et al.*, 2002).

Estudos com angelana demonstraram que este polissacarídeo induz a expressão do gene da NOS, e conseqüente produção de NO[•], através da ativação de vias metabólicas também envolvendo PTK mas, ao invés de PKC, p38 MAP quinase (proteínas quinases ativadas por mitógenos), de modo semelhante a ação do LPS, porém utilizando diferentes receptores de membrana. Angelana é capaz de sinalizar a

liberação de NO[•] por macrófagos murinos através da ligação com os receptores CD14 e CR3, enquanto a resposta desencadeada por LPS não é mediada por CR3. Este receptor, também chamado CD11b/CD18, Mac-1 e $\alpha_m\beta_2$ -integrina, foi identificado como um receptor de membrana de leucócitos para β -glucanas (JEON *et al.*, 2001).

Os efeitos da α -glucana de *R. celandri* merecem destaque porque são poucos os dados de literatura referentes ao uso de α -glucanas como imunomoduladores. Para galactomananas, os dados referentes a este tipo de atividade também são raros, embora existam relatos recentes de que frações de uma galactomanana isolada de *Trigonella foenum-graecum* aumentaram a atividade fagocítica de macrófagos e promoveram a produção e secreção de IgM em células HB4C5 (RAMESH *et al.*, 2002). Outra galactomanana a apresentar efeitos sobre macrófagos é aquela isolada do líquen *R. celandri* (NOLETO *et al.*, 2002). No entanto, como apresentado no presente trabalho, a galactoglucomanana nativa do líquen *C. ibitipocae* não apresentou atividades imunomoduladoras de macrófagos *in vitro*.

Os resultados que permitem afirmar que a α -glucana exibe propriedades moduladoras de macrófagos são a atividade fagocítica e a elicitora de células para a cavidade peritoneal, além dos efeitos estimuladores *in vivo* das vias de produção de H₂O₂ e NO[•]. Estes efeitos certamente estão envolvidos na atividade antitumoral apresentada por esta molécula contra as células do S-180. Analisando os resultados obtidos nos experimentos *in vivo* e *in vitro*, percebe-se diferenças que sugerem mecanismos distintos para ambas as situações.

Os estudos aqui apresentados tiveram um enfoque mais fenomenológico do que mecanístico, entretanto, a possibilidade que a α -glucana atue na indução da produção de citocinas não pode ser excluída. Alguns autores descrevem que a produção de IL-1 pode apresentar-se transitoriamente aumentada, voltando rapidamente a valores similares ao controle poucos dias após a inoculação dos polissacarídeos. Esta secreção aumentada de IL-1, logo após a administração do polissacarídeo, tem uma importância chave na ativação das células T, que por sua vez, ativariam mais macrófagos (SAKURAI *et al.*, 1992).

O esquema de tratamento por doses repetidas do polissacarídeo em períodos regulares não apresentou maior eficácia que aquele utilizando uma dose única, resultado que poderia sugerir o envolvimento de outros fatores da resposta imune pelo polímero. Neste aspecto, várias especulações poderiam ser aventadas, incluindo o desenvolvimento do fenômeno da tolerância induzido pelo polissacarídeo (MILLER e MORAHAN, 1992). Muitos estudos são ainda necessários, principalmente aqueles referentes à produção de citocinas específicas, determinação dos efeitos em linfócitos T e avaliação da ativação da imunidade humoral via linfócitos B. O campo para estudos de imunoterapia é bastante vasto e de fato, ainda não se conhece a potencialidade e efetividade com que os polissacarídeos podem contribuir nesta área.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados e discutidos anteriormente permitem que se estabeleçam as seguintes conclusões:

1. A α -D-glucana de *R. celastri* apresenta atividade contra células de S-180. A administração de doses repetidas (200 mg.kg^{-1}) a intervalos regulares não otimiza o efeito antitumoral em relação ao protocolo utilizando uma dose única do polímero.
2. Tratamento *in vitro* de macrófagos com $1000 \text{ }\mu\text{g/ml}$ da α -glucana de *R. celastri* inibe a produção de H_2O_2 na presença de PMA em aproximadamente 65%.
3. O tratamento *in vitro* de macrófagos com $100 \text{ }\mu\text{g/ml}$ da GMS de *C. ibitipocae* estimula em 100% a produção de H_2O_2 .
4. GMS apresentou uma diminuição na viabilidade de macrófagos *in vitro* em aproximadamente 15%, quando foi testada na concentração de $500 \text{ }\mu\text{g/ml}$.
5. GMS inibiu a adesão de células HeLa sobre as moléculas de matriz extracelular laminina e fibronectina. Com relação à primeira, este efeito foi dose-dependente, chegando a inibir ~95% da adesão numa dose de $320 \text{ }\mu\text{g/ml}$ e com relação à segunda, a adesão foi inibida em 25% independente da dose testada.
6. A α -glucana de *R. celastri* apresenta propriedades moduladoras de macrófagos visto que na concentração de 200 mg.kg^{-1} , apresentou um efeito elicitor de células de cerca de 130% após 7 dias de injeção em camundongos, com os valores retornando aos valores similares ao controle em 30 dias; os macrófagos isolados das células da cavidade peritoneal elicidas com α -glucana, se mostraram estimulados quanto a sua atividade fagocítica (cerca de 70%), produção de H_2O_2 (aproximadamente 85%) e NO^* (aproximadamente 50%) também 7 dias após a inoculação do polissacarídeo, com o estímulo retornando gradativamente a valores semelhantes ao controle em 30 dias.

REFERÊNCIAS

6 REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Imunologia celular e molecular**. 3 ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2000. 486 p.
- ABEL, G.; CZOP, J.K. Stimulation of human monocyte β -glucan receptors by glucan particles induces production of TNF- α e IL-1 β . **Int. J. Immunopharmacol.**, v.14, p.1363-1373, 1992.
- ADACHI, Y.; MIO, T.; STRIZ, I.; CARNEVALI, S.; ROMBERGER, D. J.; SPURZEM, J.R.; HEIRES, P.; ILLIG, M. G.; ERTL, R. F.; RENNARD, S. I. Lipopolysaccharide increases fibronectin production and release from culture lung fibroblasts partially through proteolytic activity. **J. Lab. Clin. Med.**, v.127, n.5, p.448-455, 1996.
- ADACHI, Y.; OHNO, N.; YODAMAE, T. Inhibitory effect of β -Glucans on zymosan-mediated hydrogen peroxide production by murine peritoneal macrophages *in vitro*. **Biol. Pharm. Bull.**, v.16, n.5, p.462-467, 1993.
- ADAMS, D. O. Macrophages. **Methods in Enzymology**, v. 58, p. 494-506, 1979.
- ARTHUR, M. J. P.; JOWALSKI-SAUNDERS, P.; WRIGHT, R. Corynebacterium parvum-elicited hepatic macrophages demonstrate enhanced respiratory burst activity compared with resident Kupffer cells in the rat. **Gastroenterology**, v. 91, p. 174-181, 1986.
- ASSEF, M.L.M. Alterações estruturais do sarcoma 180 tratado com a α -glucana do liquen *Ramalina celastri*. Curitiba. 62p. Dissertação (Mestrado em Morfologia, área de concentração Biologia Celular) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 1998.
- BABIOR, M.B. The respiratory burst oxidase. **Adv. Enzymol.**, v.65, p.49-95, 1992.
- BADWAY, J.A.; KARNOVSKI, M.L. Active oxygen species and the function of phagocytic leukocytes. **Annual Rev. Biochem.**, Palo Alto, USA, v.49, p.695, 1980.
- BARINAGA, M. Origins of lichen fungi explored. **Science**, Washington, v.268, p.1437, 1995.
- BARON, M.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. Isolation and identification of a linear (1 \rightarrow 3)-linked β -D-glucan and other carbohydrate components of the lichen *Stereocaulon ramulosum* (Sw.) Rausch. **Carbohydr. Res.**, v.177, p.235-239, 1988.
- BARON, M.; IACOMINI, M.; FANTA, E.; GORIN, P. A. J. Galactomannan, lichenan and isolichenan from the polysaccharide-rich lichen *Newropogon aurantiaco-ater*. **Phytochemistry**, v. 30, p. 3125-3131, 1991.
- BARRETO-BERGTER, E.; HOGGE, L.; GORIN, P. A. J. Gas-liquid chromatography of partially methylated alditol acetates on capillary columns of OV-17 and OV-225. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v.97, p.147-150, 1981.
- BASTOS, M.T.; OLIVEIRA, M.B.M.; CAMPELLO, A.P., KLUPPEL, M.L. Methotrexate: studies on cellular metabolism. IV. Effect on the mitochondrial oxidation of cytosolic-reducing equivalents in HeLa cells. **Cell Biochem Funct.**, v.8, n.4, p.199-203, 1990.
- BERTON, G.; GORDON, S. Modulation of macrophages mannosyl-specific receptors by cultivation on immobilized zymosan. Effects on superoxide-anion release and phagocytosis. **Immunol.**, v.49, p.705-715, 1983.

- BLASCHEK, W.; KÄSBAUER, J.; KRAUS, J.; FRANZ, G. *Pythium aphanidermatum*: culture, cell wall composition, isolation and structure of antitumor storage and solubilised cell-wall (1→3), (1→6)-β-D-glucans. **Carbohydr. Res.**, v.231, p.293-307, 1992.
- BOHN, J. A.; BeMILLER, J. N. (1→3)-β-D-glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. **Carbohydr. Polym.**, v.28, p. 3-14, 1995.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, **Anal. Biochem.**, v.72, p. 248-254, 1976.
- BRADNER, W.T.; CLARKE, D.A.; STOCK, C.C. Stimulation of host defense against experimental cancer. I. Zymosan and Sarcoma 180 in mice. **Cancer Res.**, Baltimore, v.18, p.347-351, 1958.
- BRATTGJERD, S.; EVENSEN, O.; LAUVE, A. Effect of injected yeast glucan on the activity of macrophages in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., as evaluated by *in vitro* hydrogen peroxide production and phagocytic capacity. **Immunology**, v.83, p.288-294, 1994.
- BURGALETA, C.; TERRITO, M.C.; QUAN, S.G.; GOLDE, D.W. Glucan-activated macrophages: Functional characteristics and surface morphology. **J. Reticuloendothel. Soc.**, v.23, n.3, p.195-204, 1978.
- CANAANI, O.; RONEN, R.; GARTY, J.; CAHEN, D.; MALKIN, S.; GALUN, M. Photoacoustic study of the green alga *Trebouxia* in the lichen *Ramalina duriae* in vivo. **Photosynthesis Res.**, Dordrecht, v.5, p.297-306, 1984.
- CARBONERO, E.R.; STUELP-CAMPELO, P.M.; MELLINGER, C.G.; ROSADO, F.R.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. Chemical modifications and *in vitro* anticoagulant activity of the polysaccharides from *Ramalina usnea*. **Fourth International Symposium on Natural Polymers and Composites**, 2002, in press.
- CARNEIRO-LEÃO, A. M. A. Atividade antitumoral dos polissacarídeos nativos e quimicamente modificados do líquen *Ramalina celastri*. Curitiba. 147p. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 1998.
- CARNEIRO-LEÃO, A. M. A.; BUCHI, D. F.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J.; OLIVEIRA, M. B. M. Cytotoxic effect against HeLa cells of polysaccharides from the lichen *Ramalina celastri*. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, v.24, n.4, p.1-5, 1997.
- CARSWELL, E.A.; OLD, L.J.; KASSEL, R.J.; GREEN, S.; FIORE, N.; WILLIAMSON, B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumours. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.72, p. 3666-3670, 1975.
- CAVALCANTI, L. H.; MAIA, R.F.; LIMA, E. O.; XAVIER-FILHO, L. Atividade antimicrobiana "in vitro" da atranovina. **Rev. Microbiol.**, v.14, n.3, p.168-171, 1983.
- CERENIUS, L.; LIANG, Z.; DUVIC, B.; KEYSER, P.; HELLMAN, U.; PALVA, E. T.; IWANAGA, S.; SÖDERHALL, K. Structure and biological activity of a 1,3-β-D-glucan-binding protein in crustacean blood. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.269, n.47, p.29462-29467, 1994.
- CHANDA, N. B.; HIRST, E. L.; MANNERS, D. J. A comparison of isolichenin and lichenin from Iceland Moss (*Cetraria islandica*). **J. Chem. Soc.**, p.1951-1958, 1957.
- COHN, Z. A. The activation of mononuclear phagocytes: fact, fancy and future. **J. Immunol.**, v.121, n.3, p.813-816, 1978.

- COLUMBO, M.; BOCHNER, B. S.; MARONE, G. Human skin mast cells express functional β_1 integrins that mediate adhesion to extracellular matrix proteins. **J. Immunol.**, v.154, n11, p.6058-6064, 1995.
- COMPTON, S. J.; JONES, C. G. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. **Anal. Biochem.**, Orlando, FL, v.151, p.369-374, 1985.
- COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. **Robbins: Pathologic basis of disease**. 5 ed, Philadelphia: W. B. Saunders Company, p.11-13, 1994.
- CRAWFORD, R. M.; FINBLOOM, D. S.; CHARA, J.; PAUL, W. E.; MELTZER, M. S. B-cell stimulatory factor-1 (IL-4) activates macrophages for increased tumoricidal activity and expression of Ia antigens. **J. Immunol.**, v.139, p.135-141, 1987.
- CULBERSON, C. F. Chemical guide to lichen products. In: _____ **Chemical and botanical guide to lichen products**. North Carolina: The University of North Carolina Press, 1969, p.73-88.
- CUNHA, F.Q.; ASSREUY, J.; MONCADA, S.; LIEW, F.Y. Phagocytosis and induction of oxide nitric synthase in murine macrophages. **Immunology**, v.79, p.408-411, 1993.
- CZECZUGA, B.; CORONA, L.F. Carotenoids in lichens from Argentina. **Biochemical Systematics and Ecology**, London, v.15, p.519-522, 1987.
- CZECZUGA, B.; XAVIER-FILHO, L. Investigations on carotenoids in lichens. VII. Some lichens from Brazil. **Rev. Brasil. Biol.**, v.47, n.1-2, p.243-246, 1987.
- DAMONTE, E.B.; NEYTS, J.; PUJOL, C.A.; SNOECK, R.; ANDREI, G.; IKEDA, S.; WITVROUW, M.; REYMEN, D.; HAINES, H.; MATULEWICZ, M.C.; CEREZO, A.S.; COTO, C.E.; De CLERCQ, E. Antiviral activity of a sulfated polysaccharide from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*. **Biochem. Pharmacol.**, v.47, 2187-2192, 1994.
- de CARVALHO, D.D.; SCHMITMEIER, S.; NOVELLO, J.C.; MARKLAND, F.S. Effect of BJcuL (a lectin from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*) on adhesion and growth of tumor and endothelial cells. **Toxicon.**, v.39, n.10, p. 1471-1476, 2001.
- DEMBITSKY, V. M.; REZANKA, T.; BYCHEK, I. A. Seasonal variation of lipids and fatty acids from tree-growing lichens of the genus *Physcia*. **Phytochemistry**, Oxford, v.36, n.3, p.601-608, 1994.
- DEMLEITNER, S.; KRAUS, J.; FRANZ, G. Synthesis and anti-tumor activity of derivatives of curdlan and lichenan branched at C-6. **Carbohydr. Res.**, v.226, p.239-246, 1992.
- Di LUZIO, N.R. Update on the immunomodulating activities of glucans. **Springer Semin. Immunopathol.**, v.8, p.384-400, 1999.
- DING, Q.; ZHANG, L.N.; ZENG, F.B. Influence of molecular weight and periodate-modification of beta-D-glucans from *Poria cocos sclerotium* on antitumor activities. **Chinese J. Polym. Sci.**, v.16, n.1, p.62-66, 1998.
- DONG, Z.; O'BRIAN, C.A.; FIDLER, I.J. Activation of tumoricidal properties in macrophages by lipopolysaccharide requires protein-tyrosine kinase activity. **J. Leukocyte Biol.**, v.53, p.53-60, 1993.
- DUAN, X.; ACKERLY, M.; VIVIER, E.; ANDERSON, P. Evidence for involvement of β -glucan-binding cell surface lectins in human natural killer cell function. **Cell Immunol.**, v.157, p.393-402, 1994.

- DUARTE, M.E.R.; NOSEDA, D.G.; NOSEDA, M.D.; TULIO, S.; PUJOL, C.A.; DAMONTE, E.B. Inhibitory effect of sulfated galactans from the marine alga *Bostrychia montagnei* on herpes simplex virus replication *in vitro*. **Phytomed.**, v.8, n.1, p.53-58, 2001.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Anal. Chem.**, Washington, v.28, p.350-356, 1956.
- ELIAS, M. C. Q. B.; VEIGA, S. S.; GREMSKI, W.; BRENTANI, R. R. Cellular adhesion to laminin involves a chondroitin sulfate proteoglycan. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.29, n.9, p.1247-1249, 1996.
- ERICKSON, A.C.; COUCHMAN, J.R. Still more complexity in mammalian basement membranes. **J. Histochem. Cytochem.**, v.48, n.10, p.1291-1306, 2000.
- ESTRADA, A.; YUN, C.H.; van KESSEL, A.; LI, B.; HAUTA, S.; LAARVELD, B. Immunomodulatory activities of oat β -glucan *in vitro* and *in vivo*. **Microbiol. Immunol.**, v.41, n.12, p.991-998, 1997.
- FADOK, V.A.; LASZLO, D.J.; NOBLE, P.W.; WEINSTEIN, L.; RICHES, D.W.H.; HENSON, P.M. Particle digestibility is required for induction of the phosphatidylserine recognition mechanism used by murine macrophages to phagocytose apoptotic cells. **J. Immunol.**, v.151, n.08, p.4274-4285, 1993.
- FANG, F.C. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. **J. Clin. Invest.**, v.99, n.12, p.2818-2825, 1997.
- FLEMING, M.; MANNERS, D. J. The fine structure of isolichenin. **Biochem. J.**, London, v.100, p.24, 1966.
- FUJIMOTO, S.; ORITA, K.; KIMURA, T.; KONDO, T.; TAGUCHI, T.; YOSHIDA, K.; OGAWA, N.; FURUE, H. Clinical evaluation of SPG (schizophyllan) as a therapeutical adjuvant after surgery of gastric cancer-controlled study by an envelope method. **Gan To Kagaku Ryoho**, v.10, p.1135-1145, 1983.
- FUJIMOTO, S.; ORITA, K.; KONDOH, T.; TAGUCHI, T.; YOSHIDA, K.; KIMURA, T. Schizophyllan. **Biotherapy**, v.2, p.500-508, 1988.
- GIFFORD, G.E.; LOHMANN-MATTHES, M.L. γ -Interferon priming of mouse and human macrophages for induction of tumor necrosis factor production by bacterial lipopolysaccharide. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.78, p.121-124, 1987.
- GOLDMAN, R. Characteristics of the β -glucan receptor of murine macrophages. **Exp. Cell Res.**, v.174, p.481-490, 1988.
- GOMAA, K.; KRAUS, J.; ROßKOPF, F.; RÖPER, H.; FRANZ, G. Antitumor and immunological activity of a β 1 \rightarrow 3/1 \rightarrow 6 glucan from *Glomerella cingulata*. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v.118, p.136-140, 1992.
- GORDON, S. **The macrophage home page**. 1996 Disponível em <<http://www.path.ox.ac.uk/sg/>> Acesso em 14 abr. 1999.
- GORIN, P. A. J.; BARON, M.; SILVA, M. L. C.; TEIXEIRA, A. Z. A.; IACOMINI, M. Lichen carbohydrates. **São Paulo: Ciência e Cultura**, v.45, n.1, p.27-36, 1993.
- GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Polysaccharides of the lichens *Cetraria islandica* and *Ramalina usnea*. **Carbohydr. Res.**, v. 128, p. 119-132, 1984.

- GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Structural diversity of D-galacto-D-mannan components isolated from lichens having ascomycetous mycosymbionts. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 142, p.253-267, 1985.
- GORIN, P.A.J., BARON, M., IACOMINI, M. Storage products of lichens. In: GALUN, M. **CRC Handbook of lichenology**. Florida: CRC Press, v.3, p.9-23, 1988.
- GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, J. S. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. **Anal. Biochem.**, v. 126, p. 131-138, 1982.
- GREEN, J.S.; CRAWFORD, R.M.; HOCKMEYER, J.T.; MELTZER, M.S.; NACY, C.A. *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN- γ -stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor- γ . **J. Immunol.**, v.145, n.12, p.4290-4297, 1990.
- HALE, M. E. **How to know the lichens**. 2 ed. Iowa: Brown Company Publishers, 1979. 246p.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals reactive species and toxicology. In ;____ (eds.) **Free radicals in biology and medicine**. New York: Oxford University Press, 1999, p.544-616.
- HAN, S.B.; PARK, S.H.; LEE, K.H.; LEE, C.W.; LEE, S.H.; KIM, H.C.; KIM, Y.S.; LEE, H.S.; KIM, H.M. Polysaccharide isolated from the radix of *Platycodon grandiflorum* selectively activates B cells and macrophages but not T cells. **Int. Immunopharmacol.**, v.1, p.1969-1978, 2001.
- HAWKSWORTH, D.L.; HILL, D.J. **The lichen-forming fungi**. Glasgow: Blackie & Sons, 1984.
- HAWORTH, R.; GORDON, S. Isolation of an measuring the function of professional phagocytes: murine macrophages. **Methods Microbiol.**, v.25, p. 287-310, 1998.
- HERSH, E.M.; TAYLOR, C.W. Immunotherapy by active immunization: use of nonspecific stimulants and immunomodulators. In: DeVITA, V.T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S.A. (eds) **Biologic therapy of cancer**. Philadelphia: Lippincott, 1991, p.613-626.
- HO, C.Y.; LO, T.W.C.; LEUNG, K.N.; FUNG, K.P.; CHOY, Y.M. The immunostimulating activities of anti-tumor polysaccharide from K1 capsular (polysaccharide) antigen isolated from *Klebsiella pneumoniae*. **Immunopharmacol.**, v.46, p.1-13, 2000.
- HOLZMANN, G.; LEUCKERT, C. Applications of negative fast atom bombardment and MS/MS to screening of lichen compounds. **Phytochemistry (OXF)**, Oxford, v.29, n.7, p.2277-2283, 1990.
- HRANISAVLJEVIC-JAKOVLJEVIC, M.; MILJKOVIC-STOJANIVIC, J.; DIMITRIJEVIC, R.; MICOVIC, V. M. An alkali-soluble polysaccharide from teh oak lichen *Cetraria islandica* (L.) Ach. . **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v.39, p.115-123, 1975.
- IACOMINI, M.; GORIN, P.A.J.; BARON, M.; TULLOCH, A.P.; MAZUREK, M. Novel D-glucans obtained by dimethyl sulphoxide extraction of the lichens *Letharia vulpina*, *Actinogyra muehlenbergii* and an *Usnea* sp. **Carbohydr. Res.**, v.176, p.117-126, 1988.
- IACOMINI, M.; SCHENEIDER, C.L.; GORIN, P. A. J. Comparative studies on the polysaccharides of *Cladonia alpestris* (Reindeer Moss), *Cladonia confusa* and *Cladonia amaurocraea*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 142, p.237-251, 1985.

- IACOMINI, M.; ZANIN, S.M.W.; FONTANA, J.D. Isolation and characterization of β -D-glucan, heteropolysaccharide, and trehalose components of the Basidiomycetous lichen *Cora pavonia*. **Carbohydr. Res.**, v.168, p.55-65, 1987.
- ISAAC, L. Células do sistema imune. In: CALICH, V.L.G.; VAZ, C.A.C. (eds.) **Imunologia básica**. 1ed, São Paulo: Artes Médicas, 1989, p. 31-48.
- ITO, H.; SHIMURA, K.; ITOH, H.; KAWADE, M. Antitumor effects of a new polysaccharide-protein complex (ATOM) prepared from *Agaricus blazei* (Iwade satrain 101) "Himematsutake" and its mechanisms in tumor-bearing mice. **Anticancer Res.**, v.17, n.1A, p.277-284, 1997.
- JAMES, S.L. Role of nitric oxide in parasitic infections. **Microbiol. Rev.**, v.59, n.4, p.533-547, 1995.
- JEON, Y. J.; HAN, S. B.; AHN, K. S.; KIM, H. M. Activation of NF- κ B/Rel in angellan-stimulated macrophages. **Immunopharmacol.**, v. 43, p. 01-09, 1999.
- JEON, Y. J.; HAN, S. B.; LEE, S. H.; KIM, H. C.; AHN, K. S.; KIM, H. M. Activation of mitogen-activated protein kinase pathways by angelan in murine macrophages. **Int. Immunopharmacol.**, v.1, p. 237-245, 2001.
- JONES, J. K. N.; STOODLEY, R. J. Fractionation using copper complexes. **Methods Carbohydr. Chem.**, New York, v. 5, p. 36-38, 1965.
- KAEFFER, B.; BENARD, C.; LAHAYE, M.; BLOTTIERE, H.M.; CHERBUT, C. Biological properties of ulvan, a new source of green seaweed sulfated polysaccharides, on cultured normal and cancerous colonic epithelial cells. **Planta Med.**, v.65, n.6, p. 527-531, 1999.
- KARNOVSKY, M.L.; LAZDINS, J.K. Biochemical criteria for activated macrophages. **J. Immunol.**, v.121, n.3, p.809-813, 1978.
- KASHIWADANI, H.; KALB, K. The genus *Ramalina* in Brazil. **Lichenologist**, London, v.25, p.1-31, 1993.
- KESHAV, S.; CHUNG, L.P.; GORDON, S. Macrophage products in inflammation. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v.13, n.5, p. 439-447, 1990.
- KIHO, T.; SHIOSE, Y.; NAGAI, K.; UKAI, S. Polysaccharides in fungi. XXX. Antitumor and immunomodulating activities of two polysaccharides from the fruiting bodies of *Armillariella tabescens*. **Chem. Pharm. Bull.**, v.40, n.8, p. 2110-2114, 1992.
- KIHO, T.; YOSHIDA, I.; NAGAI, K.; UKAI, S.; HARA, C. (1 \rightarrow 3)- α -D-Glucan from an alkaline extract of *Agrocybe cylindracea*, and antitumor activity of its O-(carboxymethyl)ated derivatives. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v.189, p.273-279, 1989.
- KIM, H.M, HAN, S.B., OH, G.T., KIM, Y.H., HONG, D.H., HONG, N.D., YOO, I.D. Stimulation of humoral and cell mediated immunity by polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. **Int. J. Immunopharmac.**, Great Britain, v.18, n.5, p. 295-303, 1996.
- KJÖLBERG, O.; KVERNHEIM, A.L. Studies on the polysaccharides. III. The structure of alkali-soluble polysaccharides in *Umbilicaria pustulata* (L.) Hoffm. And *Umbilicaria spodochroa* (Arch.) Hoffm. **Acta Chem. Scan.**, v.43, p.280-285, 1989.
- KOJIMA, T.; TABATA, K.; ITOH, W.; YANAKI, T. Molecular weight dependence of the antitumor activity of Schizophyllan. **Agric. Biol. Chem.**, v.50, n.1, p.231-232, 1986.

- KRAUS, J.; FRANZ, G. β -(1 \rightarrow 3)-Glucans: anti-tumor activity and immunostimulation. In: LATGE, J.P.; BOUCIAS, D. (eds) **Fungal cell wall and immune response**. Springer-Verlang: Berlin, p.31-444, 1991.
- LADÁNYI, A.; TÍMÁR, J.; LAPIS, K. Effect of lentinan on macrophage cytotoxicity against metastatic tumor cells. **Cancer Immunol Immunother.**, v. 36, p. 123-126, 1993.
- LEUNG, M.Y.K.; FUNG, K.P.; CHOY, Y.M. The isolation and characterization of an immunomodulatory and anti-tumor polysaccharide preparation from *Flammulina velutipes*. **Immunopharmacol.**, v.35, p.255-263, 1997.
- LIANG, J.; MELICAN, D.; CALRO, L.; PALACE, G.; FISETTE, L.; ARMSTRONG, R.; PATCHEN, M.L. Enhanced clearance of a multiple antibiotic resistant *Staphylococcus aureus* in rats treated with PGG-glucan is associated with increased leukocyte counts and increased neutrophil oxidative burst activity. **Int. J. Immunopharmacol.**, v.20, p.595-614, 1998.
- LIEW, F.Y.; YUN, L.; MILLOTT, S. Tumor necrose factor- γ synergizes with IFN- γ in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. **J. Immunol.**, v.145, n.12, p. 4306-4310, 1990.
- LIMA, M. M. S.; ONO, L.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M. R. Natural and sulphated polysaccharides from Caesalpinaceae seeds. **Latim Amer. Apl. Res.**, v.26, p.1-3, 1996.
- LINDBERG, B.; MISIORNY, A.; WACHTMEISTER, C. A. Studies on the chemistry of lichens. IV. Investigation of the low-molecular carbohydrate constituents of different lichens. **Acta Chem. Scand.**, Copenhagen, v.7, n^o4, p.591-595, 1953.
- LINDBERG, B.; SILVANDER, B-G.; WACHTMEISTER, C. A. Studies on the chemistry of lichens. XVIII. 3-O- β -D-glucopyranosyl-D-mannitol from *Peltigera aphthosa* (L). Willd. **Acta Chem. Scand.**, Copenhagen, v.17, p.1348-1350, 1963.
- LINDBERG, B.; SILVANDER, B-G.; WACHTMEISTER, C. A. Studies on the chemistry of lichens. XIX. Mannitol glycosides in *Peltigera* species. **Acta Chem. Scand.**, Copenhagen, v.18, p.213-216, 1964.
- LINDBERG, B.; WICKBERG, B. Studies on the chemistry of lichens. XVII. The structure of umbilicin. **Acta Chem. Scand.**, Copenhagen, v.16, n.9, p.2240-2244, 1962.
- LINHARES, S.; GEWANDSZAJDER, F. **Biologia**. 4 ed. São Paulo: Ed. Ática. p.119-122, 1985.
- LIU, J.M.; HAROUN-BOUHEDJA, J.; BOISSON-VIDAL, C. Analysis of the in vitro inhibition of mammary adenocarcinoma cell adhesion by sulphated polysaccharides. **Anticancer Res.**, v.20, n.5A, p.3265-3271, 2000.
- MA, Y.; MIZUNO, T.; ITO, H. Antitumor activity of some polysaccharides isolated from a chinese mushroom, "Huangmo", the fruiting body of *Hohenbuehelia serotina*. **Agric. Biol. Chem.**, vol.55, n.11, p.2701-2710, 1991.
- MAEDA, Y.Y.; CHIHARA, G. Lentinan and other antitumoral polysaccharides. In: WAGNER, H., editor. **Immunomodulatory agents from plants**. Basel: Birkhauser Verlang, p.203-223, 1999.
- MAEDA, Y.Y.; WATANABE, S.T.; CHIHARA, C.; ROKUTANDA, M. Denaturation and renaturation of a β -1,6:1,3-glucan, lentinan, associated with expression on T-cell-mediate responses. **Cancer Res.**, v.48, p.671-675, 1988.

- MARCELLI, M. **Fungos liquenizados: Taxonomia e características de importância taxonômica**. Apostila do curso do mesmo nome ministrado no Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná, 1995.
- MARKMAN, M. Intracavitary administration of biological agents. **J. Biol. Response Mod.**, v.06, p.404-409, 1987.
- MARTIN, J.H.; EDWARDS, S.W. Changes in mechanisms of monocyte/macrophage-mediated cytotoxicity during culture. Reactive oxygen intermediates are involved in monocyte-mediated cytotoxicity, whereas reactive nitrogen intermediates are employed by macrophages in tumor cell killing. **J. Immunol.**, v.150, p. 3478-3486, 1993.
- MARTINICHEN, J.C. Ação anticoagulante de polissacarídeos modificados através de reações de sulfatação. Curitiba. 61p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2001.
- MARUYAMA, H.; YAMAZAKI, K.; MUROFUSHI, S.; KONDA, C.; IKEKAWA, T. Antitumor activity of *Sarcodon aspratus* (BERK) S. ITO and *Ganoderma lucidum* (FR.) KARST. **J. Pharmacobiodyn.**, v. 12, p.118-123, 1989.
- MAYER, B.; HEMMENS, B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. **Trends in Biochem. Sci.**, v.22, p.477-481, 1997.
- MICENO, A. M.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Galactomannan and isolichenan components of the carbohydrate-rich lichen *Ramalina ecklonii* (Spreng.) Mey. & Flot. **Agric. Biol. Chem.**, v.55, p.1391-1392, 1991.
- MILLER, J.F.A.P.; MORAHAN, G. Peripheral T cell tolerance. **Annual Rev. Immunol.**, v.10, p.51-69, 1992.
- MISAKI, A.; KISHIDA, E.; KAKUTA, M.; TABATA, K. Antitumor fungal (1→3)-β-D-glucans: structural diversity and effects of chemical modification. In: YALPANI, M. (ed) **Carbohydrates and carbohydrates polymers**. ATL Press Mount Prospect, Illinois, p.116-129, 1993.
- MISHIMA, T.; MURATA, J.; TOYOSHIMA, M.; FUJII, H.; NAKAJIMA, M.; HAYASHI, T.; KATO, T.; SAIKI, I. Inhibition of tumor invasion and metastasis by calcium spirulan (Ca-SP), a novel sulfated polysaccharide derived from a blue-green alga, *Spirulina platensis*. **Clin. Exp. Metastasis**, v.16, n.6, p.541-550, 1998.
- MIWA, M.; SHIBATA, K.; NAGAYAMA, K.; AIKAWA, K. Nitric oxide formation by macrophages stimulated with water extracts from meats and offals. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v.61, n.11, p.1953-1954, 1997.
- MIZUNO, M.; MORIMOTO, M.; MINATO, K.; TSUCHIDA, H. Polysaccharides from *Agaricus blazei* stimulate lymphocyte T-cell subsets in mice. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v.63, n.3, p.434-437, 1998.
- MIZUNO, M.; SHIOMI, Y.; MINATO, K.; KAWAKAMI, S.; ASHIDA, H.; TSUCHIDA, H. Fucogalactan isolated from *Sarcodon aspratus* elicits release of tumor necrosis factor-α and nitric oxide from murine macrophages. **Immunopharmacol.**, v.46, p. 113-121, 2000.
- MIZUNO, T.; OHSAWA, K.; HAGIWARA, N.; KUBOYAMA, R. Fractionation and characterization of antitumor polysaccharides from Maitake, *Grifola frondosa*. **Agric. Biol. Chem.**, v.50, p. 1679-1688, 1986.

- MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. Nitric Oxide: Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. **Pharmacological Reviews.**, vol 43, p.109-142, 1994.
- NATHAN, C.F. Regulation of macrophages oxidative metabolism and antiparasitic activity. In: van FURTH, R. **Mononuclear phagocytes. Characteristics, physiology and function.** Boston: Martinus Nijhoff, p.411-420, 1985.
- NATHAN, C.F. Secretory products of macrophages. **J. Clin. Invest.**, v.79, p. 319-326, 1987.
- NISHIKAWA, Y.; MICHISHITA, K.; KURONO, G. Studies on the water soluble constituents of lichens. I. Gas chromatographic analyses of low molecular weight carbohydrates. **Chem. Pharm. Bull. (Tokio)**, v.21, n.5, p.1014-1019, 1973.
- NISHIKAWA, Y.; TANAKA, M.; SHIBATA, S.; FUKOOKA F. Polysaccharides of lichens and fungi. IV. Antitumor active *O*-acetylated pustulan-type glucans from lichens of *Umbilicaria* species. **Chem. Pharm. Bull.**, v.18, p.1431-1434, 1970.
- NISHINO, T.; AIZU, Y.; NAGUMO, T. The relationship between the molecular weight and the anticoagulant activity of two types of fucan sulfates from the brown seaweed *Ecklonia kurome*. **Agric. Biol. Chem.**, Tokio, v.55, n.3, p.791-796, 1991.
- 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 vanadiyl (IV) complex on peritoneal macrophages and leishmanicidal activity. **Mol. Cel. Biochem.**, v.233, p.73-83, 2002.
- OHYA, Y.; NISHIMOTO, T.; MURATA, J.; OUCHI, T. Immunological enhancement activity of muramyl dipeptide analogue/CM-curdlan conjugate. **Carbohydr. Polymers**, England, v.23, p. 47-54, 1994.
- OKASAKI, M., CHIBA, N., ADACHI, Y., OHNO, N., YODAMAE, T. Signal transduction pathway on β -glucans triggered hydrogen peroxide production by murine macrophages *in vitro*. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 19, n.1, p. 18-23, 1996.
- OKASAKI, M.; ADACHI, Y.; OHNO, N.; YODAMAE, T. Structure-activity relationship of (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans in the induction of cytokine production from macrophages, *in vitro*. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 18, n.10, p. 1320-1327, 1995.
- OLAFSDOTTIR, E.S., INGÓLFSDOTTIR, K. Polysaccharides from lichens: structural characteristics and biological activity. **Planta Med.**, v.67, p.199-208, 2001.
- OLAFSDOTTIR, E.S.; OMARSDOTTIR, S.; PAULSEN, B.S.; JURCIC, K.; WAGNER, H. Rhamnopyranosylgalactofuranan, a new immunologically active polysaccharide from *Thamnia subuliformis*. **Phytomed.**, v.6, n.4, p.273-279, 1999.
- PASQUIER, C.; MARTY, N.; DOURNES, J.L.; CHABANON, G.; PIPY, B. Implication of neutral polysaccharides associated to alginate in inhibition of murine macrophage response to *Pseudomonas aeruginosa*. **FEMS Microbiol. Letters**, v.147, p.195-202, 1997.
- PEAT, S.; WHELAN, W, J.; ROBERTS, J. G. The structure of lichenin. **J. Chem. Soc.**, p.3916-3924, 1957.
- PEREIRA, E.C.; NASCIMENTO, S.C.; LIMA, R.C.; SILVA, N.H.; OLIVEIRA, A.F.M.; BANDEIRA, E.; BOITARD, M.; BERIEL, H.; VICENTE, C.; LEGAZ, M.E. Analysis of *Usnea fasciata* crude extracts with antineoplastic activity. **Tokai J. Exp. Clin. Med.**, v.19, n.1-2, p.47-52, 1994.

PETERS-GOLDEN, M.; McNISH, R.W.; SPORN, P.H.; BALAZOVICH, K. Basal activation of protein kinase C in rat alveolar macrophages: implications for arachidonate metabolism. **Am. J. Physiol.**, v.261, p.L462-471, 1991.

PHILLIPS, H. J. Dye exclusion test for cell viability. In: KRUSE, M. K. (Ed.) **Tissue culture: methods and application**. New York: Academic Press, p.406-408, 1973.

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

POPOV, S. V.; POPOVA, G. Y.; OVODOVA, R. G.; BUSHNEVA, A. O.; OVODOV, Y. S. Effects of polysaccharides from *Silene vulgaris* on phagocytes. **Int. J. Immunopharmacol.**, v.21, p. 617-624, 1999.

PORTNOY, D.A. **Bacterial pathogenesis: Innate immunity and inflammation I**. Disponível em <<http://mcb.berkeley.edu/courses/mcb103/reviewprevious-2002.htm>> Acesso em 25 jan. 2002.

PRADO, S.R.T.; GORIN, P.A.J.; STUELPEL, P.M.; HONDA, N.K.; IACOMINI, M. An unusual juxtaposition of polysaccharide components of *Collema leptosporum*. **Carbohydr. Polymers**, v. 40, p.271-276, 1999.

PRINCE, R.C.; GUNSON, D.E. Rising interest in nitric oxide synthase. **Trends Biochem. Sci.**, v. 18, p. 35-36, 1993.

RAMESH, H.P.; YAMAKI, K.; TSUSHIDA, T. Effect of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) galactomannan fractions on phagocytosis in rat macrophages and on proliferation and IgM secretion in HB4C5 cells. **Carbohydr. Polymers**, v.50, n.1, p. 79-83, 2002.

REILLY, T. P.; BELLEVUE, F. H.; WOSTER, P. M.; SVENSSON, C. K. Comparison of the *in vitro* cytotoxicity of hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone. **Biochem. Pharmacol.**, v.55, p. 803-810, 1998.

REMENTERÍA, A.; ABAITUA, F.; GARCIA-TOBALINA, R.; HERNANDO, F.; PONTÓN, J.; SEVILLA, M. J. Resistance to candidiasis and macrophage activity in chitin-treated mice. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 19, p. 223-230, 1997.

RICHMAN, S.P.; HERSH, E.M.; GUTTERMAN, J.U.; HORTOBAGYI, G.N.; BLUMENSCHNEIN, G.R.; RIOS, A. RIBI, E. Administration of BCG cell wall skeleton into malignant effusions: toxic and therapeutic effects. **Cancer Treat. Rep.**, v.65, n.5-6, p.383-387, 1981.

ROCHA, H.A.; FRANCO, C.R.; TRINDADE, E.S.; CARVALHO, L.C.; VEIGA, S.S.; LEITE, E.L.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B. A fucan from the brown seaweed *Spatoglossum schröderi* inhibits chinese hamster ovary cell adhesion to several extracellular matrix proteins. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.34, n.5, p.621-626, 2001.

RODERIC, C. Lichens. In: _____ **Symbiotic fungi**. London: John Willey & Sons, 1977. p.226-253.

ROITT, I.M.; BROSTOFF, J.; MALE, D.K. **Immunology**. 6 ed. Edinburgh: Mosby, 2001.

ROOT, R.K.; METCALF, J.A. H₂O₂ release from human granulocytes during phagocytosis. Relationship to superoxide anion formation and cellular catabolism of H₂O₂: studies with normal and cytochalasin B-treated cells. **J. Clin. Invest.**, n.60, n.6, p.1266, 1977.

- ROSA, L.F.B.P.C.; CURI, R.; MURPHY, C.; NEWSHOLME, P. Effect of adrenaline and phorbol myristate acetate or bacterial lipopolysaccharide on stimulation of pathways of macrophage glucose, glutamine and O₂ metabolism. **Biochem. J.**, Great Britain, v. 310, p.709-714, 1995.
- RUOSLAHTI, E. Integrins as signaling molecules and targets for tumor therapy. **Kidney Int.**, v.51, n.5, p.1413-1417, 1997.
- RYVES, J.W.; EVANS, A.T.; OLIVIER, A.R.; PARKER, J.P.; EVANS, J.F. Activation of the PKC isotypes α , β 1, γ , δ e ϵ by phorbol ester of different biological activities. **Fed. Eur. Biochem. Fed.**, v.288, n.1-2, p.5-9, 1991.
- SAITÔ, H.; YOSHIOKA, Y.; UEHARA, N.; AKETAGAWA, J.; TANAKA, S.; SHIBATA, Y. Relationship between conformation and biological response for (1→3) β -D-glucans in the activation of coagulation Factor G from limulus ameobocyte lysate and host-mediated antitumor activity. Demonstration of single-helix conformation as a stimulant. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v.217, p.181-190, 1991.
- SAKURAI, T.; OHNO, N.; YODAMAE, T. Intravenously administered (1→3)- β -D-glucan, SSG, obtained from *Sclerotinia sclerotiorum* IFO 9395 augments murine peritoneal macrophage function *in vivo*. **Chem. Pharm. Bull.**, vol.40, n.8, p.2120-2124, 1992.
- SAKURAI, T.; KAISE, T.; YODAMAE, T.; MATSUBARA, C. Different role of serum components and cytokines on alveolar macrophage activation by soluble fungal (1→3)- β -D-glucan. **Eur J Pharmacol.**, v. 334, n.2-3, p. 255-263, 1997.
- SASAKI, T., ABIKO, N., UCHIDA, H., TANAKA, M., NITTA, K., YOSHIOKA, Y., NOMURA, H. Antitumor activity of tetrahydro-2-furanyl- and tetrahydro-2-pyranyl-glucans obtained by chemical modification of (1→3)- β -D-glucan from *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* IFO 13140 and its lower molecular weight glucans. **Cancer. Treat. Rep.**, Washington, v.67, n.3, p.275-280, 1983.
- SEGAL, A. W.; ABO, A. The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes. **Trends Biochem. Sci.**, v. 18, n.2, p. 43-47, 1993.
- SLADOWSKI, D.; STEER, S.J.; CLOTHIER, R.H.; BALLS, M. An improved MTT assay. **J. Immunol. Meth.**, v.157, p.203-207, 1993.
- SLAVKOVSKY, P. **Macrophages and monocytes**. Disponível em <<http://nic.sav.sk/logos/books/scientific/node21.html>> Acesso em 28 jul. 2002.
- SOEDA, S.; ISHIDA, S.; SHIMENO, H.; NAGAMATSU, A. Inhibitory effect of oversulfated fucoidan on invasion through reconstituted basement membrane by murine Lewis lung carcinoma. **Jpn. J. Cancer Res.**, v.85, n.11, p.1144-1150, 1994.
- SOTTILE, J.; MOSHER, D. F. N-terminal type I modules required for fibronectina binding to fibroblasts and to fibronectin's III₁ module. **Biochem. J.**, v.323, p.51-60, 1997.
- STEVAN, F.R. Efeitos biológicos "in vitro" de heteropolissacarídeos sulfatados e/ou carboxilados, isolados de macroalgas marinhas, sobre células HeLa. Curitiba. 137p. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2001.
- STONE, B.A.; CLARKE, A.E. **Chemistry and biology of (1→3)- β -glucans**. Victoria, Australia: La Trobe University Press, p.60-75, 283-358, 1992.

- STÜBER, D.; BUCHENAUER, H. Antiviral activity of the glucan lichenan (poly- β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 4)-D-anhydroglucose). II. Studies on the mode of action. **J. Phytopathol.**, v.144, p.45-52, 1996.
- STUELP, P.M.; CARNEIRO-LEÃO, A. M. A.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. The glucans of *Ramalina celastri*: relation with chemotypes of other lichens. **Carbohydr. Polymers**, v.4, p.101-106, 1999.
- STUELP-CAMPELO, P.M.; OLIVEIRA, M.B.M.; LEÃO, A.M.C.; CARBONERO, E.R.; GORIN, P.A.J., IACOMINI, M. Effect of a soluble α -D-glucan from the lichenized fungus *Ramalina celastri* on macrophage activity. **Int Immunopharmacol.**, v.2, n.5, p.691-698, 2002.
- SUGA, T.; SHIIO, T.; MAEDA, Y. Y.; CHIHARA, G. Antitumor activity of lentinan in murine syngeneic and autochthonous hosts and its suppressive effect on 3-methylcholanthrene-induced carcinogenesis. **Cancer Res.**, v.44, p.5132-5137, 1984.
- TAGUCHI, T. Effects of lentinan in advanced or recurrent cases of gastric, colorectal, and breast cancer. **Gan To Kagaku Ryoho**, v.10, p.387-393, 1983.
- TAGUCHI, T.; KANEKO, Y.; CHIHARA, G. Lentinan. **Biotherapy**, v.2, 509-521, 1988.
- TAMKUN, J.W.; DESIMONE, D.W.; FONDA, D.; PATEL, R.S.; BUCK, C.; HORWITZ, A.F.; HYNES, R.O. Structure of integrins, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. **Cell**, Cambridge, v.46, p.271-282, 1986.
- TARABOLETTI, G.; BELOTTI, D.; GIAVAZZI, R.; SOBEL, M.E.; CASTRONOVO, V. Enhancement of metastatic potential of murine and human melanoma cells by laminin receptor peptide G: attachment of cancer cells to subendothelial matrix as a pathway for hematogenous metastasis. **J Natl Cancer Inst.**, v.85, n.3, p.235-240, 1993.
- THOMASSON, D.L.; STEWART, C.C. Macrophage tumoricidal activity: activation and killing kinetics. In: CHIRIGOS, M.A.; MITCHELL, M.; MASTRANGELO, M.J.; KRIM, M. (eds) **Mediation of cellular immunity in cancer by immune modifiers**. New York: Haven Press, p.01-07, 1981.
- TOKUNAKA, K.; OHNO, N.; ADACHI, Y.; TANAKA, S.; TAMURA, H.; YADOMAE, T. Immunopharmacological and immunotoxicological activities of a water-soluble (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan, CSBG from *Candida* spp. **Internat. J. Immunopharmacol.**, v.22, n.5, p.383-394, 2000.
- TOKURA, S.; NISHI, N.; AZUMA, I. Immunological aspects of chitin derivatives. In: YALPANI, M. **Industrial polysaccharides: genetic engineering, structure/ property relations and applications**. Elsevier Science Publishers B. V., Netherlands, vol.3, p.347-362, 1987.
- 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 Rad. Biol. Med.**, v.30, n.4, p.393-402, 2001.
- UM, S.H.; RHEE, D.K.; PYO, S. Involvement of protein kinase C and tyrosin kinase in tumoricidal activation of macrophage induced by *Streptococcus pneumoniae* type II capsular polysaccharide. **Int. Immunopharmacol.**, v.2, p.129-137, 2002.
- USUI, S., TOMONO, Y., SAKAI, M., KIHIO, T., UKAI, S. Preparation and antitumor activities of β -(1 \rightarrow 6) branched (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan derivatives. **Biol. Pharm. Bull.**, Tokyo, v.18, p.1630-1636, 1995.

- VACCARI, M.; SILINGARDI, P.; ARGNANI, A.; HORN, W.; GIUNGI, M.; MASCOLO, M.G.; GRILLI, S.; COLACCI, A. In vitro effects of fenretinide on cell-matrix interactions. **Anticancer Res.**, v.20, p.3059-3066, 2000.
- van OSS, C. J. Phagocytosis: an overview. **Methods in Enzymology**, v.132, p. 3-15, 1986.
- VANE, J.R.; MITCHELL, J.A.; APPLETON, I.; TOMLINSON, A.; BISHOP-BAILEY, D.; CROXTALL, J.; WILLOUGHBY, D.A. Inducible isoforms of cyclooxygenases and nitric-oxide synthase in inflammation. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 91, p. 2046-2050, 1994.
- VARNER, J.A.; CHERESH, D.A. Integrins and cancer. **Curr. Opinion Cell Biol.**, London, v.8, p.724-730, 1996.
- VETVICKA, V.; THORNTON, B.P.; ROSS, G.D. Soluble β -glucan polysaccharide binding to the lectin site of neutrophil or natural killer cell complement receptor type 3 (CD 11 b/CD 18) generates a primed state of the receptor capable of mediating cytotoxicity of iC3b-opsonized target cells. **J. Clin. Invest.**, v. 98, p.50-61, 1996.
- WAKSHULL, E.; BRUNKE-REESE, D.; LINDERMUTH, J.; FISETTE, L.; NATHANS, R.S.; CROWLEY, J.J.; TUFTS, J.C.; ZIMMERMAN, J.; MACKIN, W.; ADAMS, D.S. PGG-Glucan, a soluble β -(1,3)-glucan, enhances the oxidative burst response, microbicidal activity, and activates an NF- κ B-like factor in human PMN: evidence for a glycosphingolipid β -(1,3)-glucan receptor. **Immunopharmacol.**, v.41, p.89-107, 1999.
- WAKUI, A.; KASAI, M.; KONNO, K.; ABE, R.; KANAMARU, R.; TAKAHASHI, K.; NAKAI, Y.; YOSHIDA, Y.; KOIE, H.; MASUDA, H. Randomized study of lentinan on patients with advanced gastric and colorectal cancer. Tohoku lentinan study group. **Gan To Kagaku Ryoho**, v.13, p.1050-1059, 1986.
- WANG, Z. T.; NG, B. T.; YEUNG, H. W.; XU, G. J. Immunomodulatory effect of a polysaccharide-enriched preparation of *Codonopsis pilosula* roots. **Gen. Pharmac.**, v.27, n.8, p.1347-1350, 1996.
- WATANABE, Y.; IWA, T. Clinical value of immunotherapy with the streptococcal preparation OK-432 in non-small cell lung cancer. **J. Biol. Response Mod.**, v.06, n.02, p.169-180, 1987.
- WEISS, G.R. Drugs in the treatment of cancer: Chemotherapy. In: _____ **Clinical Oncology**. New Jersey: Appleton & Lange, 97-109, 1993.
- WHISTLER, R. L.; BUSHWAY, A. A.; SINGH, P. P. Noncitotoxic, antitumor polysaccharides. **Adv. Carbohyd. Chem.**, vol.32, p.235-275, 1976.
- WILLIAMS, D. L.; PRETUS, H. A.; McNAMEE, R. B.; JONES, E. L.; ENSLEY, H. E.; BROWDER, I. W. Development of a water-soluble, sulfated (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan biological response modifier derived from *Saccharomyces cerevisiae*. **Carbohyd. Res.**, vol.235, p.247-257, 1992.
- WORANOVICZ-BARREIRA, S.M.; GORIN, P. A.; SASSAKI, P. L.; TISCHER, C.A.; AHTI, T.; IACOMINI, M. Chemotyping glucans from lichens of the genus *Cladonia*. **Phytochem.**, v.52, p.1069-1074, 1999.
- XAVIER-FILHO, L.; RIZZINI, C. T. **Manual de Liquenologia Brasileira**. 1^a ed. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 1976, 205 p.
- YADOMAE, T.; OHNO, N. Structure-activity relationship of immunomodulating (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan. **Recent Res. Devel. Chem. Pharm. Sci.**, v.1, p.23-33, 1996.

- YAMADA, H.; KAWAGUCHI, N.; OHMORI, T.; TAKESHITA, Y.; TANEYA, S.; MIYAZAKI, T. Structure and antitumor activity of an alkali-soluble polysaccharide from *Cordyceps ophioglossoides*. **Carbohydr Res.**, v.125, n.1, p. 107-115, 1984.
- YOSHIZAWA, Y.; ENOMOTO, A.; TODOH, H.; AMETANI, A.; KAMINOGAWA, S. Activation of murine macrophages by polysaccharide fractions from marine algae (*Porphyra yezoensis*). **Biosci. Biotech. Biochem.**, v.57, n.11, p.1862-1866, 1993.
- YOSHIZAWA, Y.; TSUNEHIRO, J.; NOMURA, K.; ITOH, M.; FUKUI, F.; AMETANI, A.; KAMINOGAWA, S. *In vivo* macrophage-stimulation activity of the enzyme-degraded water-soluble polysaccharide fraction from a marine alga (*Gracilaria verrucosa*). **Biosci. Biotech. Biochem.**, v.60, n.10, p.1667-1671, 1996.
- YURCHENKO, P.; SCHITTNY, J. Molecular architecture of basement membranes. **FASEB J.**, Bethesda, v.4, p.1577-1590, 1990.
- ZETTER, B.R. The basis of site-specific tumor metastasis. **New Eng. J. Med.**, v.322, p.605-612, 1990.
- ZHANG, Z.; VUORI, K.; REED, J. C.; RUOSLAHTI, E. The $\alpha 5\beta 1$ integrin supports survival of cells on fibronectin and up-regulates Bcl-2 expression. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, vol.92, p.6161-6165, 1995.
- ZHUANG, J.C.; WOGAN, G.N. Growth and viability of macrophages continuously stimulated to produce nitric oxide. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.94, p.11875-11880, 1997.

ANEXO



ELSEVIER

International Immunopharmacology 2 (2002) 691–698

International
Immunopharmacology

www.elsevier.com/locate/intimp

Effect of a soluble α -D-glucan from the lichenized fungus *Ramalina celastri* on macrophage activity

Patrícia Ma. Stuelp-Campelo^a, Maria Benigna M. de Oliveira^a, Ana M.A.C. Leão^b,
Elaine R. Carbonero^a, Philip A.J. Gorin^a, Marcello Iacomini^{a,*}

^aDepartment of Biochemistry, Federal University of Paraná, PO Box 19046, 81531-990 Curitiba, PR, Brazil

^bDepartment of Animal Morphology and Physiology, Federal Rural University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

Received 11 September 2001; received in revised form 21 December 2001; accepted 27 December 2001

Abstract

An α -glucan from the lichen *Ramalina celastri* has previously been demonstrated to have cytotoxic effects against HeLa cells. This polysaccharide was studied using Sarcoma-180 cells as tumoral model, and its effects on peritoneal exudate cells, namely, hydrogen peroxide production, phagocytic activity and cell eliciting activity are evaluated. Tumors developing in animals treated with the glucan at a dose of 200 mg kg⁻¹, had a tumor size ~ 80% smaller than that of the control group, showing an impairment of tumor establishment. The polysaccharide was injected into mice not bearing a tumor and after 7, 15 and 30 days the cells were collected from the peritonea. The number of peritoneal cells increased ~ 130% 7 days after inoculation, and then gradually decreased. Hydrogen peroxide production was 75% greater 7 and 15 days after inoculation, on in vitro phorbol myristate acetate (PMA) triggering. Without PMA, the difference in hydrogen peroxide production was not significant. Phagocytic assays using fluorescent beads showed that the uptake increased 7 and 15 days after inoculation, when compared with the control. These results thus suggest a possible role of the *R. celastri* glucan as a biological response modifier (BRM). © 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: α -Glucan; Sarcoma-180 cells; Macrophage; Phagocytosis; Hydrogen peroxide

1. Introduction

A series of several studies has shown that numerous polysaccharides from different biological origins may act as biological response modifiers (BRM). This can occur by activating the immune response involving

macrophages, T helpers and natural killer cells, T cell differentiation, proliferative response of polymorphonuclear cells, interleukins and interferon production, as well as increasing phagocytic activity [1,2]. Among these polysaccharides, many β -glucans have been shown to be involved in a variety of defense responses such as antitumoral and antiviral activities, coagulation system activation, resistance against bacterial infection, macrophage and monocyte activation, although with varying activities for each polymer [1–6]. It is thus possible that the antitumoral activity of some polysaccharides could be caused by macrophage stimulus. In this case, if tumor cells are proliferating faster

Abbreviations: PEC, peritoneal exudate cells; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; VTM, average tumor volume; PBS, phosphate buffer solution; HBSS, Hank's balanced saline solution.

* Corresponding author. Tel.: +55-41-366-3372; fax: +55-41-266-2042.

E-mail address: iacomini@bio.ufpr.br (M. Iacomini).

1567-5769/02/\$ - see front matter © 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

PII: S1567-5769(02)00003-6

than the destructive capacity of macrophages, they could be used to decrease tumor growth by way of macrophage stimulation, one major mechanism for intracellular killing being the production of reactive oxygen intermediates such as the superoxide anion radical and hydrogen peroxide [7].

In contrast to β -glucans, the biological activity of α -glucans has been poorly studied. Lichens are promising sources of α -glucans, which are generally soluble in water and have a linear structure with glycosidic linkages of the type α -(1 \rightarrow 3) and α -(1 \rightarrow 4) [8–11].

Recently, interesting cytotoxic effects against HeLa cells have been described for an α -D-glucan, isolated from the lichen *Ramalina celastri* [12]. This polymer, whose main structures are (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4) linkages, in the proportion of 3:1 (Fig. 1) [10], promoted significant ultrastructural effects, with the membrane “blebs” showing cellular damage. The authors also observed an electron-dense material dispersed throughout the cytoplasm, which was delimited by lysosome-like vesicles, that seems to have originated by polysaccharide internalization. We have now studied if this glucan exhibits *in vivo* activity, using as a model Sarcoma-180 cells (S-180). In addition, considering that the investigation of macrophage functions after its administration would be of great value in elucidating its potential application, we also examine the effects of intraperitoneal *R. celastri* α -glucan administration on some murine peritoneal macrophage functions.

2. Materials and methods

2.1. Polysaccharide extraction and purification of α -glucan from *R. celastri*

The lichen *R. celastri* (Sprengel) Krog & Swinscow was collected in the region of Curitiba, PR, Brazil and identified by Prof. Marcelo Marcelli, Instituto de

Botânica, São Paulo-SP, Brazil. It is deposited as no. 30911 in the Herbario Municipal de Curitiba. The *R. celastri* α -glucan was obtained as described in detail by Stuelp et al. [10]. Briefly, dried and cleaned lichen was extracted with 2:1 (v/v) CHCl_3 -MeOH at 60 °C for 2 h, followed by reflux in 80% aq. MeOH at 60 °C for 3 h. Residual lichen was treated with 2% aq. KOH at 100 °C for 2 h. The extract was filtered, dialyzed after neutralization (HOAc), then frozen, and allowed to thaw at 4 °C overnight, which resulted in formation of a precipitate. This was centrifuged, the supernatant evaporated to a small volume (30 ml), Fehling solution (60 ml) was added, and the resulting precipitate which was not further examined, was isolated by centrifugation (2.2% yield). Following centrifugation of the insoluble Cu^{2+} complex, the supernatant was dialyzed against tap water and then deionized with mixed-bed, ion-exchange resin. The solution was evaporated to a small volume and then freeze-dried. The precipitate was removed and the supernatant contained the α -glucan [10].

2.2. Animals

Female albino Swiss mice (6 to 8 week old) were employed. They were fed with Purine® ration and water *ad libitum*. All recommendations of the National Law (no. 6.638, 05 Nov. 1979) for scientific management of animals were respected.

2.3. *In vivo* α -glucan activity against Sarcoma 180 (S-180)

An *in vivo* assay of α -glucan activity against Sarcoma-180 (S-180) was carried out according to Mizuno et al. [13]. S-180 cells were maintained in the ascite form. Tests were performed by subcutaneous inoculation of ascite cells (1.5×10^6 tumor cells) into the right groin of animals, and a solid tumor developed,

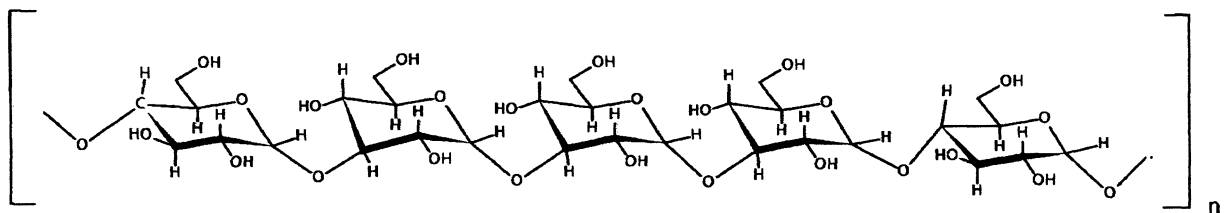


Fig. 1. Predominant structure of the *R. celastri* α -glucan-[α -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)]_n (3:1).

at the injection site. The glucan, dissolved in physiological saline solution at adequate concentrations, was injected intraperitoneally as a single dose, 24 h after tumor implantation. Control animals were inoculated with saline solution (negative control group) or 5-fluorouracil (positive control group—1 mg kg⁻¹). All mice were kept under observation for 5 weeks, and then sacrificed for final evaluation, namely by measurement of the average tumor volume (VTM), and histopathological analysis. Inhibition ratios are calculated as inhibition ratio (%) = 100(A – B)/A, where “A” is the average tumor weight of the negative control group, and “B” is that of the treated group [13]. The complete regression value (inhibition ratio) represents the ratio of the number of mice showing complete regression and the number of mice tested.

2.4. Macrophage experiments

The mice received a single intraperitoneal dose of α -glucan (200 mg kg⁻¹) dissolved in PBS and sterilized by filtration (0.22 μ m). At chosen intervals after administration (7, 15 and 30 days), the mice were killed by ether anesthesia and the peritoneal exudate cells (PEC) were isolated to evaluate macrophage activities. Control animals were inoculated with physiological saline solution (negative control) or thioglycollate solution (positive control, 10 mg/animal).

2.5. PEC preparation

PEC were collected from the peritoneal cavity of mice by washing with 5 ml of PBS. After centrifugation, the cell pellet was washed twice with cold PBS and then resuspended in cold HBSS. The cells were counted using a Neubauer hemocytometer, and were placed on to a tissue culture plate (6- or 96-wells—Corning). After 2 h at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere, the cells were washed three times with warm PBS to remove nonadherent cells. By this method, more than 90% of the adherent cells were macrophages [14] and the preparation was not further purified.

2.6. Assay for phagocytic activity

The phagocytic activity was assayed by the method described by Popov et al. [15] with small modifications. Briefly, a macrophage monolayer (3×10^6

well⁻¹, 12 wells per culture plate), obtained as already described, was incubated with 5 μ l of fluorescein-conjugated latex beads (L-4655, Sigma) diluted in 1.5 ml of minimum essential medium (MEM) at 37 °C for 4 h. Macrophage monolayers were washed five times with pre-warmed PBS to remove any nonphagocytised beads. The cells were then lysed and the fluorescence intensity was measured with a filter fluorometer (Aminco) with an excitation wavelength of 485 nm and emission wavelength of 540 nm. Control wells consisted of cells that were fixed for 10 min with cold methanol before the addition of beads.

2.7. Measurement of H₂O₂ production

Production of H₂O₂ by macrophages was quantitated by the method of by Pick and Keisari [16], who used the horseradish peroxidase-dependent oxidation of phenol red by H₂O₂. Phenol red (phenylsulphonaphthalein, 194 mg/l) and horseradish peroxidase (19 U/ml, type II) were dissolved in HBSS and stored at 4 °C before use. The phenol red solution, with or without PMA, was added to the macrophage monolayers obtained as already described. Aliquots from each well were removed at 30-min intervals up to 150 min, and then 10 μ l of M NaOH aqueous solution was added. The absorbance at 610 nm was evaluated using a Hitachi spectrophotometer. Results are presented as nmoles of H₂O₂ produced by 1 mg of cell protein.

2.8. MTT assay for cell viability

Macrophage monolayers, obtained as described above, were incubated with the α -glucan (1000 μ g ml⁻¹) for 2 h at 37 °C and 5% CO₂. The cell viability was then evaluated by the MTT method [17,18].

2.9. Protein quantification

The cells of each well were washed three times with warm PBS (37 °C) and then were lysed with 1 ml of 0.05% Triton X-100. The protein content was determined by the method of Bradford [19].

2.10. Statistics

All results are expressed as the mean \pm standard deviation (S.D.). Statistical evaluations were per-

Table 1
In vivo *R. celastri* α -glucan activity against S-180 cells

Dose (mg kg ⁻¹)	VTM ₃₅ (mm ³ ; X \pm S.D.)	Tumor weight (g; X \pm S.D.)	Tumor inhibition (%)	Complete regression
Negative control	2165.21 \pm 296.14 ^a	2.04 \pm 0.42 ^a	–	0/20
Positive control	327.48 \pm 82.04 ^c	0.10 \pm 0.08 ^c	95.1	7/10
20	3528.57 \pm 272.08 ^a	1.61 \pm 0.49 ^a	21.1	0/14
200	733.55 \pm 104.00 ^b	0.39 \pm 0.62 ^b	81.0	4/10

R. celastri α -glucan was administrated i.p. 24 h after tumor implantation as a single dose. The results were obtained after 35 days. Identical letters indicate no statistically significant difference between the treatments (Tukey Test: $p < 0.05$). X, average; S.D., standard deviation; VTM₃₅, average of tumor volume after 35 days; Complete Regression, animals free of the tumor at the end of the experiment/total animals in the experiment; negative control: animals inoculated with saline solution; positive control: animals inoculated with 5-fluorouracil (1 mg/kg).

formed by the Tukey test. A value of $p < 0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1. In vivo α -glucan activity against Sarcoma 180 (S-180)

The in vivo assay of the *R. celastri* α -glucan against S-180 tumors cells was evaluated as a single intraperitoneal injection, 24 h after tumor implantation. Table 1 shows that the most significant effects occurred at a dose of 200 mg kg⁻¹, since the tumors were ~ 80% smaller than those obtained from non-treated animals. Higher concentrations were not more effective, and since the DL₅₀ was not achieved even at high doses such as 3200 mg kg⁻¹, the low in vivo toxicity of the glucan can be inferred (data not shown). Histological analysis of the remaining tumors of the α -glucan-treated animals showed the presence of plasma and lymphoid cell infiltration as well as liquefactive necrosis, which was not evident in tumors of the control group. Since plasmocytes are terminally differentiated from lymphocytes, which in turn are activated by cells presenting antigens (activated macrophages), this result suggests a non-specific reaction of the host, which blocks tumor establishment or development. According to several authors [20,21], some polysaccharides are known to increase non-specific immune functions and prevent tumor growth without direct tumor cell toxicity. In the present investigation, the action of the α -glucan on some parameters of murine macrophage activation is evaluated.

3.1.1. PEC eliciting activity

In order to evaluate if the *R. celastri* α -glucan could be interfering in the PEC count, it was injected intraperitoneally (200 mg kg⁻¹) and the total number of PEC was determined 7, 15 and 30 days after injection. For comparison, mice inoculated with saline (control) or sodium thioglycollate (positive control) were also examined. The results (Fig. 2) shows that the PEC count was 130% higher than that of the con-

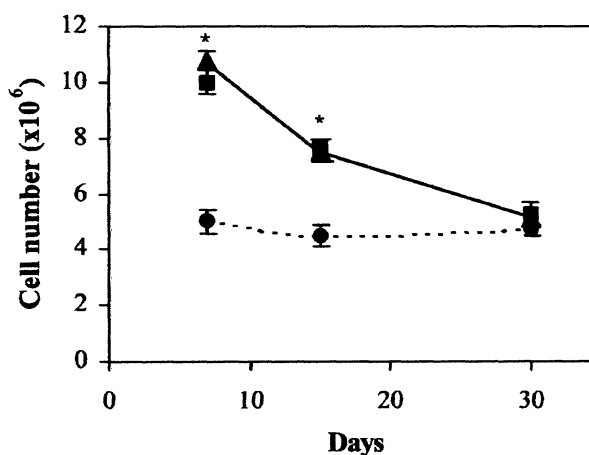


Fig. 2. Course analysis of peritoneal cell-eliciting by intraperitoneal administration of the α -glucan. Mice ($n = 4$, for each group, at each time) were intraperitoneally injected with glucan (200 mg kg⁻¹, ▲), or sodium thioglycollate (10 mg/animal, ■), or saline solution (control, ●) and PEC were harvested 7, 15 or 30 days later. After centrifugation, the cell pellet was washed twice with cold PBS and then re-suspended in cold HBSS. The cells were counted using a Neubauer hemocytometer and the results are expressed as the mean \pm S.D. * Significant difference from the control group by the Tukey test ($p < 0.05$).

control group 7 days after of administration of the α -glucan. After 15 days, the increase in the PEC number was still evident, in relation to the controls besides being smaller than that observed at 7 days. At 30 days after administration, the cell-eliciting activity returned to that of the control group.

3.1.2. H_2O_2 production induced by *R. celastri* α -glucan

The effect of *R. celastri* α -glucan on H_2O_2 production by peritoneal macrophages is shown in Fig. 3. These experiments were performed under two experimental conditions, the former in the absence of PMA and thereafter in the presence of PMA, which is able to induce macrophages in the production of the superoxide anion and in consequence H_2O_2 [22,23]. In the absence of PMA, the difference between the groups was not appreciable and only 7 days after treatment it became significant ($\sim 37\%$, $p < 0.05$, data not shown). Macrophages isolated from α -glucan-treated mice gave an increased H_2O_2 production after PMA triggering and showed significant differences ($p < 0.05$) between control and thioglycollate groups and that of the treated group after 7 and 15 days, with the values returning to the control level after 30 days.

3.1.3. Phagocytic activity

Fig. 4 shows the phagocytic activity of macrophages isolated from *R. celastri* α -glucan-treated animals. It can be seen that phagocytosis increased by $\sim 70\%$ 7 days after the treatment and then decreased

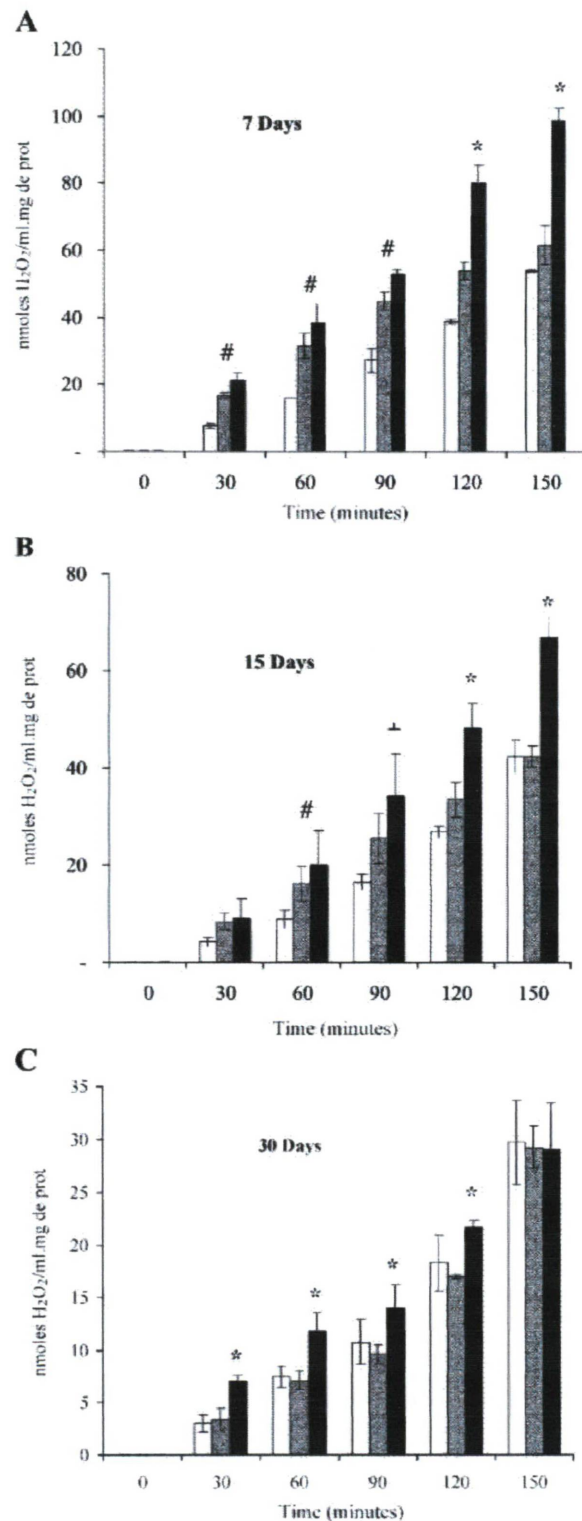


Fig. 3. Time course H_2O_2 production by peritoneal macrophages inoculated with *R. celastri* α -glucan. Mice were inoculated i.p. with a single dose of α -glucan (200 mg kg^{-1}) (■), thioglycollate solution (10 mg/animal) (▨), or saline solution (0.5 ml/animal) (□). At 7 (A), 15 (B) or 30 (C) days, the animals were sacrificed and the peritoneal exudate cells were collected and plated (5×10^6 cells/well). After 2 h at 37°C in an incubator containing $5\% \text{ CO}_2$, the cells were washed and a phenol red solution containing horseradish peroxidase (19 U ml^{-1}) and PMA ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$) added. Aliquots from each well were removed at 30-min intervals up to 150 min, and $10 \mu\text{l}$ of M NaOH aqueous solution added. The oxidation of phenol red was quantitated spectrophotometrically at 610 nm . Results are given as mean \pm S.D. of three independent experiments and are presented as nmoles of H_2O_2 produced by 1 mg of protein of each well. * Significant difference from the other two groups, + the three groups are different, # groups treated with thioglycollate and treated with α -glucan are different from the control group, all situations having $p < 0.05$.

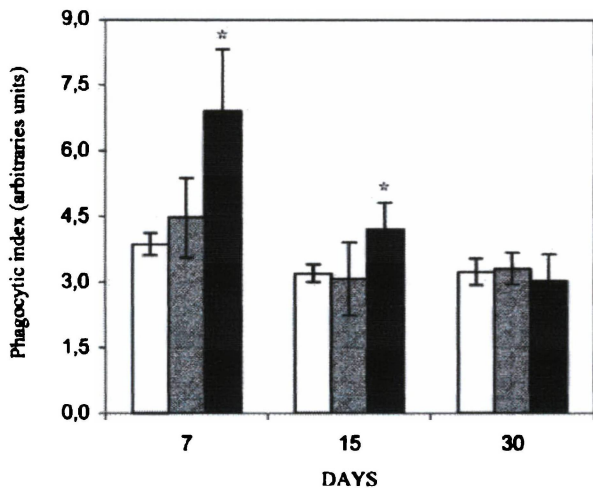


Fig. 4. Effect of α -glucan on phagocytosis of fluorescent beads by macrophages. Macrophages obtained from treated animals ($n=9$) with α -glucan (■), thioglycollate solution (10 mg/animal) (▨), or saline solution (0.5 ml/animal) (□) were incubated with fluorescent latex beads for 4 h at 37 °C under 5% CO₂. After the cells were washed and lysed, the fluorescence was determined using a fluorometer. Control animals were treated with saline. Data are expressed as fluorescence intensity. * Significant difference from the other two groups by the Tukey test ($p < 0.05$).

slowly until levels similar to the control group were reached at 30 days after treatment, as was also observed for hydrogen peroxide production (Fig. 3). After 15 days of treatment, the values obtained with cells from treated animals remained at $\sim 30\%$ stimulation compared with the cells from untreated animals.

4. Discussion

4.1. α -Glucan activity against Sarcoma 180 (S-180)

The α -glucan of *R. celsastri* appears to give rise to an impairment of S-180 tumor establishment, although this does not imply that this effect would occur on administration of the polymer after tumor establishment. However, several authors have classified this as an anti-tumoral effect [24,25]. Thus, applying the parameters proposed by Mizuno et al. [13], the effect of the *R. celsastri* α -glucan can be classified as a "notably effective anti-tumoral activity". This action seems more effective than those described for several polymers, which were used at similar but daily-fractionated doses [26,27] or at a higher dose (300 μ g

mouse⁻¹ day⁻¹, 5 days after tumor inoculation) [18]. The activity against tumors exhibited by some polysaccharides has been explained by means of their chemical structure and immunomodulating action, which is, therefore, quite different from that of several cytotoxic drugs which are used in chemotherapy [2]. The variety of effects was thought to occur due to differences of physicochemical properties, including the primary structure and ultrastructure of the glucans [1]. The mechanism of the polysaccharides having such an effect has not yet been elucidated, although it has been recognized that some glucans could rescue some immunosuppressive states, suggesting a potential pharmacological use as coadjuvant in chemotherapy [7]. Some results from the present investigation seem to reinforce this proposition, namely, the increase in phagocytic activity and the synergic action with PMA in H₂O₂ production, as well as the increase in the PEC number.

4.1.1. PEC eliciting activity

Activity resulting in an increase of the PEC number has been described for lentinan, a fungal polysaccharide, which caused an increase of $\sim 75\%$ in the PEC number, when compared with the control [28], and as the *R. celsastri* α -glucan, this polymer also exhibited antitumoral activity against S-180 (4 mg kg⁻¹ 5 days⁻¹) [29]. The effect of the *R. celsastri* α -glucan seems to be more persistent than observed for an enzyme-degraded polysaccharide fraction obtained from a marine alga (*Gracilaria verrucosa*), which promoted a 100% increase in the cell number up to 5 days [30]. Similar results to those shown herein were obtained by Sakurai et al. [31] with a β -glucan of *Sclerotinia sclerotiorum*, which was able to maintain the stimulus for up to 12 days, the maximum activity being 140% in relation to the control group. The increase in the PEC number suggests that the α -glucan gives rise to an irritating action similar to that of thioglycollate [14].

4.1.2. H₂O₂ production

In regard to H₂O₂ production by macrophages, the *R. celsastri* α -glucan did not exhibit effects as an inducer. However, the α -glucan seems to interact synergically with PMA, since the best results were obtained when the cells were incubated with this reagent. Several physiochemically different (1 \rightarrow 3)- β -glucans

were tested in terms of their ability to trigger H₂O₂ production by macrophages. Bakers' yeast β -glucan and a water-soluble curdlan gave rise to inhibition of zymosan-induced H₂O₂ release, although PMA-induced H₂O₂ release was increased by the macrophages pretreatment with these polysaccharides. However, laminaran, grifolan (glucan gel-forming obtained from *Grifola frondosa*), barley β -glucan, lichenan, SSG (gel-forming glucan obtained from *S. sclerotiorum*), schizophyllan or lentinan, all had an inhibitory effect on H₂O₂ release by stimulation with zymosan, although PMA-induced H₂O₂ release was not affected. Macrophages pretreatment with dextran or pullulan had no inhibitory effect on the zymosan- or PMA-mediated secretion on H₂O₂ [1].

4.1.3. Phagocytic activity

Phagocytosis represents the final and most indispensable step of the immunological defense system [32], since phagocytes act as regulatory and effector cells in the immune system, so the enhancement of phagocyte function is expected to be applicable for therapy of microbial infections and cancer [15]. The response obtained with the *R. celastri* α -glucan is a better result when compared with those observed with a weakly acidic arabinogalactan and pectic polysaccharides extracted from the intact plant and from the callus of *Silene vulgaris*, which gave a phagocytic index of 5% to 32.5% higher than the control [15]. The *R. celastri* α -glucan had an activity comparable to a soluble highly branched (1 \rightarrow 3)- β -glucan extracted from the fungus *S. sclerotiorum* [29]. However, Brattgjerd et al. [7] described increases of 100–150% when the Atlantic salmon was inoculated for 3 or 6 weeks with glucans isolated from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*.

The effect of the *R. celastri* α -glucan on the immune system could be the basis of its effect on reduction of tumor establishment. The activity of the α -glucan in increasing the PEC number, which significantly increased up to 15 days, is in accord with those concerning hydrogen peroxide production and the phagocytic index, which increased principally 7 days after polysaccharide inoculation (Figs. 3 and 4). These effects could indicate that the polysaccharide was acting as mediator of inflammatory response and/or as a direct stimulus on PEC, as proposed by Sakurai et al. [31].

Studies on interleukins, TNF, NO, and other immunomodulators, directly related to antitumor activity modulation at the next step in the immunological network, are in development in our laboratory.

Acknowledgements

We thank the Brazilian agencies FINEP (PRO-NEX-CARBOIDRATOS, PADCT II/SBIO) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support. The authors thank Dr. Sergio Ioshii, Pathology Department, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, for valuable discussions.

References

- [1] Adachi Y, Ohno N, Yodamae T. Inhibitory effect of β -glucans on zymosan-mediated hydrogen peroxide production by murine peritoneal macrophages in vitro. *Biol Pharm Bull* 1993;16(5): 462–7.
- [2] Bohn JA, BeMiller JN. (1 \rightarrow 3)- β -D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure–functional activity relationships. *Carbohydr Polym* 1995;28:3–14.
- [3] Saitô H, Yoshioka Y, Uehara N, Aketagawa J, Tanaka S, Shibata Y. Relationship between conformation and biological response for (1 \rightarrow 3) β -D-glucans in the activation of coagulation Factor G from limulus amoebocyte lysate and host-mediated antitumor activity. Demonstration of single-helix conformation as a stimulant. *Carbohydr Res* 1991;217:181–90.
- [4] Ohya Y, Nishimoto T, Murata J, Ouchi T. Immunological enhancement activity of muramyl dipeptide analogue/CM-curdlan conjugate. *Carbohydr Polym* 1994;23:47–54.
- [5] Cerenius L, Liang Z, Duvic B, Keyser P, Hellman U, et al. Structure and biological activity of a 1,3- β -D-glucan-binding protein in crustacean blood. *J Biol Chem* 1994;269(47): 29462–7.
- [6] Tokunaka K, Ohno N, Adachi Y, Tanaka S, Tamura H, Yodamae T. Immunopharmacological and immunotoxicological activities of a water-soluble (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan, CSBG from *Candida* spp. *Int J Immunopharmacol* 2000;22(5):383–94.
- [7] Brattgjerd S, Evensen O, Lauve A. Effect of injected yeast glucan on the activity of macrophages in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., as evaluated by in vitro hydrogen peroxide production and phagocytic capacity. *Immunology* 1994;83: 288–94.
- [8] Gorin PAJ, Iacomini M. Polysaccharides of the lichens *Cetraria islandica* and *Ramalina usnea*. *Carbohydr Res* 1984;128:119–32.
- [9] Baron M, Iacomini M, Fanta ES, Gorin PAJ. Galactomannan, lichenan and isolichenan from the polysaccharide-rich lichen *Newropogon aurantiacoater*. *Phytochemistry* 1991;30:3125–31.

- [10] Stuelp PM, Carneiro-Leão AMA, Gorin PAJ, Iacomini M. The glucans of *Ramalina celsastri*: relation with chemotypes of other lichens. *Carbohydr Polym* 1999;4:101–6.
- [11] Woranovicz-Barreira SM, Sasaki GL, Tischler CA, Gorin PAJ, Ahti T, Iacomini M. Chemotyping glucans from lichens of the genus *Cladonia*. *Phytochemistry* 1999;52:1069–74.
- [12] Carneiro-Leão AMA, Buchi DF, Iacomini M, Gorin PAJ, Oliveira MBM. Cytotoxic effect against HeLa cells of polysaccharides from the lichen *Ramalina celsastri*. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1997;24(4):1–5.
- [13] Mizuno T, Ohsawa K, Hagiwara N, Kuboyama R. Fractionation and characterization of antitumor polysaccharides from Maitake, *Grifola frondosa*. *Agric Biol Chem* 1986;50:1679–88.
- [14] Adams DO. Macrophages. *Methods Enzymol* 1979;58:494–506.
- [15] Popov SV, Popova GY, Ovodova RG, Bushneva AO, Ovodov YS. Effects of polysaccharides from *Silene vulgaris* on phagocytes. *Int J Immunopharmacol* 1999;21:617–24.
- [16] Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods* 1980;38:161–70.
- [17] Reilly TP, Bellevue FH, Woster PM, Svensson CK. Comparison of the in vitro cytotoxicity of hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone. *Biochem Pharmacol* 1998;55:803–10.
- [18] Kiho T, Shiose Y, Nagai K, Ukai S. Polysaccharides in fungi: XXX. Antitumor and immunomodulating activities of two polysaccharides from the fruiting bodies of *Armillariella tabescens*. *Chem Pharm Bull* 1992;40(8):2110–4.
- [19] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
- [20] Ma Y, Mizuno T, Ito H. Antitumor activity of some polysaccharides isolated from a Chinese mushroom, “Huangmo”, the fruiting body of *Hohenbuehelia serotina*. *Agric Biol Chem* 1991;55(11):2701–10.
- [21] Kim HM, Han SB, Oh GT, Kim YH, Hong DH, et al. Stimulation of humoral and cell mediated immunity by polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. *Int J Immunopharmacol* 1996;18(5):295–303.
- [22] Arthur MJP, Jowalski-Saunders P, Wright R. Corynebacterium parvum-elicited hepatic macrophages demonstrate enhanced respiratory burst activity compared with resident Kupffer cells in the rat. *Gastroenterology* 1986;91:174–81.
- [23] Segal AW, Abo A. The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes. *Trends Biochem Sci* 1993;18(2):43–7.
- [24] Suda M, Ohno N, Adachi Y, Yodamae T. Modulation of the antitumor effect and tissue distribution of highly branched (1 → 3)-β-D-glucan, SSG, by carrageenan. *Biol Pharm Bull* 1995;18(5):772–5.
- [25] Kitamura S, Hori T, Kurita K, Takeo K, Hara C, Itoh W, et al. An antitumor, branched (1 → 3)-β-D-glucan from a water extract of fruiting bodies of *Cryptoporus volvatus*. *Carbohydr Res* 1994;263:111–21.
- [26] Kiho T, Matsushita M, Usui S, Ukai S. Biological activities of (1 → 3)-β-D-glucans with reducing glucose side chains. *Biosci Biotechnol Biochem* 1998;62(3):570–2.
- [27] Demleitner S, Kraus J, Franz G. Synthesis and antitumor activity of derivatives of curdlan and lichenan branched at C-6. *Carbohydr Res* 1992;226:239–46.
- [28] Ladányi A, Tímár J, Lapis K. Effect of lentinan on macrophage cytotoxicity against metastatic tumor cells. *Cancer Immunol Immunother* 1993;36:123–6.
- [29] Suga T, Shiio T, Maeda YY, Chihara G. Antitumor activity of lentinan in murine syngeneic and autochthonous hosts and its suppressive effect on 3-methylcholanthrene-induced carcinogenesis. *Cancer Res* 1984;44:5132–7.
- [30] Yoshizawa Y, Tsunehiro J, Nomura K, Itoh M, Fukui F, et al. In vivo macrophage-stimulation activity of the enzyme-degraded water-soluble polysaccharide fraction from a marine alga (*Gracilaria verrucosa*). *Biosci Biotechnol Biochem* 1996;60(10):1667–71.
- [31] Sakurai T, Ohno N, Yodamae T. Intravenously administered (1 → 3)-β-D-glucan, SSG, obtained from *Sclerotinia sclerotiorum* IFO 9395 augments murine peritoneal macrophage function in vivo. *Chem Pharm Bull* 1992;40(8):2120–4.
- [32] van Oss CJ. Phagocytosis: an overview. *Methods Enzymol* 1986;132:3–15.