

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ

RENAN HENRIQUE DE MELO

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA
SK5 ISOLADA DO FUNGO *Ganoderma australe* EM MACRÓFAGOS DE
CAMUNDONGO SWISS

CASCVEL

2014

RENAN HENRIQUE DE MELO

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA
SK5 ISOLADA DO FUNGO *Ganoderma australe* EM MACRÓFAGOS DE
CAMUNDONGO SWISS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. José Luis da C. Silva.

CASCADEL

2014

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

M486a

Melo, Renan Henrique de
"Avaliação dos efeitos biológicos da fração polissacarídica SK5 isolada do fungo *Ganoderma australe* em macrófagos de camundongo swiss" /Renan Henrique de Melo.— Cascavel, 2014.
63 p.

Orientador: Prof. Dr. José Luis da Conceição Silva

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, 2014
Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Farmacêuticas

1. Bioquímica aplicada. 2. Polissacarídeo. 3. Interleucina. 4. Fagocitose. I. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. II. Título.

CDD 21.ed. 572

Ficha catalográfica elaborada por Helena Soterio Beijo – CRB 9^a/965

FOLHA DE APROVAÇÃO

DISSERTAÇÃO DEFENDIDA E APROVADA EM 09 DE DEZEMBRO DE 2014.



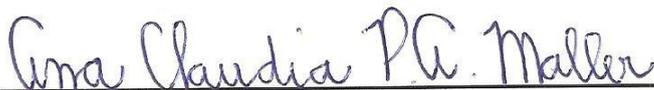
PROF. DR. JOSÉ LUIS DA CONCEIÇÃO SILVA

PCF-UNIOESTE (ORIENTADOR)



PROF. DR. ALEXANDRE MALLER

TITULAR INTERNO (UNIOESTE)



PROFA. DRA. ANA CLAUDIA PAIVA ALEGRE MALLER.

TITULAR EXTERNO (PÓS-DOCTORANDA, PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E SAÚDE, UNIOESTE)



PROF. DR. EDUARDO BORGES DE MELO

COORDENADOR – PCF-UNIOESTE

AGRADECIMENTOS

À Deus, pois todos os méritos se devem a Ele.

À minha esposa Franciele pelo amor, paciência e compreensão nos momentos difíceis.

À meus pais Paulo e Edineia, e irmã Maiara pela criação, sustento e apoio em todas as etapas da minha vida.

Ao orientador José Luis pelo suporte sempre presente quando necessário.

Ao Alex Amaral pelo treinamento e grande inteligência que tornaram possível esta linha de pesquisa na Unioeste.

À professora Clarice Osaku pelo interesse e grande experiência disponibilizados com satisfação e apreço.

Aos professores e doutorandos Rafael Menoli, Cláudia Macedo e Érica Osaku pela companhia, dedicação e auxílio durante os experimentos.

Ao Arquimedes Paixão pelas análises realizadas.

À equipe do laboratório de Biologia Molecular da Unioeste pelo companheirismo e convívio harmonioso e pelas comemorações nos aniversários.

À todos os integrantes do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e aos discentes da primeira turma pelos créditos conquistados.

À CAPES pelo suporte financeiro.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2'-Azinobis [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]-diammoniumsalt
CH ₂ O	Formaldeído
CH ₃ COOH	Ácido acético
CH ₃ OH	Metanol
CO ₂	Dióxido de carbono
CR3	Receptor de complemento 3
DMSO	Dimetilsulfóxido
C ₆ H ₅ OH	Fenol
C ₆ H ₃ N ₃ O ₇	Ácido pícrico
C ₆ H ₁₂ O ₆	Glicose
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
ERK	Quinase regulada por sinal
Fos	extracelular Fator de transcrição Fos
HEPES	ácido 4-(2-Hidroxietil)-1-PiperazinaEtanolSulfônico
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico
IFN-γ	Interferon-gama
IκB	Inibidor de NF-κB
IKK	Inibidor de IκB quinase
IL-1	Interleucina-um
IL-1β	Interleucina-um beta
IL-4	Interleucina-quatro
IL-6	Interleucina-seis
IL-8	Interleucina-oito
IL-10	Interleucina-dez
IL-12	Interleucina-doze
IL-13	Interleucina-treze
IL-17	Interleucina-dezessete
IRAK	Receptor de IL-1 associado a quinase

JNK	Jun N-terminal quinase
Jun	Proteína codificada pelo gene JUN
KCl	Cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio monobásico
KOH	Hidróxido de potássio
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
MR	<i>Mannose receptor</i>
MTT	Brometo de (3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio
MyD88	Fator de diferenciação mielóide 88
NaCl	Cloreto de sódio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NaNO ₂	Nitrito de sódio
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de sódio dibásico
NBT	Nitroblue tetrazólio
NF-κB	Fator nuclear <i>kappa</i> B
NO	Óxido nítrico
NO ₂ ⁻	Nitrito
NOS	Óxido nítrico sintase
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PI3K	Fosfoinositideo 3 quinase
PKC	Proteína quinase C
PLC	Fosfolipase C
PMA	Acetato de forbolmiristato
PMS	Metassulfato de fenazina
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RPMI 1640	Meio para cultivo celular desenvolvido pelo Instituto Memorial Parque Roswell
SBF	<i>Fetal bovine serum</i>
SK5	Sobrenadante gelo-degelo da extração alcalina 5%

SR	<i>Scavenger receptor</i>
STAT	Transdutores e ativadores da transcrição de sinal
TGF- β 1	Fator de crescimento transformante-beta um
TLR	Receptores do tipo <i>Toll</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
TRAF6	Fator associado ao receptor de TNF 6
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β

RESUMO

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA SK5 ISOLADA DO FUNGO *Ganoderma australe* EM MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGO SWISS

Ganoderma australe é uma das espécies de basidiomicetos responsáveis pelo processo de deslignificação da matéria orgânica, conhecido por causar a “podridão branca” em algumas espécies de árvores. Estudos citoquímicos demonstraram que a parede celular dos fungos possui polissacarídeos do tipo β (1 \rightarrow 3)-glucanas, β (1 \rightarrow 6)-glucanas e outros polissacarídeos complexos. Atualmente, tem-se destacado que as β -glucanas são os polissacarídeos que produzem efeitos mais intensos como moduladores das funções biológicas. Em estudos anteriores desenvolvidos em nosso laboratório, o fungo *G. australe* foi estudado quanto à composição polissacarídica da parede celular. A fração polissacarídica SK5 foi obtida após gelo-degelo da extração aquosa com KOH 5%. A composição monossacarídica da fração SK5 revelada por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (GC-MS) mostrou que glicose é predominante (81,3%), com a presença de outros açúcares (manose, arabinose, xilose, ramnose, fucose e galactose) em concentração inferior a cerca de 3% cada um. A ressonância magnética nuclear desta fração comprovou ser uma β -glucana, com ligações glicosídicas do tipo β -1 \rightarrow 3 e provavelmente substituídas em 4-O. Neste trabalho, o efeito biológico da fração polissacarídica SK5 extraída do fungo *G. australe* foi avaliado *in vitro* em cultura de células de macrófagos peritoneais isoladas de camundongos *Swiss*. Foi analisado o efeito biológico quanto à toxicidade e ativação celular, a produção de óxido nítrico, citocinas (TNF- α , IL-6), ânion superóxido (produção e capacidade sequestradora) e a capacidade de estimular a atividade fagocítica. A viabilidade celular foi significativamente afetada, com cerca de 29% de redução com 1,0 μ g/mL e 35,5% de redução com 2,5 μ g/mL de SK5. Não houve alteração na produção de óxido nítrico, TNF- α ou de ânion superóxido nas concentrações entre 0,1 μ g/mL e 1,0 μ g/mL. A capacidade sequestradora de ânion superóxido também não foi constatada. Houve aumento na produção de IL-6 em cerca de 111% com 1,0 μ g/mL. Em relação à atividade fagocítica houve aumento em todas as concentrações analisadas, chegando a 52,3% com 0,25 μ g/mL do polissacarídeo. Os resultados obtidos indicam que a β (1 \rightarrow 3)-glucana isolada de *Ganoderma australe* pode ser classificada como modificadora de resposta biológica (MRB).

Palavras chave: polissacarídeo, interleucina, fagocitose.

ABSTRACT

EVALUATION OF BIOLOGICAL EFFECTS OF SK5 FRACTION POLYSACCHARIDE ISOLATED FUNGUS *Ganoderma australe* IN MOUSE SWISS MACROPHAGES

Ganoderma australe is a Basidiomycete species responsible for the delignification process of the organic matter known to cause "white rot" in certain species of trees. Cytochemical studies have shown that the cell wall of fungi polysaccharides has (1→3)- β -glucans, (1→6)- β -glucans type and other complex polysaccharides. Currently, it has been highlighted that the β -glucans are polysaccharides that produce higher effects as modulators of biological functions. In previous studies, the fungus *G. australe* has been studied regarding the composition of the cell wall polysaccharide. SK5 polysaccharide fraction was obtained after freeze-thawing of the aqueous extraction with KOH 5%. Monosaccharide composition of SK5 fraction revealed by Gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) showed glucose is predominant (81.3%), with presence of other sugars (mannose, arabinose, xylose, rhamnose, fucose and galactose) at concentration of less than about 3% each. The nuclear magnetic resonance of this fraction proved to be a β -glucan with glycosidic links (1→3)- β type and probably replaced in 4-O. In this study, the biological effect of SK5 polysaccharide fraction extracted from the fungus *G. australe* has been evaluated *in vitro* cell culture of peritoneal macrophages isolated from Swiss mice. The biological effect was assessed for toxicity and cell activation, nitric oxide, cytokines (TNF- α , IL-6), superoxide anion (production and scavenging capacity) and the ability to stimulate phagocytic activity. Cell viability was affected, with approximately 29% reduction with 1.0 mg / mL and 35.5% reduction with 2.5 μ g/ml SK5. There was no change in nitric oxide production, TNF- α or superoxide anion concentrations between 0.1 μ g/mL and 1.0 μ g/mL. The scavenging ability of superoxide anion was also not detected. There was an increase in IL-6 by about 111% with 1.0 μ g/mL. In regarding to phagocyte activity was increased in all concentrations examined obtaining 52.3% with 0.25 μ g/mL of polysaccharide. The results indicate that (1→3)- β -glucan isolated from *G. australe* can be classified as biological response modifier (BRM).

Keywords: polysaccharide, interleukin, phagocytosis.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	
<i>Ganoderma australe</i>	1
β (1→3) glucanas e ação biológica.....	2
Macrófagos.	5
Fagocitose	6
Citocinas.	7
Óxido nítrico.	7
<i>Burst</i> respiratório.	8
2. JUSTIFICATIVA.	9
3. OBJETIVO	
Objetivos específicos.	10
4. MATERIAL E MÉTODOS	
Material e reagentes.	11
Material biológico.....	12
Polissacarídeo.	12
Cultivo e manutenção de células.	13
Meio RPMI 1640.	13
Obtenção dos macrófagos.....	13
Determinação da viabilidade celular.....	14
Determinação da ativação celular (morfologicamente).	16
Ensaio de atividade fagocítica	17
Determinação da produção de citocinas (IL-6 e TNF- α).....	18
Determinação da produção de óxido nítrico (NO).....	19
Determinação da produção de ânion superóxido (O ₂ ^{•-}).....	21
Determinação da capacidade sequestradora de ânion superóxido.	22
Análises estatísticas.	24
5. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL	25
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
GC-MS para verificação de contaminação por LPS	26
Efeitos sobre a viabilidade celular.	27
6.3 Efeitos sobre a ativação celular.	28
Efeitos sobre a atividade fagocítica	31
Efeitos sobre a produção de IL-6.	33
Efeitos sobre a produção de TNF- α	34
Efeitos sobre a produção de óxido nítrico (NO).....	37
Efeitos sobre a produção de O ₂ ^{•-}	38
Efeitos sobre o sequestro de O ₂ ^{•-}	40
7. CONCLUSÕES	43
8. REFERÊNCIAS.	44
9. PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	52

1. INTRODUÇÃO

Ganoderma australe

Os fungos pertencentes ao filo Basidiomycota são conhecidos como basidiomicetos, cogumelos, orelhas de pau, bolores, bufa de lobo, trufas ou mofos. Dentre os mais conhecidos mundialmente estão *Agaricus blazei*, o chamado cogumelo do sol, *Pleurotus* spp, *Ganoderma* spp. e *Lentinus edodes*, o shiitake. Esta classe de fungos chega próximo de 15.000 espécies. (PUTZKE & PUTZKE, 1998).

Ganoderma australe é uma das espécies de basidiomicetos responsáveis pelo processo de deslignificação, e pode ser encontrado em florestas na América do Sul (ELISSETCHE *et al*, 2007). Conhecido por causar a “podridão branca” em algumas espécies de árvores, *G. australe* é considerado um “fungo parasita” nas fases iniciais de colonização, mas torna-se saprófita após a morte da planta. Seus corpos de frutificação surgem principalmente na parte inferior do tronco, próximo à base, e podem medir de 5 a 25 cm de espessura, tendo uma coloração de marrom escuro a cinza na parte superior (O'REILLY, 2011).



Figura 1. *Ganoderma australe*.

Fonte: <<http://toowoombaplants2008.blogspot.com.br/2010/06/woody-bracketfungus.html>>, acesso em 19 agosto 2014.

A parede celular desse tipo de fungo é uma estrutura rígida que protege a célula quanto a choques osmóticos. É composta, de modo geral, por polissacarídeos

(glucanas, mananas e, em menor quantidade, por quitina), proteínas e lipídios (OOI & LIU, 2000).

β (1→3) glucanas e ação biológica

Os polissacarídeos são polímeros de carboidratos que naturalmente estão presentes na natureza (bactérias, fungos, animais ou plantas), e são as macromoléculas mais abundantes em alguns materiais biológicos. Os mais conhecidos são celulose, amido e seus derivados, quitina e gomas que desempenham papéis importantes na estrutura, obtenção e armazenamento de energia, adesão e proteção. Essas características devem-se à estrutura química que permite grande variabilidade molecular (OOI & LIU, 2000). Na natureza também são encontrados polissacarídeos complexos, como as glucanas e as mananas que estão combinadas com proteínas, formando glicoproteínas, manoproteínas e glicomanoproteínas (TRABULSI & ALTERTHUM, 2005).

Estudos citoquímicos demonstraram que cada camada da parede celular dos fungos possui um polissacarídeo dominante: as camadas mais internas (8ª a 5ª) contêm β (1→3) glucanas e mananas, enquanto as camadas mais externas são constituídas de mananas e β (1→6) glucanas (TRABULSI & ALTERTHUM, 2005). Polissacarídeos extraídos de fungos podem apresentar diversas ações biológicas, dentre elas efeito imunoestimulante, anticarcinogênico, antiparasitário, antifúngico, antiviral e bactericida (AKRAMIENE *et al*, 2007; LEUNG *et al*, 2006).

Os polissacarídeos mais estudados quanto aos efeitos como moduladores das funções biológicas são as β -glucanas, porém, outros polissacarídeos como α -glucanas, mananas, galactomananas, arabinogalactanas e xiloglucanas também têm se demonstrado como moduladores de funções biológicas (LEUNG *et al*, 2006). O isolamento e a purificação de uma fração polissacarídica podem ser realizados por meio de precipitação alcoólica, diálises e liofilização, seguidas por uma série de tratamentos químicos que envolvem a precipitação, ressuspensão, e cromatografia (SUN *et al*, 2013).

As β (1→3) glucanas são formadas por uma cadeia principal de unidades de *glucopiranosil* e podem ter ramificações de moléculas simples da mesma subunidade (ou moléculas diferentes) com ligação do tipo 1→6 ou 1→4 (BOHN & BeMILLER, 1995), conforme mostra a Figura 2:

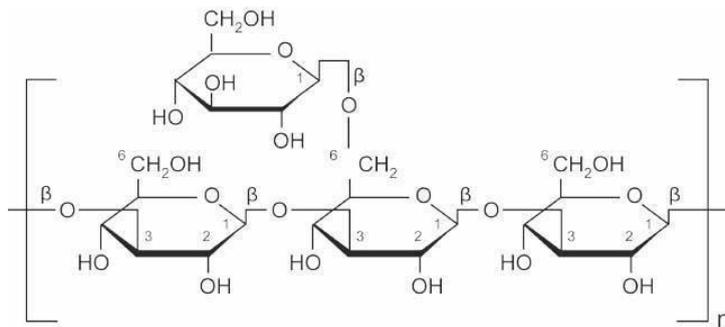


Figura 2. Esquema estrutural das β (1 \rightarrow 3) glucanas.

Fonte: < <http://immunomedic.com/what-is-beta-1316-d-glucan-beta-glucan> > acesso em 25 agosto 2014.

John Bohn e James BeMiller (1995), demonstraram que a ativação de macrófagos por β (1 \rightarrow 3) glucanas ocorre devido à conformação helicoidal da molécula e da presença de grupamentos hidrofílicos nas ramificações que acabam interagindo com os receptores dos macrófagos (possivelmente ocorra simultaneamente a ativação dos linfócitos T *helper*, células *Natural Killer* e da via alternativa do complemento), e ocasionando as ações antitumoral, antibacteriana, antiviral, anticoagulante e cicatrizante. Akramiene e colaboradores (2007) sugerem que β -glucanas são ativadoras do sistema imunológico e possuem ação modificadora da resposta celular, modulando a atividade de vários fatores como citocinas, quimiocinas, fatores de transcrição e de crescimento, e que as β -glucanas podem induzir a resposta celular provavelmente pela interação com receptores de superfície, como *receptor complemento 3* (CR3; CD11b/CD18), *lactosil-ceramida*, *scavenger* e *dectina-1* (β GR), levando à uma atividade imunoestimuladora e anticarcinogênica.

Desta forma, uma β (1 \rightarrow 3) glucana pode ativar macrófagos pela interação com um receptor (CR3, receptor de manose, *scavenger*, *dectina-1* ou do tipo *Toll* - TLR), mas, além disso, pode ser fagocitada e interagir com alvos internos que também promovem ativação celular. A imunomodulação de macrófagos ocasionada por β -glucanas geralmente envolve a ativação do fator nuclear *kappa B* (NF- κ B), sendo assim, os receptores *scavenger* e CR3 quando ativados podem sinalizar para a ativação da fosfolipase C, cujos produtos levam à ativação da proteína quinase C e da fosfoinositídeo 3 quinase que, por sua vez, ativam a proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK), a quinase regulada por sinal extracelular (ERK) e o NF- κ B. O resultado acaba sendo a indução da transcrição dos genes de ativação celular. Um estímulo nos receptores de manose causa aumento da fagocitose, produção de oxidantes, endocitose e ativação do NF- κ B. Se a β -(1 \rightarrow 3) glucana estimular os receptores TLR4

(via utilizada pelo lipopolissacarídeo presente em bactérias Gram negativas - LPS), promoverá a ativação de receptores de IL-1 associados a quinase (IRAK) através da proteína de diferenciação mielóide 88 (MyD88), com subsequente ativação do fator associado ao receptor de TNF 6 (TRAF-6), das proteínas quinases ativadas por mitógenos (p38 e Jun N-terminal quinase-JNK) e do NF- κ B. A indução destas vias de transcrição ativa a produção de citocinas inflamatórias e da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), responsável pela produção de óxido nítrico (NO) (SCHEPETKIN & QUINN, 2006) (Figura 3).

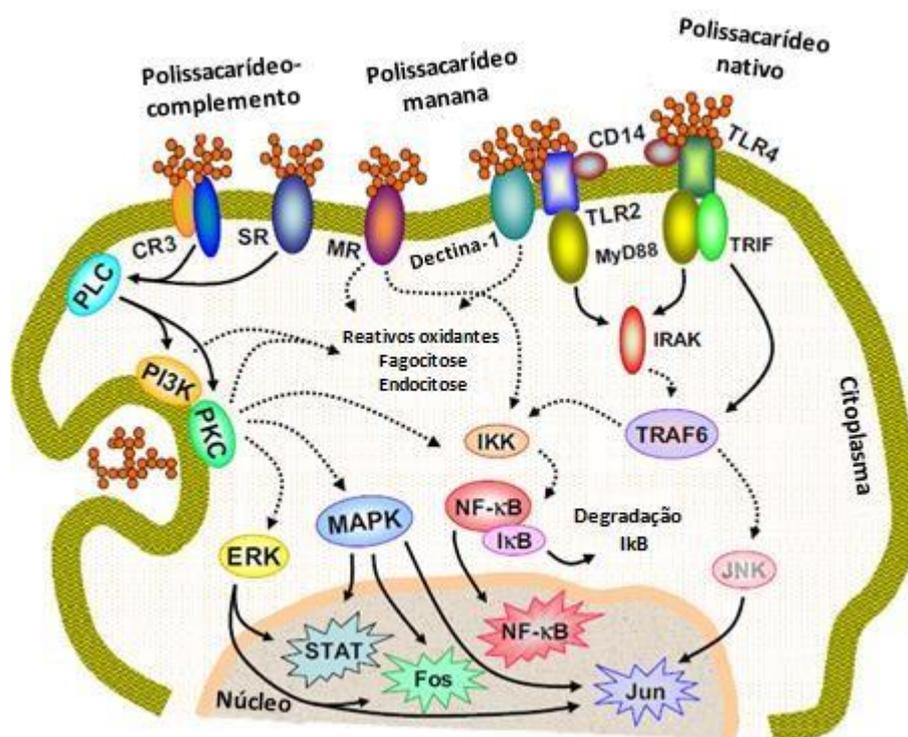


Figura 3. Sinalização de polissacarídeos para ativação de macrófagos.

Fonte: Extraída e adaptada (SCHEPETKIN & QUINN, 2006).

Nota: NF- κ B: fator nuclear *kappa* B; I κ B: inibidor de NF- κ B; TLR: receptor tipo *toll*; CR3: receptor de complemento 3; MR: receptor de manose; SR: receptor *scavenger*; PLC: fosfolipase C; PKC: proteína quinase C; PI3K: fosfoinositideo 3 quinase; MAPK: proteína quinase ativada por mitógenos; ERK: quinase regulada por sinal extracelular; MyD88: proteína de diferenciação mielóide 88; TRAF6: fator associado ao receptor de TNF 6; IKK: inibidor de Kb quinase; JNK: Jun N-terminal quinase; Jun: proteína codificada pelo gene JUN; Fos: fator de transcrição Fos; STAT: transdutores e ativadores da transcrição de sinal; IRAK: receptor de IL-1 associado a quinase; TRIF: adaptador em resposta à ativação de TLR.

A ativação clássica (*in vivo*) é estimulada através de IFN- γ (produzida por linfócitos) e dos receptores tipo *toll*, e é caracterizada pela produção de citocinas e mediadores pró-inflamatórios, além de aumento da expressão de moléculas coestimulatórias. Diferentemente, a ativação alternativa tem como estímulo IL-4 ou IL-13, além de expressar receptores para manose e receptores α para IL-4 e podendo ter

uma resposta antiinflamatória com produção de IL-10 (MOSSER & EDWARDS, 2008).

Atualmente a relação entre estrutura e atividade de substâncias bioativas, tais como polissacarídeos de diferentes fontes, é avaliada através de experimentos *in vitro* em cultura de células de macrófagos (MELLINGER *et al*, 2005; LEUNG *et al*, 2006; AKRAMIENE *et al*, 2007; CHENG *et al*, 2008).

Macrófagos

Os macrófagos são fagócitos mononucleares (chamados de monócitos no sangue e macrófagos nos tecidos) responsáveis pela defesa imediata do organismo. As principais funções destas células estão relacionadas ao processo inflamatório, ao processamento e apresentação de antígenos, à co-ativação de linfócitos T e B, à capacidade fagocítica, à angiogênese, ao processo de hematopoiese e de reparo tecidual, além da atividade citotóxica contra células tumorais e microrganismos (COOK *et al*, 2001; GORDON & TAYLOR, 2005). Tais células reconhecem elementos estranhos por meio de receptores de superfície que os levam à fagocitose, processo no qual a molécula é internalizada numa vesícula membranosa (fagossoma) que se acidifica e recebe o conteúdo de lisossomos para destruir o patógeno (JANEWAY & MEDZHITOV, 2002; ABBAS *et al*, 2012).

Macrófagos peritoneais de camundongos possuem receptores para β -glucanas podendo, desta forma, reconhecer e fagocitar esses polímeros, o que pode ocasionar a ativação dessas células que é caracterizada principalmente pela produção de interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), além de óxido nítrico (NO), ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e aumento da atividade fagocítica (Figura 4) (GOLDMAN, 1988; ABEL & CZOP, 1992; SAKURAI *et al*, 1992; ADACHI *et al*, 1993; OKASAKI *et al*, 1995; OKASAKI *et al*, 1996).

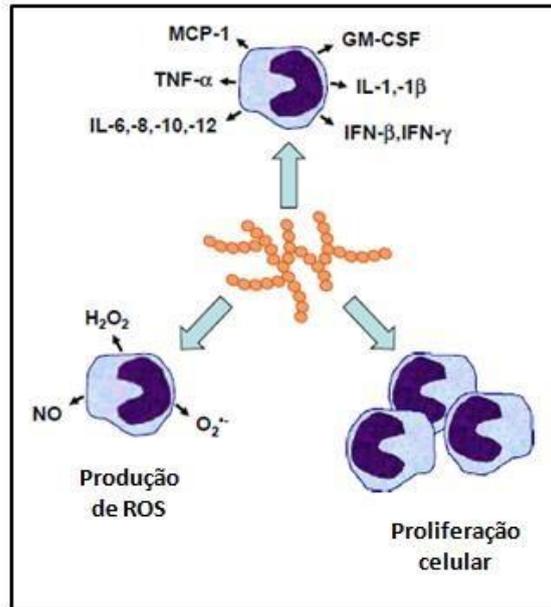


Figura 4. Ativação celular ocasionada por polissacarídeos.

Fonte: Extraída e adaptada (SCHEPETKIN & QUINN, 2006).

Nota: MCP-1: proteína quimioatrativa de monócitos; GM-CSF: Fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos; IFN: interferon.

Fagocitose

A internalização de uma partícula pode iniciar-se por vários receptores que a reconhecem na forma livre ou opsonizada (aderida ao complemento ou a anticorpos). A partir da ativação do receptor se inicia a cascata de sinalização que promove a fagocitose através do uso da actina e miosina, um processo tanto biomolecular quanto biofísico, que resulta no engolfamento da partícula em um fagossomo. Este se funde a um lisossomo para formar um fagolisossomo com capacidade oxidativa e proteolítica, além da aptidão para outros processos decompositores. Além do sequestro e degradação de partículas próprias como células mortas e seus detritos, a fagocitose promove a eliminação de corpos estranhos. Tais objetivos são conseguidos com uma combinação de sinais físicos (tamanho, forma e maleabilidade da partícula) e biológicos (reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos - PAMPs ou partículas opsonizadas). Sendo assim, sinais físicos e biológicos são muito significativos para a regulação da fagocitose em macrófagos (PACHECO, 2013).

O receptor dectina-1 é conhecido como o responsável pelo sinal para fagocitose das β (1→3) glucanas e está sob investigação o envolvimento do TLR4 (FUENTES & SIGOLA, 2011).

Com relação aos efeitos das β glucanas sobre a fagocitose existe muita discussão, uma vez que alguns autores obtêm resposta inibitória (GIAIMIS *et al*, 1993; FUENTES *et al*, 2011) e outros, por sua vez, têm um resultado estimulatório (CHENG *et al*, 2008).

Citocinas

As citocinas são sinalizadores celulares importantes produzidos pelos macrófagos e por outras células do sistema imunológico. Atuam em etapas importantes como migração (IL-8, TNF- α), inflamação (IL-1, IL-6, IL-12, IL-17, IFN- γ , TNF- α), diferenciação (IFN- γ , IL-1 β) e ativação (IL-4, IL-13), além de ter ação anti-inflamatória (IL-10, TGF- β 1) (McLAREN *et al*, 2011; SÁNCHEZ-RAMÓN *et al*, 2011).

Os fatores de transcrição envolvidos na produção de IL-6 (como NF-kB) podem ser estimulados por TNF- α , IL-1, produtos bacterianos (como LPS), infecções virais ou produtos de células necróticas. Receptores do tipo *Toll* (TLRs) são importantes principalmente nos casos que não envolvem TNF- α ou IL-1, sendo que sua ativação é um dos primeiros eventos para a produção de IL-6 (NAUGLER & KARIN, 2008).

A citocina TNF- α pode ser produzida por macrófagos e por linfócitos T ativados em resposta a agentes como microrganismos. A transcrição gênica é a etapa mais importante no controle da produção, sendo que o fator NF-kB é essencial (YOUNG *et al*, 2001).

Óxido nítrico

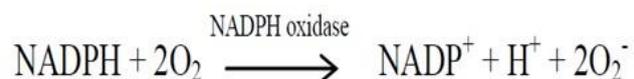
O óxido nítrico (NO) é produzido através da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) por macrófagos e tem função importante na defesa antimicrobiana, inflamação e angiogênese, sendo estimulada por citocinas ou bactérias. Também é produzido constitutivamente pela óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (STUEHR, 1999). O NO está também envolvido na ação citotóxica dos macrófagos para certos microrganismos e células tumorais devido à geração de espécies reativas de nitrogênio, e por isso pode ser considerado ao mesmo tempo citotóxico, e citoprotetor (THOMAS *et al*, 2008).

Os macrófagos, além de ser parte importante do sistema imunológico são a maior fonte de NO, e essa produção ocorre em diferentes níveis e para diferentes funções. A quantidade de NO produzido depende da maneira como a célula é estimulada, por exemplo, em cultura, um estímulo com LPS gera até 30 vezes mais NO

do que o estímulo com TNF- α ou IL-1 β . Sendo assim, pela quantidade de NO produzido pode-se inferir se uma molécula estimula essa produção através da via das citocinas ou pela via do LPS (receptores *Toll-like 4*) (THOMAS *et al*, 2008).

***Burst* respiratório**

O *burst* respiratório é o mais potente mecanismo usado por fagócitos como monócitos, macrófagos e neutrófilos para destruir “invasores”. Parte importante deste mecanismo é a conversão de oxigênio molecular em ânion superóxido (O₂⁻) através da enzima NADPH oxidase (VESTVIK *et al*, 2013).



Vários estudos avaliam a ação de diversos polissacarídeos sobre células do sistema imunológico (macrófagos) *in vitro*, através de cultivo celular com dosagem de citocinas, óxido nítrico e ânion superóxido, além de avaliação da atividade fagocítica (CHOI *et al*, 2005; MELLINGER *et al*, 2005; CHENG *et al*, 2008).

2. JUSTIFICATIVA

Diversos estudos apontam que polissacarídeos podem exercer ação modulatória sobre a resposta imunológica (AKRAMIENE *et al*, 2007; LEUNG *et al*, 2006). Os fungos do filo Basidiomycota são conhecidos produtores de polissacarídeos com atividade biológica e muitos estudos vêm sendo realizados com estas biomoléculas (LEUNG *et al*, 2006; SUN *et al*, 2013). Atualmente microrganismos vêm adquirindo diversas maneiras para resistir a antimicrobianos e, com base nesta afirmação, a descoberta de fármacos que poderiam auxiliar as células de defesa do organismo no combate aos agentes infecciosos seria um grande avanço. Além disso, parte dos efeitos antitumorais exercidos por polissacarídeos são decorrentes de ativação do sistema imunológico (COOK *et al*, 2001; GORDON & TAYLOR, 2005). Tudo isso vem a ser um incentivo à busca por novas moléculas bioativas de diversas fontes que possam vir a se tornar no futuro uma inovação em tratamentos de doenças infecciosas ou cancerígenas. As β -glucanas são os principais moduladores da resposta biológica, desta forma, são promissores os trabalhos com moléculas bioativas na busca por um potencial modificador da resposta biológica (MRB), e justifica-se o estudo da $\beta(1\rightarrow3)$ glucana isolada a partir do basídeo de *G. australe*.

3. OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo geral avaliar os efeitos *in vitro* da β (1 \rightarrow 3) glucana SK5 sobre macrófagos peritoneais de camundongo quanto à toxicidade celular e suas propriedades imunomoduladoras.

Objetivos específicos

a) Avaliar a viabilidade celular pelo teste do MTT nas células tratadas com diferentes concentrações de polissacarídeo;

b) Avaliar os efeitos *in vitro* das diferentes concentrações da β (1 \rightarrow 3) glucana em questão sobre macrófagos quanto à capacidade de ativação destas células através da análise morfológica e da determinação da atividade fagocítica, determinação da produção das citocinas IL-6 e TNF- α e determinação da produção de óxido nítrico e ânion superóxido;

c) Avaliar os efeitos *in vitro* das diferentes concentrações da β (1 \rightarrow 3) glucana quanto à capacidade sequestradora de ânion superóxido.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Estratégia experimental

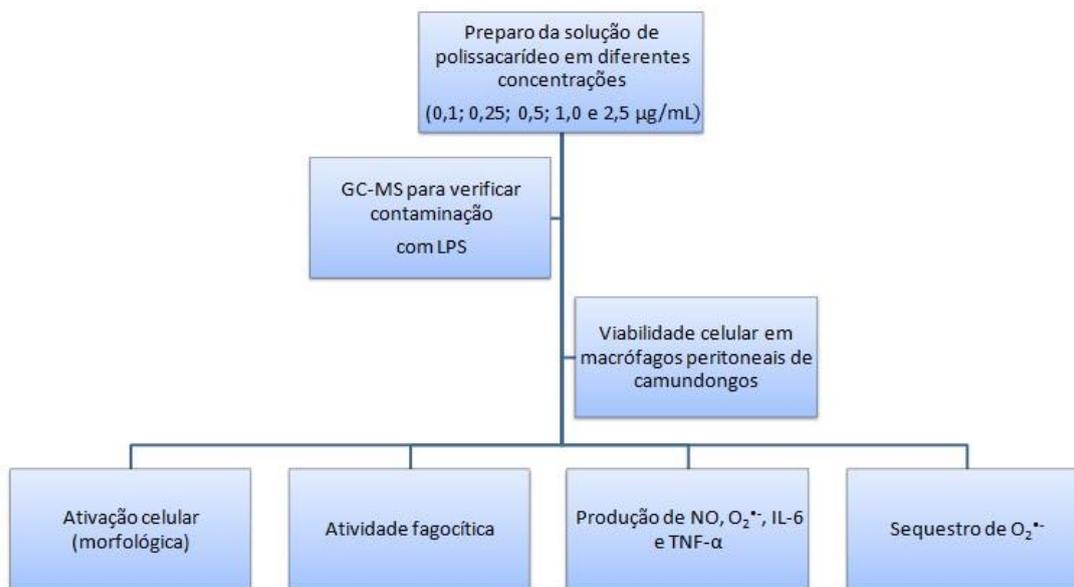


Figura 5. Estratégia experimental.

Material e reagentes

Reagentes adquiridos da Sigma-Aldrich™ Co (St Louis, MO, EUA): bicarbonato de sódio, ácido 4-(2-HidroxiEtil)-1-PiperazinEtanolSulfônico (tampão HEPES), naftiletenodiamino, sulfona p-aminobenzeno, nitrito de sódio, acetato de forbolmiristato (PMA), metanol, nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH), formaldeído, ácido acético, ácido pícrico e metassulfato de fenazina (PMS).

Reagentes adquiridos da Synth™ (Diadema, SP, BRA): glicose, fenol, cloreto de sódio, cloreto de potássio, fosfato de sódio dibásico e fosfato de potássio monobásico.

Reagentes adquiridos da Amresco™ LLC (Solon, OH, EUA): Brometo de 3-metil[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio (MTT) e nitrobluetetrazólio (NBT).

Reagentes adquiridos da Pepro Tech™ (Ribeirão Preto, SP, BRA): kits de ELISA para quantificação das citocinas de camundongos (TNF- α e IL-6).

Outros reagentes de marcas diversas: soro fetal bovino (LGC Biotecnologia™ – Cotia, SP, BRA), meio RPMI (Life Technologies-Gibco™ – São Paulo, SP, BRA), ácido sulfúrico (Quimex S.A.™ – La Milla, SMP, PER), ácido fosfórico (Farmanilquima™ – Curitiba, PR, BRA), dimetilsulfóxido (DMSO) (Proquimios™ – Rio de Janeiro, RJ, BRA), gentamicina (Teuto™ – Anápolis, GO,

BRA), fermento biológico (FleischmannTM – Sorocaba, SP, BRA), corante Giemsa (LaborclinTM – Pinhais, PR, BRA).

Materiais adquiridos de marcas diversas: seringas de plástico (10 mL) esterilizadas (BDTM – BectonDikinson – São Paulo, SP, BRA), agulhas (0,70mm x 25mm) esterilizadas (NiproTM - Sorocaba, SP, BRA), placas de culturas multipoços esterilizadas (TPPTM – Techno Plastic Products – Zollstrasse, Trasadingen, SUÍ), lâminas para microscopia (Bioslide-BiosystemsTM - Curitiba, PR, BRA), lamínulas circulares (LaborglasTM – São Paulo, SP, BRA).

O lipopolissacarídeo (LPS) foi cedido pela Professora Doutora Guilhermina Rodrigues Noleto do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná (UFPR). O Entellan (MerckTM – São Paulo, SP, BRA) foi adquirido no Laboratório de Histologia da Unioeste.

Os demais reagentes utilizados foram preparações comerciais de pureza analítica adequada. As soluções dos reagentes foram preparadas com água ultrapura em sistema ultrapurificador MarteTM (Santa Rita do Sapucaí, MG, BRA).

Material biológico

Camundongos Swiss do sexo masculino provenientes da Universidade Estadual de Maringá com aproximadamente dois meses de idade foram mantidos no Biotério Setorial do Prédio das Biomédicas, com foto-período de 12 horas claro/12 horas escuro. A alimentação consistiu em ração comercial e água clorada *ad libitum*.

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Unioeste (Anexo 1).

Polissacarídeo

O basidiomiceto *Ganoderma australe* utilizado neste trabalho foi coletado na unidade de conservação da Mata Atlântica, Refúgio Biológico Bela Vista do município de Foz do Iguaçu-PR e gentilmente cedido pela Prof^a Dr^a Marina K. Kadowaki do Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas (CCMF) da Unioeste. A identificação taxonômica foi realizada pela Dra. Adriana Gugliota no Laboratório de Micologia do Instituto Botânico de São Paulo. Após uma série de extrações de polissacarídeos do basidioma, o extrato foi concentrado, dialisado, utilizado em um

processo de gelo-degelo e hidrólise ácida, e analisado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS).

As frações obtidas foram utilizadas para análise da composição polissacarídica do basídio, sendo que SK5 foi o sobrenadante obtido após o gelo-degelo da extração alcalina a 5% de KOH. Esta fração foi submetida à hidrólise com ácido trifluoracético 2M em 100 °C durante 8 horas, e a composição monossacarídica identificada por GC-MS.



Figura 6. O fungo coletado na Reserva Biológica Bela Vista do município de Foz do Iguaçu-PR, Brasil.

Fonte: AYALA *et al*, 2012.

A partir do material liofilizado da β (1 \rightarrow 3) glucana SK5, realizou-se as etapas seguintes: pesagem e solubilização em água ultrapura (4 mg/mL) com agitação *overnight*, filtração em membrana de 0,22 μ m para esterilização e dosagem de carboidratos totais pelo método fenol-sulfúrico (DUBOIS *et al*, 1956).

Foi enviada para Curitiba-PR uma alíquota para análise por GC-MS (na Universidade Federal do Paraná – UFPR), para detecção de possível contaminação por lipopolissacarídeo (LPS) (SANTANA-FILHO *et al*, 2012).

Cultivo e manutenção de células

As soluções tampão e os meios de cultura de células foram preparados de acordo com as especificações do fabricante, conforme demonstrado a seguir.

O meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) (MOORE *et al*, 1963) foi reconstituído em água ultrapura e suplementado com bicarbonato de sódio e HEPES. O pH foi ajustado para 7,3 e em seguida a solução passou por processo de esterilização

através de filtro com poros de 0,22 μm . Previamente ao uso houve a adição de soro fetal bovino (SFB 5%) e gentamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Obtenção dos macrófagos

Os macrófagos foram obtidos da cavidade peritoneal de camundongos eutanasiados de acordo com o protocolo aprovado pelo comitê de ética no uso de animais. Em seguida, foram extraídos por meio da infusão de solução salina tamponada (PBS) estéril a 4 °C com auxílio de seringa e agulha, seguida por massagem para descolamento das células. A suspensão resultante foi então aspirada (com auxílio da mesma seringa) e centrifugada a duas mil rotações por minuto (2000 rpm) durante 15 minutos a 4 °C (centrífuga Eppendorf 5810 R). O sobrenadante foi descartado e o resíduo formado foi ressuspensão em meio RPMI contendo 5% de soro fetal bovino (SFB) e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina. As células foram então plaqueadas na concentração de 2×10^5 células/poço em placa de 96 poços para os experimentos de determinação da viabilidade celular, atividade fagocítica, dosagens de óxido nítrico e ânion superóxido. Para os experimentos de dosagem de citocinas foram plaqueadas 1×10^6 células/poço em placas de 24 poços. Os macrófagos foram aderidos às placas por meio de incubação a 37 °C sob atmosfera de 5% de CO_2 durante duas horas. Células não aderentes foram retiradas por meio de lavagem com PBS estéril (SASADA *et al*, 1983; NOLETO *et al*, 2002) (Figura 7).

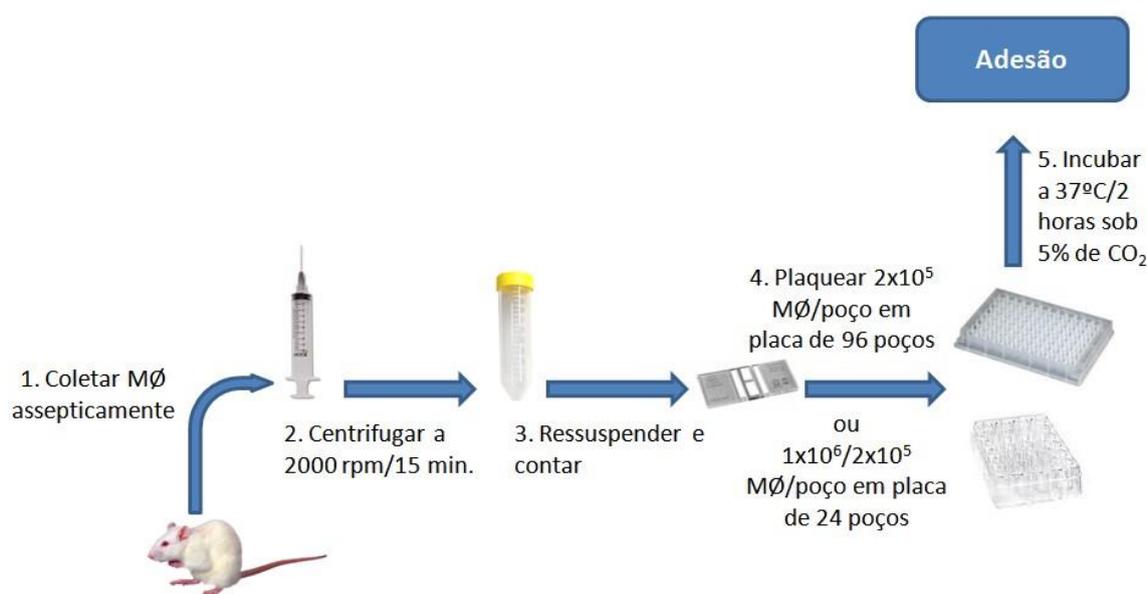


Figura 7. Obtenção de macrófagos (MØ) da cavidade peritoneal de camundongos

Fonte: Adaptada (SASADA *et al*, 1983; NOLETO *et al*, 2002, ADRIAZOLA *et al*, 2014).

Determinação da viabilidade celular

A determinação da viabilidade celular ocorreu pelo método do MTT (REILLY *et al*, 1998), com o objetivo de visualizar uma possível diminuição no número de macrófagos viáveis quando em contato com a β (1 \rightarrow 3) glucana SK5 e, conseqüentemente, determinar concentrações convenientes para os demais testes (sem redução significativa na viabilidade). Este procedimento determina se houve a ocorrência de uma modificação nas desidrogenases celulares pelo MTT (3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio), visualizada somente nas células ainda metabolicamente ativas (capazes de catalisar a redução do MTT em um produto colorido e insolúvel no meio de cultura, os cristais de formazan). O formazan é então solubilizado em DMSO (dimetilsulfóxido) e o resultado obtido através de leitura óptica a 550 nm.

O plaqueamento dos macrófagos foi realizado com 2×10^5 células/poço na placa de 96 poços. Com as células já aderidas, ocorreu a lavagem com PBS estéril (para retirada dos macrófagos não aderentes), e foi adicionado o tratamento com as diferentes concentrações da β (1 \rightarrow 3) glucana SK5 (0,1 a 2,5 $\mu\text{g/mL}$) diluído em meio RPMI. Após 48 horas de incubação (37 °C sob 5% de CO_2) o tratamento foi aspirado e houve a adição de 200 μL de MTT (500 $\mu\text{g/mL}$ em HBSS) e mais 3 horas de incubação. Em seguida, o MTT foi aspirado, houve a adição de 150 μL de DMSO (para solubilizar o formazan) e ocorreu a leitura a 550 nm no leitor de microplacas BioTek™ Epoch (Figura 8). O meio de cultura sem nenhum tipo de tratamento foi utilizado como controle.

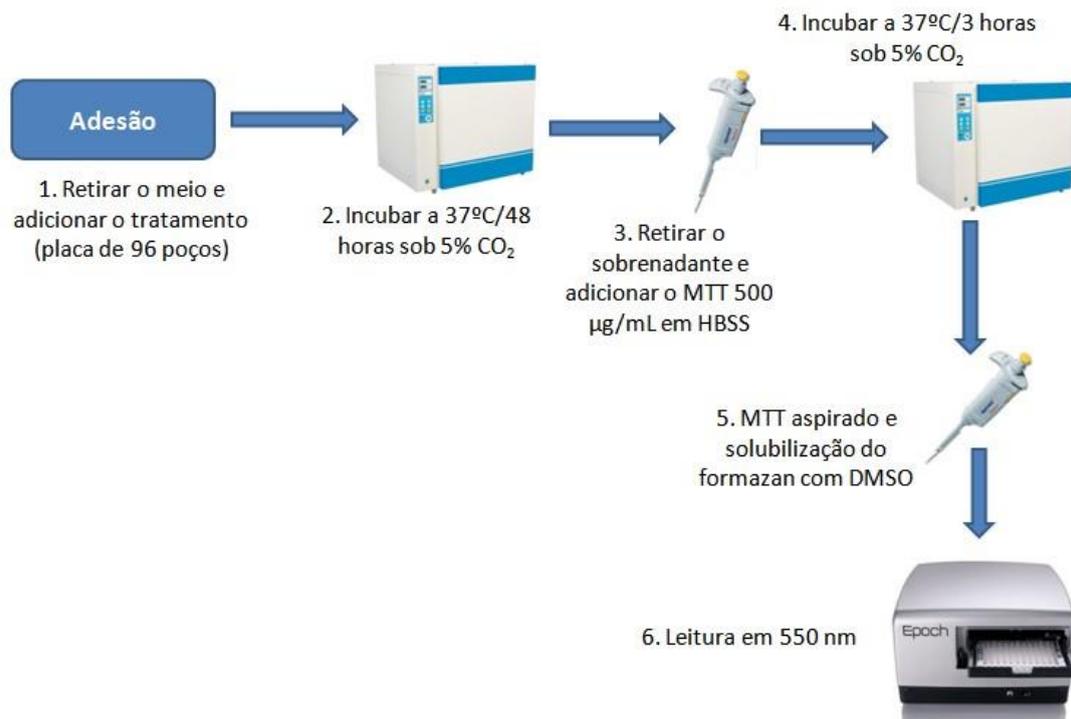


Figura 8. Determinação da viabilidade celular.

Fonte: Adaptada (REILLY *et al.*, 1998).

Determinação da ativação celular (morfologicamente)

O método para avaliar a ativação celular foi baseado em Moretão *et al.* (2003), com a finalidade de classificar os macrófagos em não ativados e ativados, realizando a contagem em microscópio óptico e definindo a porcentagem de células em cada classe.

Os macrófagos foram plaqueados em placas de 24 poços com lamínulas circulares na contagem de $2,5 \times 10^5$ células por poço, sendo tratados por 48 horas com as diferentes concentrações da β (1 \rightarrow 3) glucana SK5. Após o tratamento os macrófagos foram fixados com solução de Bouin (ácido pícrico + formol na proporção 3:1 respectivamente; no momento do uso adicionou-se 1mL de ácido acético a cada 20 mL desta solução) durante 5 minutos, lavados duas vezes com álcool 70% e duas vezes com água destilada, corados com Giemsa (2 gotas/mL de água destilada) por 15 minutos e as lamínulas processadas para microscopia, sendo contadas 500 células em cada replicata e calculada a porcentagem de macrófagos não ativados e ativados (Figura 9).

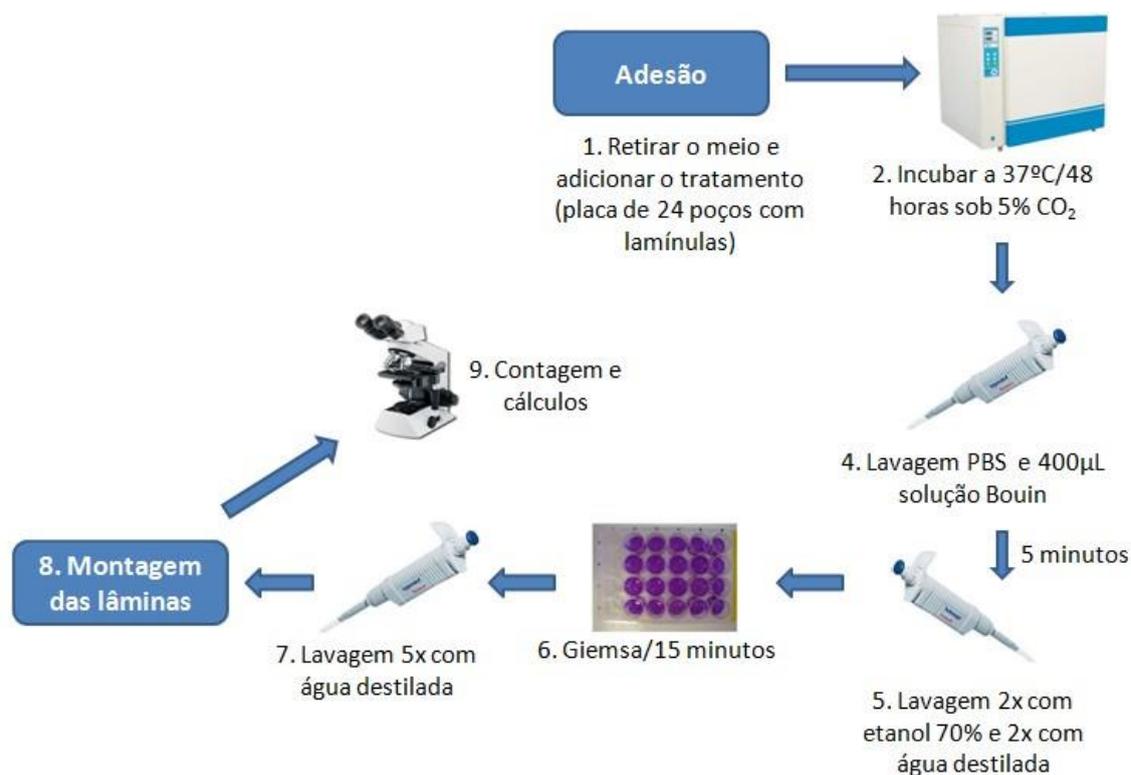


Figura 9. Determinação morfológica da ativação celular.

Ensaio de atividade fagocítica

Para determinar o efeito da β (1 \rightarrow 3) glucana SK5 na atividade fagocítica foi realizado ensaio com base no método de Rubel *et al* (2010). Este método consiste em adicionar partículas passíveis de fagocitose (zimosan) aos poços onde os macrófagos estão aderidos, fixá-los, lavá-los e extrair o conteúdo fagocitado para avaliar o nível de fagocitose através de leitura espectrofotométrica em 550 nm em comparação ao controle (100% de fagocitose).

O plaqueamento dos macrófagos foi realizado com 2×10^5 células/poço na placa de 96 poços. Depois de os macrófagos aderidos o meio de cultivo foi aspirado, as células foram lavadas com PBS estéril e foi adicionado o tratamento com as diferentes concentrações de SK5 (0,1 a 0,5 $\mu\text{g/mL}$) diluído em meio RPMI. Após 48 horas de incubação (37°C sob 5% de CO₂), 10 μL de solução de fagocitose (zimosan 0,02 g + 0,3 mL de solução estoque (vermelho neutro 0,02 g + DMSO 1mL)) em 3 mL de PBS) foram adicionados e a reação foi incubada por 30 minutos (37°C sob 5% de CO₂). Em seguida a placa foi centrifugada (1500 rpm/5 minutos), lavada com PBS e foram adicionados 100 μL de fixador de Baker (solução aquosa com 4% de formaldeído, 2% de cloreto de sódio e 1% de acetato de cálcio). Após 30 minutos

incubada, a placa foi novamente centrifugada e lavada (nas mesmas condições), e houve a adição de 100 μ L de solução de extração (solução hidroalcoólica com 2% de ácido acético glacial 96%). Com 30 minutos de reação a leitura foi realizada em leitor de microplacas BioTek® Epoch com 550 nm de comprimento de onda (Figura 10).



Figura 10. Ensaio de atividade fagocítica.

Fonte: Adaptada (RUBEL et al, 2010).

Determinação da produção de citocinas (IL-6 e TNF- α)

O ensaio efetuado para verificar a capacidade da β (1 \rightarrow 3) glucana SK5 em estimular a produção de citocinas em macrófagos de camundongos obedeceu a seguinte sequência: O plaqueamento dos macrófagos foi realizado com 1×10^6 células/poço na placa de 24 poços. Após adesão e lavagem, foi adicionado 1 mL do tratamento com as diferentes concentrações da β (1 \rightarrow 3) glucana SK5 (0,1 a 1,0 μ g/mL) diluído em meio RPMI com 5% de SFB. Após 2 horas de incubação (37 °C sob 5% de CO₂) alíquotas de 500 μ L com o tratamento foram retiradas para dosagem de TNF- α (com base na curva cinética para produção de TNF- α). Com 48 horas de tratamento realizou-se a alíquota do meio de reação para as dosagens de IL-6 (LEE *et al*, 2009) (Figura 10). Todas as alíquotas foram armazenadas a -4 °C para posterior dosagem por meio de ELISA, conforme especificações do fabricante (PeproTech™). Lipopolissacarídeo (LPS) na concentração de 50 ng/mL foi utilizado como controle positivo.

Todos os produtos celulares analisados passaram por um teste cinético com dois grupos de macrófagos, um tratado com o controle positivo (LPS) e outro sem

tratamento, tendo o sobrenadante coletado em diferentes tempos e analisado para a determinação dos picos de produção de TNF- α e IL-6.



Figura 11. Determinação da produção de citocinas (TNF- α e IL-6)

Fonte: Adaptada (LEE *et al.*, 2009).

A quantificação das citocinas ocorreu por meio do teste imunoenzimático ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) de captura. A microplaca foi sensibilizada com o anticorpo de captura específico. Em contato com a amostra, os anticorpos de captura interagem eficientemente e especificamente com a citocina de interesse. Em seguida, foram adicionados anticorpos de detecção que interagem também com a citocina em questão formando um “sanduíche”. Na sequência da reação, ocorreu a adição de anticorpos secundários conjugados a uma peroxidase HRP (*horseradish peroxidase*), e estes se ligaram aos anticorpos de detecção. A peroxidase atua sobre o substrato ABTS (2,2'-Azinobis [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]-diammoniumsalt) e gera um produto final de cor verde (Figura 11). A leitura foi então realizada monitorando o desenvolvimento da cor em um leitor de placas ELISA a 405 nm com correção do comprimento de onda ajustado a 650 nm.

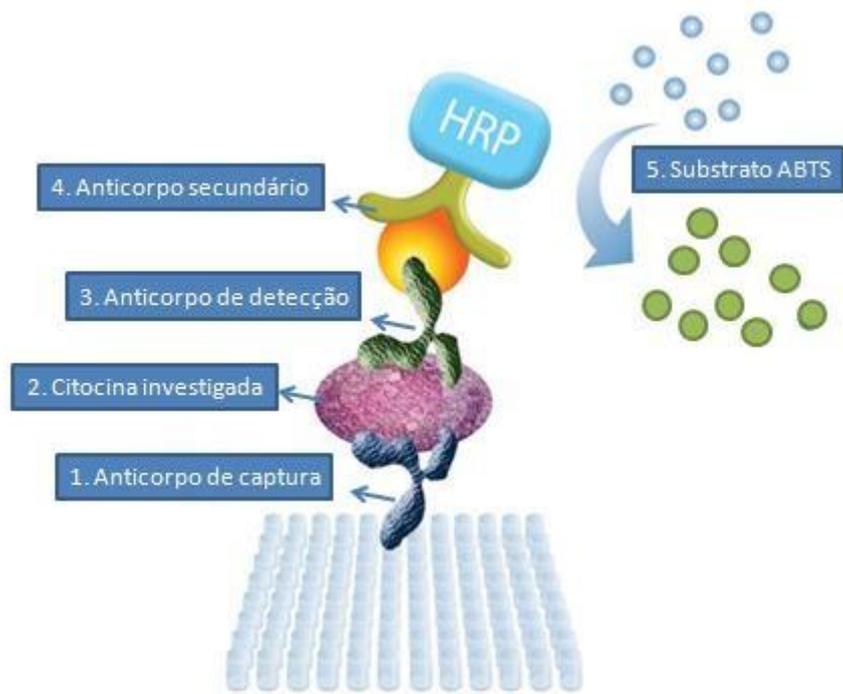


Figura 12. ELISA de captura

Fonte: Adaptada (Affymetrix Bioscience, disponível em <<http://www.ebioscience.com/knowledge-center/product-line/elisa/platinum-elisa-kits.htm>>. Acesso em 11 março 2014).

Determinação da produção de óxido nítrico (NO)

A avaliação do efeito de SK5 na produção de NO foi realizada com base no método de Green e colaboradores (1982). Este método consiste em dosar os produtos de degradação do NO (nitrito e nitrato) por meio da reação com o reagente de Griess. O nitrito vem a reagir com a sulfanilamida no meio ácido formando um composto diazo que, por sua vez, reage com o cloridrato de *N*-(*naftil*)etilenodiamina (NED) para formar outro composto diazo (de coloração roxa) que pode ser lido em espectrofotômetro a 550 nm de comprimento de onda.

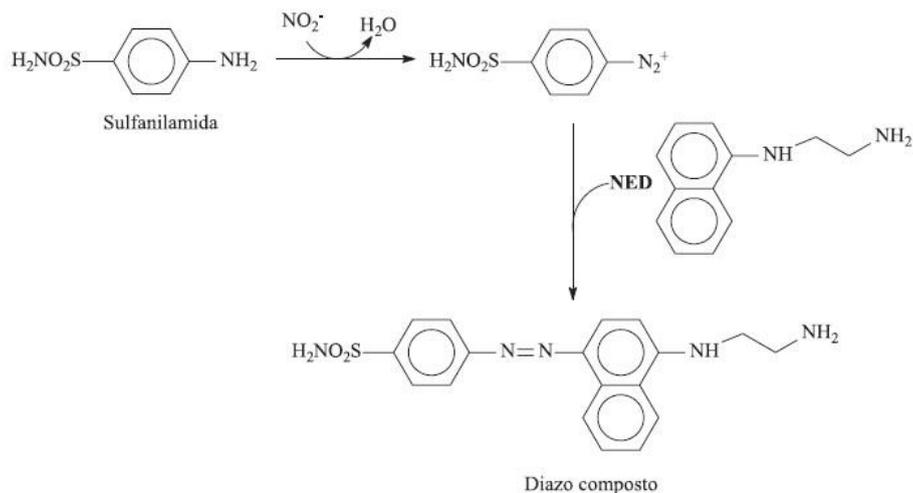


Figura 13. Nitrito e sua interação com reagente de Griess.

Fonte: Adaptada (RAMOS *et al*, 2006).

O plaqueamento dos macrófagos foi realizado com 2×10^5 células/poço na placa de 96 poços. Após a adesão, o meio de cultivo foi aspirado, as células não aderentes retiradas por meio de lavagem com PBS, e foi adicionado o tratamento com as diferentes concentrações da β (1 \rightarrow 3) glucana SK5 (0,1 a 0,5 $\mu\text{g/mL}$) diluído em meio RPMI. Após 48 horas de incubação (37 °C sob 5% de CO_2) o meio com tratamento foi misturado na proporção 1:1 com o reagente de Griess (sulfonamida 1% em ácido fosfórico 5% misturada no momento da reação com *N*-(naftil)etilenodiamina (NED) 0,1% em ácido fosfórico 5% na proporção 1:1). Com 10 minutos de reação a leitura foi realizada em leitor de microplacas BioTek™ Epoch com 550 nm de comprimento de onda (GREEN *et al*, 1982) (Figura 14). Lipopolissacarídeo (LPS) na concentração de 50 ng/mL foi utilizado como controle positivo.



Figura 14. Determinação da produção de óxido nítrico (NO)

Fonte: Adaptada (GREEN *et al*, 1982; AMARAL, 2011).

Determinação da produção de ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$)

A avaliação do efeito da β (1 \rightarrow 3) glucana SK5 na produção de ânion superóxido por macrófagos de camundongos Swiss foi realizada com base no método

de Muñoz *et al* (2000). Este método consiste em avaliar a existência de ânion superóxido por meio da redução do NBT (nitroblue tetrazolium) a formazan (Figura 15).

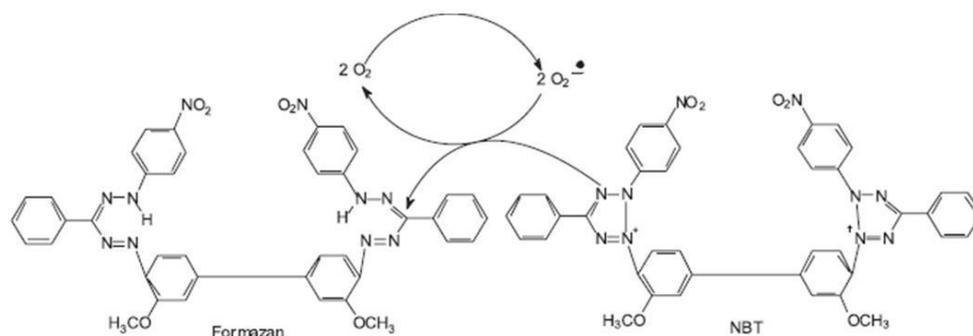


Figura 15. Ânion superóxido (O₂^{•-}) reduzindo NBT a formazan.

Fonte: Adaptada (OLIVEIRA *et al*, 2009).

Nota: O ânion superóxido produzido reduz o NBT a formazan produzindo coloração roxa que pode ser lida a 560 nm.

O plaqueamento dos macrófagos foi realizado com 2×10^5 células/poço em placa de 96 poços. As células foram aderidas e após a retirada dos macrófagos não aderentes foi adicionado o tratamento com as diferentes concentrações da β (1 \rightarrow 3) glucana SK5 (0,1 a 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) diluída em solução de NBT (nitrobluetetrazolium – 2,5 mg/mL em HBSS). Após 1 hora de incubação (37 °C sob 5% de CO₂), a microplaca foi centrifugada a 1500 rpm/5 minutos, lavada com PBS, centrifugada novamente (mesmas condições) e as células foram fixadas com metanol 50% durante 10 minutos a 37 °C e sob 5% de CO₂. A seguir a placa foi centrifugada novamente (1500 rpm/5 minutos), o metanol retirado e a reação prosseguiu com a placa incubada a 37 °C (sem tampa) para evaporar o metanol restante. Foram adicionados então 120 μL de KOH 2M e 140 μL de DMSO por poço (para solubilizar o formazan resultante da redução do NBT) e a reação incubada por 30 minutos. A leitura foi realizada em leitor de microplacas BioTek™ Epoch com 550 nm de comprimento de onda (Figura 16). Acetato de forbolmiristato (PMA) na concentração de 1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foi utilizado como controle positivo e experimentos paralelos foram realizados com as mesmas concentrações da β (1 \rightarrow 3) glucana SK5 na presença de 1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PMA.

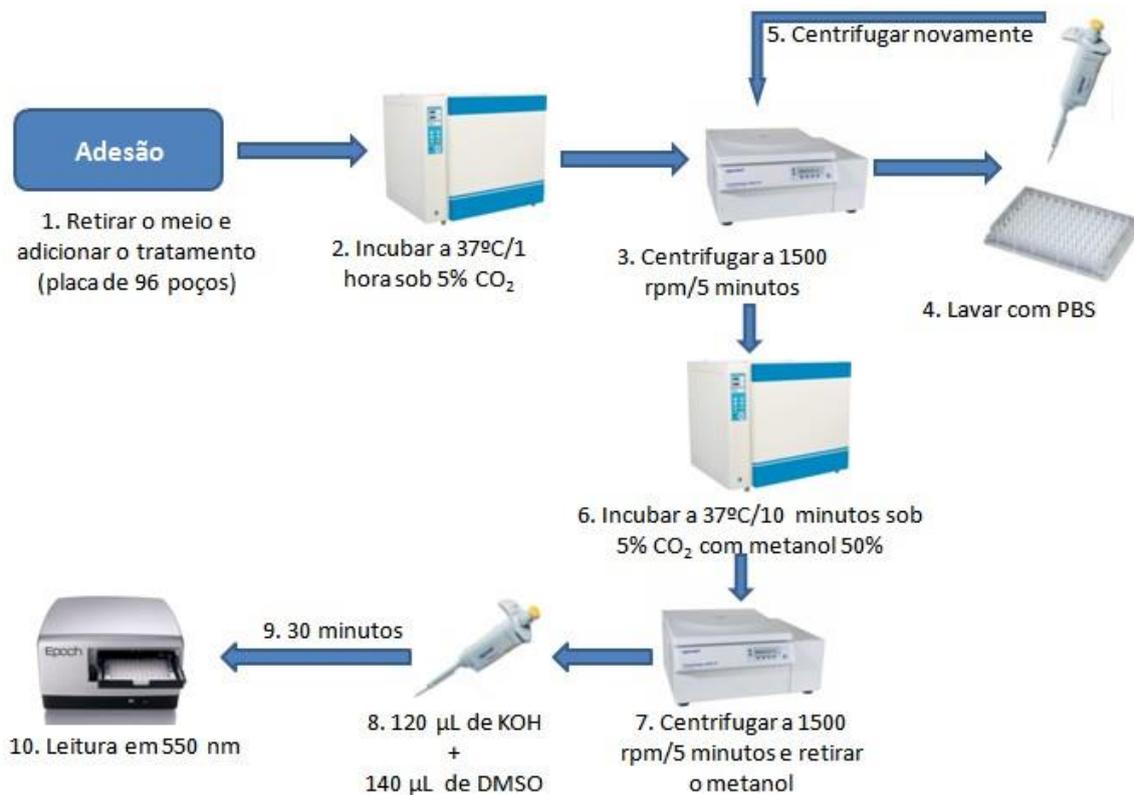


Figura 16. Determinação da produção de ânion superóxido

Fonte: Adaptada (MUÑOZ *et al.*, 2000).

Determinação da capacidade sequestradora de ânion superóxido (O₂^{•-})

A avaliação do efeito da β (1→3) glucana SK5 no sequestro de ânion superóxido foi realizada com base no método de Nishikimi e colaboradores (1972). Este método consiste na produção de formazan ao se adicionar NADH, PMS e NBT. Na presença de um antioxidante (sequestrador de O₂^{•-}) haverá redução na produção de formazan (Figura 17), o que pode ser acompanhado através de leitura espectrofotométrica a 560 nm.

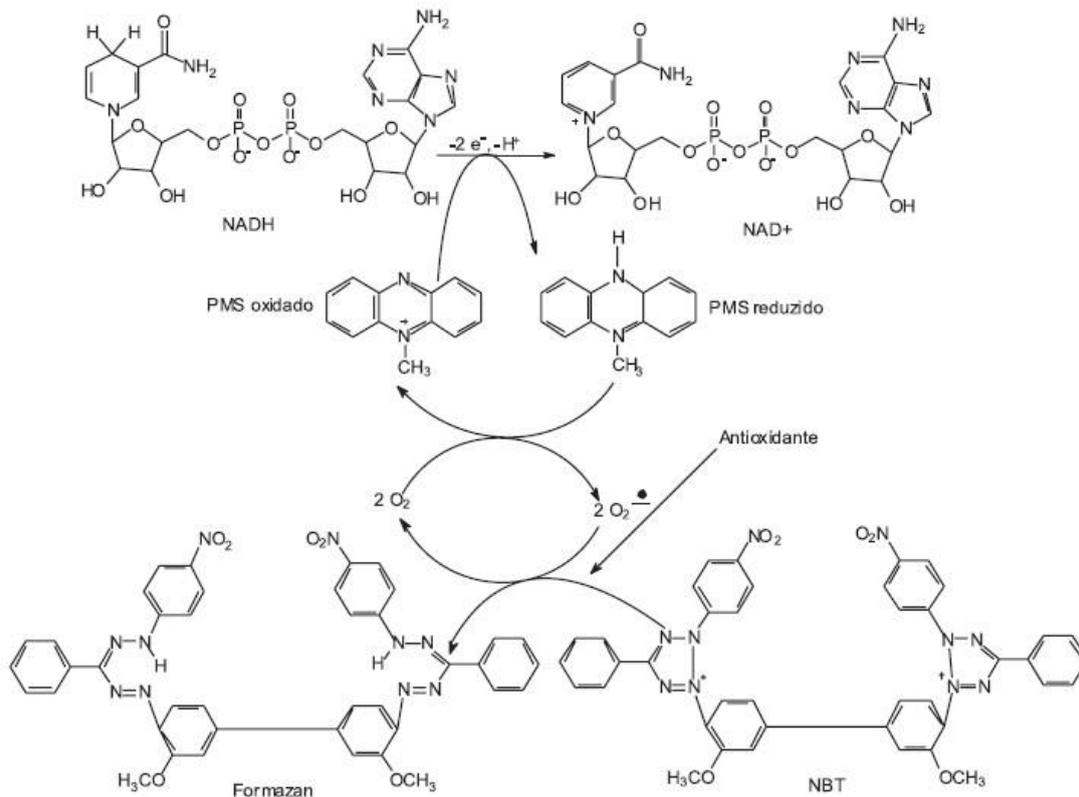


Figura 17. Reação de produção de formazan e o sequestro de ânion superóxido (O₂^{•-}) Fonte: Adaptada (OLIVEIRA *et al*, 2009).

Nota: Reação entre NADH, PMS e NBT produz formazan, a menos que o O₂^{•-} intermediário na reação seja removido.

A avaliação da capacidade sequestradora de ânion superóxido foi realizada em sistema livre de células. Em microplaca de 96 poços foram pipetados 200 µL de tampão TRIS-HCl (10 mM, pH 8) contendo 72 µM de NBT e 340 µM de NADH. Foram adicionados 25 µL do tratamento com as diferentes concentrações da β (1→3) glucana SK5 (0,1 a 0,5 µg/mL) diluído em meio RPMI e a reação foi iniciada pela adição de 25 µL de tampão TRIS-HCl (10 mM, pH 8) contendo 30 µM de PMS. A leitura foi realizada em leitor de microplacas Molecular DevicesTM SpectraMax Plus 384 no modo cinético *automix*, com monitoramento contínuo por 5 minutos e comprimento de onda de 560 nm (NISHIKIMI *et al*, 1972) (Figura 18). O controle positivo consistiu de poços sem a adição de PMS (sem produção de formazan, como se todo o O₂^{•-} tivesse sido sequestrado).

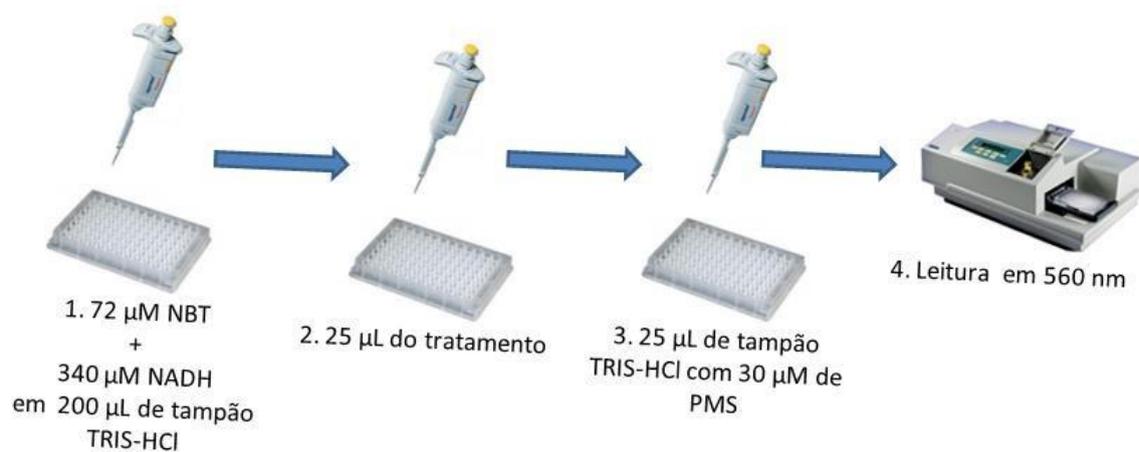


Figura 18. Ensaio de sequestro de ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$)

Fonte: Adaptada (NISHIKIMI *et al.*, 1972).

Análises estatísticas

Todos os testes foram realizados com pelo menos 2 replicatas e no mínimo 3 experimentos independentes. Foi realizada a análise de variância ANOVA (fator duplo sem repetição) e o teste de Tukey (com o programa GraphPad PrismTM) para chegar aos resultados que são apresentados como média e desvio padrão. O nível de significância é de 5%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

GC-MS e RMN C¹³

A composição monossacarídica demonstrou predominância de glucose (81,3%), com a presença de outros açúcares (manose, arabinose, xilose, ramnose, fucose e galactose) em concentração inferior (cerca de 3% cada um). Por ressonância magnética nuclear de carbono 13 comprovou-se que SK5 é uma β -glucana, com ligações glicosídicas do tipo β (1 \rightarrow 3) e provavelmente substituídas em 4-O.

Uma alíquota da β (1 \rightarrow 3) glucana SK5 foi enviada para a Universidade Federal do Paraná (UFPR) a fim de verificar, por GC-MS, a qualidade da amostra em relação à contaminação por LPS. O método utilizado detecta e quantifica LPS em amostras de carboidrato usando GC-MS de derivados acetilados 3-OH ácidos graxos metil ésteres com robustez e especificidade, além da sensibilidade de até 1ng. Este método conseguiu detectar LPS em concentrações até 100 vezes menores do que as comumente utilizadas como controle positivo em testes imunológicos (SANTANA-FILHO *et al*, 2012). A Figura 19 mostra os espectros com o controle positivo (LPS) em **A** e a β (1 \rightarrow 3) glucana SK5 em **B**.

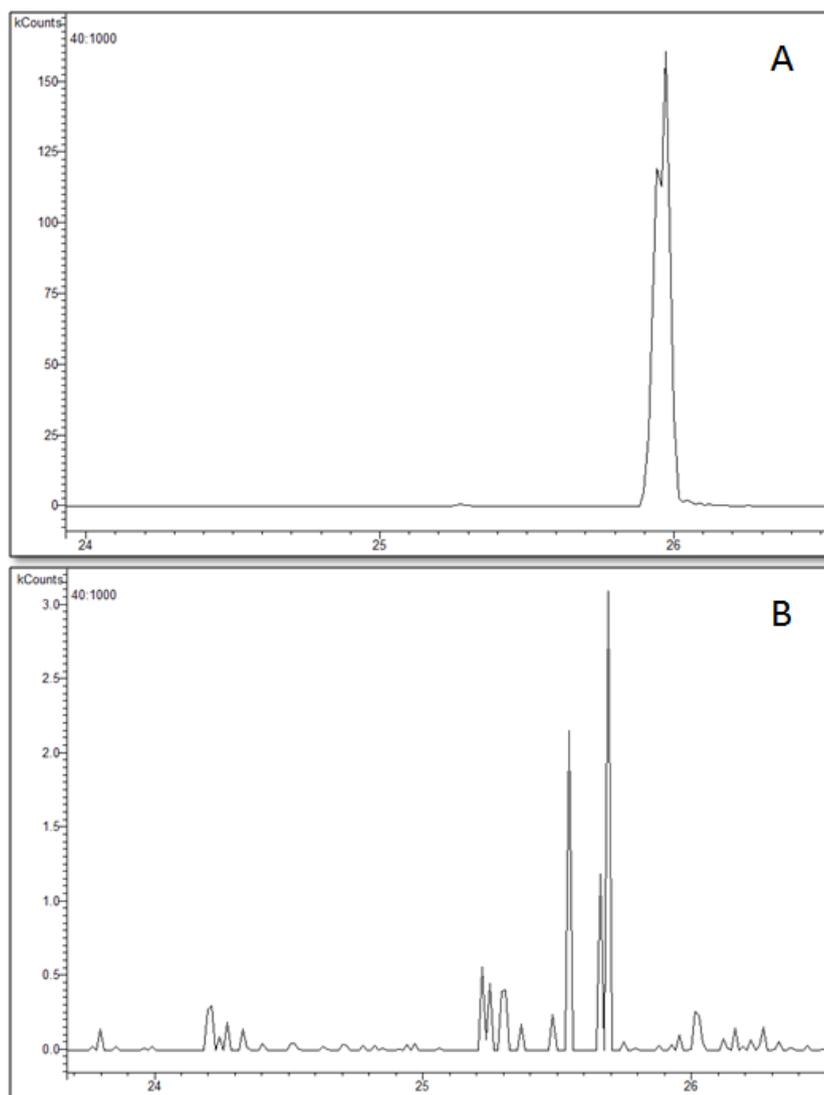


Figura 19. GC-MS para verificação de contaminação por LPS. (A) Pico característico de LPS em aproximadamente 26 minutos de retenção. (B) Espectro com o padrão da β (1 \rightarrow 3) glucana SK5 sem as características de contaminação por LPS.

A partir desse resultado tornaram-se possíveis os testes biológicos subsequentes que utilizam LPS como controle positivo, devido à bem estabelecida ativação de macrófagos promovida pelo mesmo. A ligação de LPS ao receptor TLR4, por exemplo, ativa tanto vias pró-inflamatórias quanto vias anti-inflamatórias. Algumas dessas vias foram avaliadas no presente trabalho.

Efeitos sobre a viabilidade celular

A β (1 \rightarrow 3) glucana SK5 passou por um processo de teste de toxicidade celular com o objetivo de determinar as concentrações viáveis para um tratamento não prejudicial. Os macrófagos foram testados com diferentes concentrações do polissacarídeo durante 48 horas.

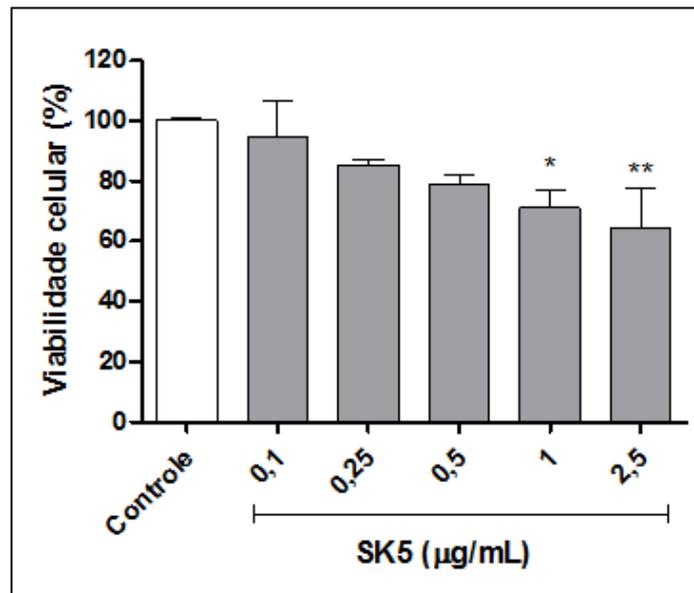


Figura 20. Viabilidade celular de macrófagos peritoneais tratados com SK5 por 48 horas. Resultados obtidos para viabilidade celular de macrófagos peritoneais de camundongos sob o efeito da β (1 \rightarrow 3) glucana SK5 nas concentrações de 0,1 $\mu\text{g/mL}$, 0,25 $\mu\text{g/mL}$, 0,5 $\mu\text{g/mL}$, 1,0 $\mu\text{g/mL}$ e 2,5 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n = 3$, cada experimento realizado em triplicata). * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ em relação ao controle (células tratadas apenas com meio de cultura).

A Figura 20 mostra que nas concentrações de 1,0 $\mu\text{g/mL}$ e 2,5 $\mu\text{g/mL}$ da β (1 \rightarrow 3) glucana SK5 os macrófagos tiveram sua viabilidade afetada em aproximadamente 29% e 35,5% respectivamente, ou seja, a β (1 \rightarrow 3) glucana SK5 foi tóxica para as células nessas concentrações. A partir deste resultado a maior concentração apresentada para a maioria dos resultados dos experimentos subsequentes foi 0,5 $\mu\text{g/mL}$, ou seja, sem redução estatisticamente significativa na viabilidade das células em tratamento, quando comparados ao controle.

Semelhantemente, uma β (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6) glucana com massa molecular de aproximadamente 2 MDa foi analisada como possível componente de um biofilme e passou pelo teste do MTT para avaliar a viabilidade de fibroblastos, mas sem apresentar diferença significativa com relação ao controle numa concentração equivalente a aproximadamente 300 $\mu\text{g/mL}$ (HUANG & YANG, 2008).

Outra β (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6) glucana, obtida de *S. cerevisiae*, foi avaliada como componente de um sistema de micro partículas usado na liberação controlada de antígenos para vacinação oral, e passou pelo teste do MTT nas concentrações de 1,25 e 2,5 mg/mL (85% das micropartículas eram compostas por β (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6) glucana). As células utilizadas foram de epitélio intestinal (Caco-2 e HT-29), sendo que houve

redução de até aproximadamente 30% na viabilidade das células HT-29 quando tratadas por 24 horas com a maior concentração de glucana (SMET, *et al*, 2013).

A β (1 \rightarrow 3) glucana SK5 apresentou toxicidade considerável a partir de 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Novos fármacos necessitam da menor dose possível que seja segura e ao mesmo tempo eficaz (GOODMAN & GILMAN, 2012). Sendo assim, se comprovada a capacidade de modular a resposta biológica com doses inferiores ou iguais a 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de SK5 seria um indício de que a molécula talvez possa ser utilizada numa dose pequena que seja simultaneamente segura e eficaz.

5.3 Efeitos sobre a ativação celular

No teste de ativação celular, para classificar as células como não ativadas foram utilizados os seguintes critérios: núcleo centralizado, pequeno, e com a cromatina condensada, além de o macrófago possuir baixa razão citoplasma/núcleo e um formato alongado com pouco potencial de espreadimento da superfície. A classificação dos macrófagos como “ativados” foi baseada nas características de núcleo deslocado para a periferia, alta razão citoplasma/núcleo, células arredondadas e maiores em comparação com as residentes, alta capacidade de espreadimento e a presença de vacúolos citoplasmáticos (ADAMS & HAMILTON, 1984; BURKE & LEWIS, 2002).

A Figura 21 apresenta os resultados em relação aos efeitos sobre a ativação celular obtidos pela avaliação por microscopia óptica. A análise dos grupos aos pares (por exemplo, grupo controle residente contra grupo controle ativado, C_R e C_A , respectivamente) demonstra que o controle apresenta maior população de macrófagos residentes, enquanto que o controle positivo, LPS, apresenta maior população de células ativadas, portanto, esse resultado está de acordo com o esperado.

Além disso, observa-se que há uma tendência em aumentar o número de macrófagos ativados com o aumento da concentração de SK5. Na concentração de 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a diferença significativa observada demonstra que há mais macrófagos residentes que ativados. Aumentando-se a concentração de SK5 para 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, observa-se que não há diferença significativa entre as populações de macrófagos residentes e ativados, indicando que houve um aumento do número de células ativadas em relação ao tratamento com 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Essa tendência em aumentar a população de células ativadas tornou-se estatisticamente significativa na concentração de 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de SK5. Dessa forma, na maior concentração da glucana β (1 \rightarrow 3) SK5 (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) obteve-se o mesmo padrão de ativação do controle positivo, sendo que nas outras

concentrações analisadas (0,1 e 0,25 $\mu\text{g/mL}$) existe uma aparente relação dose-dependente.

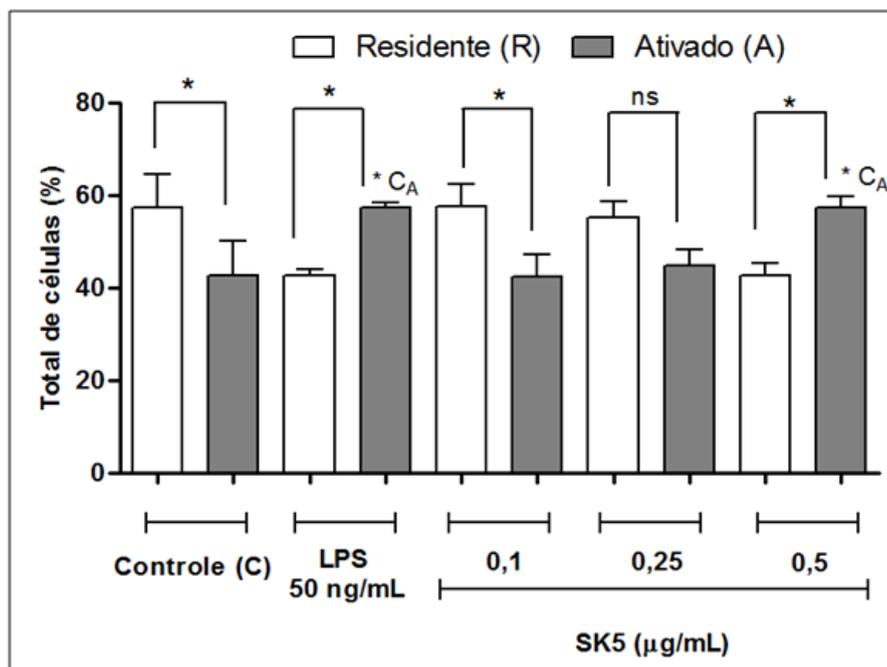


Figura 21. Ativação celular de macrófagos peritoneais tratados com SK5 por 48 horas. Resultados obtidos para ativação celular de macrófagos peritoneais de camundongos sob o efeito da β (1 \rightarrow 3) glucana SK5 nas concentrações de 0,1 $\mu\text{g/mL}$, 0,25 $\mu\text{g/mL}$ e 0,5 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão (n = 3, cada experimento realizado em duplicata). * P < 0,05.

Em um estudo de revisão avaliou-se diferentes características das (1 \rightarrow 3)- β -D-glucanas envolvidas com a relação entre estrutura e atividade (BOHN & BeMILLER, 1995). As características estruturais consideradas foram: o tipo de ligação da cadeia principal, grau e frequência de ramificação, peso molecular, conformação molecular, solubilidade, entre outros. Através da análise desses parâmetros, a melhor conclusão observada foi a de que a capacidade imunomoduladora de (1 \rightarrow 3)- β -D-glucanas depende da conformação helicoidal e da presença de grupos hidrofílicos localizados na face externa da superfície da hélice. Dessa forma, a ativação de macrófagos observada para SK5 pode estar relacionada a uma conformação espacial em forma de hélice quando em solução aquosa e a presença de grupos hidrofílicos em sua superfície externa. Entretanto, estudos conformacionais posteriores são necessários para avaliar essa hipótese.

A forma pela qual β -glucanas interagem com macrófagos para exercer suas funções biológicas tem sido avaliada. Lebron e colaboradores (2003) relataram que uma β -glucana isolada da parede celular do fungo oportunista *Pneumocystis carinii*

(agora denominado *Pneumocystis jiroveci*), uma causa comum de pneumonia entre pacientes imunocomprometidos, ativa significativamente macrófagos alveolares de ratos e da linhagem RAW 264.7 a liberarem citocinas pró-inflamatórias. Demonstraram que essa β -glucana ativa os macrófagos através de NF- κ B. Essa ativação de NF- κ B ocorreu de forma semelhante à causada por LPS, mas não pelo receptor TLR-4. Como a β -glucana de *Pneumocystis jiroveci* apresenta uma cadeia principal formada por unidades de glucose em conformação (1 \rightarrow 3)- β -D-glucopiranosil e com cadeias laterais com unidades (1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil, semelhante à glucana isolada de *Ganoderma australe*, SK5 pode ter ativado os macrófagos peritoneais de camundongos por receptores outros que não TLR-4.

Também foi caracterizada a forma pela qual uma β -glucana produzida pela bactéria Gram-positiva fixadora de nitrogênio *Paenibacillus polymyxa* JB115 ativou macrófagos da linhagem RAW 264.7 (CHANG *et al*, 2010). Demonstrou-se que essa β -glucana induziu a fosforilação de I κ -B e, conseqüentemente, a translocação de NF- κ B para o núcleo (uma vez que I κ -B em sua forma defosforilada inibe a atividade de NF- κ B), resultando em um aumento na produção de óxido nítrico. O exopolissacarídeo obtido de *Paenibacillus polymyxa* JB115 apresentou peso molecular de aproximadamente 100 kDa e foi caracterizado como uma glucana com estrutura β -(1 \rightarrow 3) e β -(1 \rightarrow 6)-ligada, sugerindo que a via de NF- κ B pode ser necessária para a ativação causada por SK5.

Tendo obtido efeito biomodulador da β (1 \rightarrow 3) glucana SK5 sobre os macrófagos peritoneais de camundongos Swiss pela análise morfológica, os experimentos foram direcionados para a verificação da atividade fagocítica, produção de citocinas (TNF- α e IL-6), produção de NO e O $_2^{\cdot-}$ e atividade sequestradora de O $_2^{\cdot-}$.

Efeitos sobre a atividade fagocítica

O papel principal dos macrófagos seja a fagocitose, sendo assim, a capacidade de modular esta atividade celular pode ser um alvo de bastante interesse.

A Figura 22 mostra o resultado obtido após os ensaios realizados em placas de 96 poços e é possível observar um aumento da capacidade fagocítica em todas as concentrações analisadas:

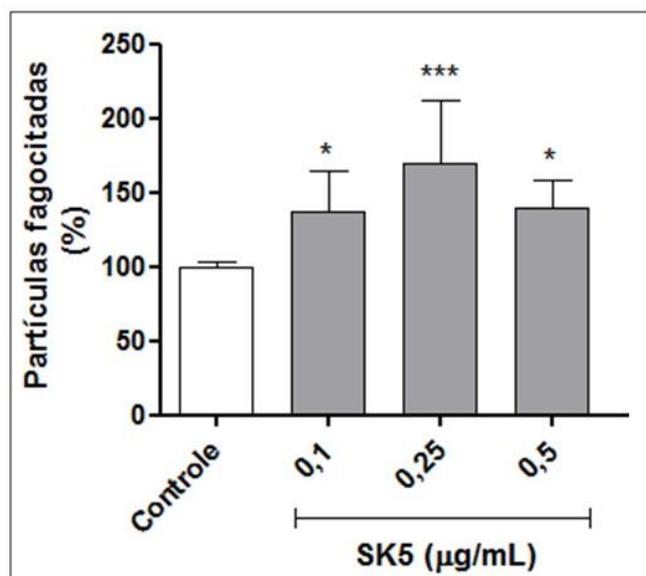


Figura 22. Capacidade fagocítica de macrófagos peritoneais tratados com SK5 por 48 horas. Resultados obtidos para a capacidade fagocítica de macrófagos peritoneais de camundongos sob o efeito da β (1 \rightarrow 3) glucana SK5 nas concentrações de 0,1 $\mu\text{g/mL}$, 0,25 $\mu\text{g/mL}$ e 0,5 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n = 3$, cada experimento realizado em triplicata). * $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$ em relação ao controle (células tratadas apenas com meio de cultura).

Na concentração 0,1 $\mu\text{g/mL}$ houve aumento de 32,6% na capacidade fagocítica, chegando a 50,6% com 0,25 $\mu\text{g/mL}$ de polissacarídeo. Quando o tratamento foi realizado com 0,5 $\mu\text{g/mL}$ o aumento na fagocitose foi de 42,2%, podendo ser devido ao desvio padrão das respostas ou até à queda de 21,3% na viabilidade, demonstrada na Figura 20.

Uma β (1 \rightarrow 3) glucana (SSG) extraída do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* demonstrou alto índice de ramificação (1 \rightarrow 6), além de hidrossolubilidade considerável (OHNO *et al*, 1986). SSG foi injetada via intravenosa em camundongos (10 mg/kg) e, após um dia, macrófagos alveolares foram coletados e a análise da capacidade fagocítica realizada. SSG apresentou capacidade de aumentar a taxa de fagocitose em cerca de 81,16%, além de modular outras funções importantes no combate a microrganismos e células cancerígenas no espaço alveolar (SAKURAI *et al*, 1995).

Três frações polissacarídicas foram extraídas de *Lentinus edodes* (F-I, II e III), sendo que F-II é composta por três β glucanas com massa molecular de 308, 580 e 658 kDa. A atividade fagocítica foi analisada em testes de citometria de fluxo com células RAW 264.7 tratadas com 300 $\mu\text{g/mL}$ de polissacarídeo, e apenas F-II foi capaz de elevar o nível de fagocitose semelhantemente ao controle positivo (em torno de 20%), além de outras funções de macrófagos que incluem alterações morfológicas e produção de citocinas (LEE *et al*, 2008).

A interação entre o macrófago e a partícula a ser fagocitada inicia-se com o reconhecimento por parte do fagócito de diferentes Padrões Moleculares Associados à Patógenos (PAMPs), que é efetuado através de células germinativas que possuem Receptores de Reconhecimento Padrão (PRRs como receptores de manose, *scavenger* e tipo *Toll*, por exemplo), estes, se ligam aos PAMPs e iniciam uma cascata de reações que possui diversas consequências, entre elas o aumento da capacidade fagocítica (YADAV & SCHOREY, 2006). Devido a este fino ajuste molecular, outras β -glucanas já demonstraram ação oposta à observada nos trabalhos citados anteriormente, ocasionando inibição da fagocitose, o que pode ser explicado pela presença de pequenas diferenças estruturais ocasionadas por substituintes, ou apenas na estrutura geométrica, o que acaba por bloquear os PRRs. (CZOP, 1986).

Laminarina é uma β glucana extraída de *Laminaria digitata* e foi analisada quanto à atividade exercida sobre a fagocitose em macrófagos de linhagem RAW 264.7. Interessantemente, detectou-se uma inibição dose dependente por parte do polissacarídeo analisado nas concentrações 3, 30 e 300 $\mu\text{g/mL}$ (bloqueio do receptor Dectina-1). No entanto, cerca de 60% da fagocitose estimulada por LPS 1 ng/mL foi inibida pelo antiinflamatório esteroide dexametasona 10^{-5} M, enquanto o tratamento concomitante com LPS 1 ng/mL e laminarina 100 $\mu\text{g/mL}$ não apresentou queda na taxa de fagocitose, o que pode indicar um mecanismo de reconhecimento de glucanas diferente entre células “virgens” e células pré-ativadas (FUENTES *et al*, 2011).

A β (1 \rightarrow 3) glucana SK5 foi analisada somente em células não ativadas. Em testes posteriores poderá ser estudado o efeito biológico sobre macrófagos pré-ativados para observar possíveis alterações de resposta.

Efeitos sobre a produção de IL-6

A citocina IL-6 pode ser produzida em resposta a ativação celular por TNF- α e IL-1 β , produtos bacterianos (por exemplo LPS), infecções virais ou produtos de células necróticas. Nos casos que não envolvem TNF- α ou IL-1 β os receptores do tipo *Toll* são os principais envolvidos. Quando ocorre uma infecção microbiana, o principal estímulo pró-inflamatório é dado pela produção de IL-6, TNF- α e IL-1 β , sendo que IL-6 é a primeira a ser detectada e a única responsável pela produção de febre e pela resposta de fase aguda no fígado (NAUGLER & KARIN, 2008).

Na Figura 23 pode-se observar que em todas as concentrações analisadas ocorre ao menos uma tendência de aumento na produção de IL-6. A produção chega a

ser 56,6% maior, em relação ao controle, na concentração 0,5 $\mu\text{g/mL}$, tendo um aumento de 33,1% e 34,5% nas concentrações 0,1 e 0,25 $\mu\text{g/mL}$ da β (1 \rightarrow 3) glucana SK5, respectivamente. Chama a atenção o aumento significativo da produção de IL-6 nas células tratadas com 1,0 $\mu\text{g/mL}$ de SK5 (111,23%), mesmo com um decréscimo de 29% nos macrófagos viáveis (ver Seção 6.2.).

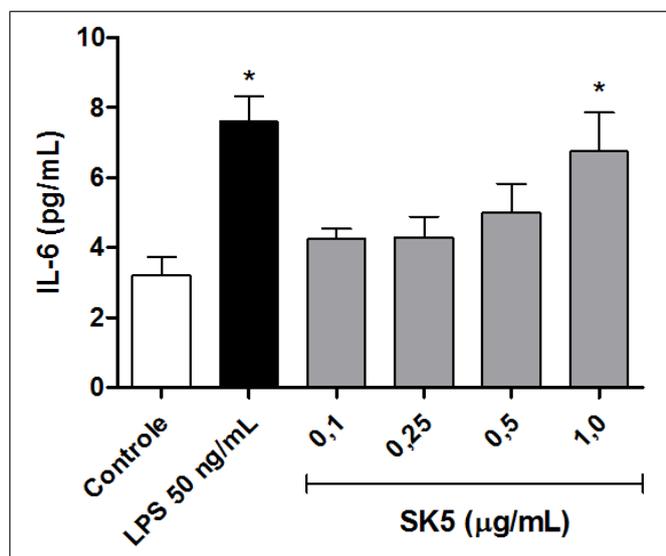


Figura 23. Produção de IL-6 por macrófagos peritoneais tratados com SK5 por 48 horas. Resultados obtidos para produção de IL-6 por macrófagos peritoneais de camundongos sob o efeito da β (1 \rightarrow 3) glucana SK5 nas concentrações de 0,1 $\mu\text{g/mL}$, 0,25 $\mu\text{g/mL}$, 0,5 $\mu\text{g/mL}$ e 1,0 $\mu\text{g/mL}$. Como controle positivo para a produção de IL-6 utilizou-se LPS (50 ng/mL). Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n = 3$, cada experimento realizado em triplicata). * $P < 0,05$ em relação ao controle (células tratadas apenas com meio de cultura).

O resultado obtido demonstra uma tendência à resposta dose-dependente com relação à produção de IL-6 por macrófagos peritoneais de camundongos Swiss. Pode-se observar na Figura 23 que, aparentemente, conforme aumenta a concentração da β glucana aumenta a produção da citocina (dentro das concentrações analisadas).

A via de ativação comumente utilizada pelo controle positivo (LPS) utiliza os receptores TLR4, onde se origina a cascata para um estímulo pró-inflamatório generalizado (passando pelos intermediários IRAK, MyD88, TRAF-6 e NF- κ B), no entanto, foi relatado que os receptores Dectina-1 e TLR2 estão envolvidos na ativação de macrófagos de camundongo durante uma infecção por *Coccidioides posadasii*, e que por meio da molécula adaptadora MyD88 também ocasionam a produção de IL-6 (VIRIYAKOSOL *et al*, 2005), indicando que SK5 pode estar atuando por meio de via semelhante a essa, o que necessita de maior investigação.

Foi também observado que os receptores Dectina-1 podem servir para amplificar a ativação dos macrófagos dependente de TLR2, e que o estímulo de MAPK não está relacionado aos receptores MR, CR3 e TLR4 em infecção por *M. avium* ou *M. smegmatis* (YADAV & SCHOREY, 2006), fortalecendo a hipótese de que o receptor Dectina-1 pode ser o responsável pelo efeito imunomodulador de SK5.

Entre as células do sistema imunológico encontram-se os linfócitos T auxiliares (T *helper*, ou Th), que se dividem em três classes principais: Th0, Th1 e Th2. Os linfócitos Th0 são células que nunca foram ativadas, podendo ser comparadas aos macrófagos não ativados. Os linfócitos Th1 são linfócitos ativados que fazem parte da imunidade celular (ou mediada por células, mais efetiva contra patógenos intracelulares) e os linfócitos Th2 são também ativados, mas atuam estimulando linfócitos B, com consequente produção de anticorpos (imunidade humoral, mais efetiva contra patógenos extracelulares). A diferenciação entre os linfócitos Th ativados é ocasionada pelas diferentes citocinas produzidas. As citocinas exercem a sinalização tanto de linfócitos como de macrófagos, e uma das citocinas que identifica as células Th2 é a IL-6. Constatou-se também que quando o sistema imunológico direciona para a resposta humoral, a resposta celular é inativada (MAYER & HOPKINS, 2006).

Sendo assim, o estímulo com a β (1 \rightarrow 3) glucana SK5 na concentração 1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pode estar direcionando o sistema imunológico para uma resposta mediada por anticorpos, enquanto nas concentrações abaixo de 1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ analisadas, a resposta estaria sendo direcionada para a imunidade celular, fato que necessita de maior investigação para obtenção de uma resposta concreta.

Efeitos sobre a produção de TNF- α

TNF- α é uma citocina que promove a inflamação e é produzida por macrófagos e por linfócitos T ativados durante estímulos como a presença de microrganismos. Possui ação quimiotática, auxiliando no recrutamento de mais células para o sítio inflamatório. A regulação é realizada principalmente no nível transcricional, sendo que NF- κ B é um fator crucial (YOUNG *et al*, 2001).

A figura 24 mostra que a β (1 \rightarrow 3) glucana SK5 não estimulou a produção da citocina TNF- α nas concentrações analisadas.

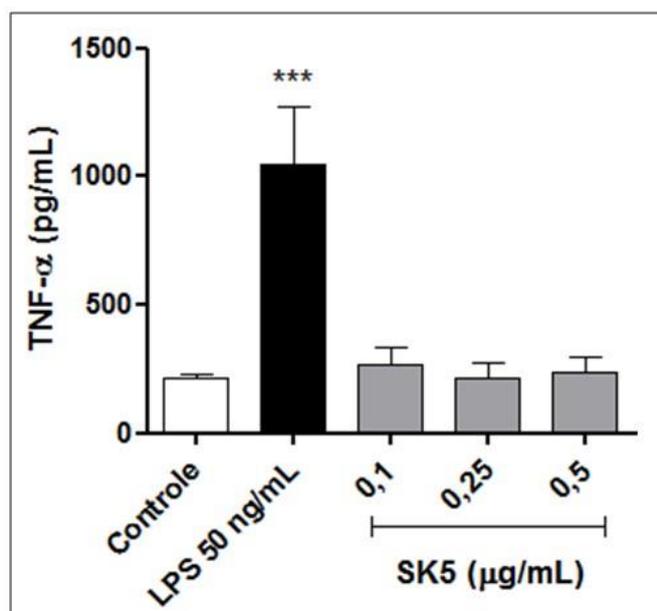


Figura 24. Produção de TNF- α por macrófagos peritoneais tratados com SK5 por 2 horas. Resultados obtidos para produção de TNF- α por macrófagos peritoneais de camundongos sob o efeito da β (1 \rightarrow 3) glucana SK5 nas concentrações de 0,1 μ g/mL, 0,25 μ g/mL e 0,5 μ g/mL. Como controle positivo para a produção de TNF- α utilizou-se LPS (50 ng/mL). Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão (n = 3, cada experimento realizado em triplicata). *** P < 0,001 em relação ao controle (células tratadas apenas com meio de cultura).

A β (1 \rightarrow 3) glucana Grifolan isolada do fungo comestível *Grifola frondosa* foi administrada via intraperitoneal em macrófagos de linhagem RAW 264.7 e demonstrou ser capaz de estimular a produção de TNF- α com detecção inicial em apenas duas horas. A ativação também mostrou relação direta com a diminuição do grau de ramificação da molécula e com o aumento do peso molecular (OHNO *et al*, 1995). Nessa linha de raciocínio testes sobre a estrutura de SK5 poderiam revelar uma molécula de alto grau de ramificação e baixo peso molecular, já que não houve estímulo para produção de TNF- α , no entanto, ainda não se pode afirmar com precisão.

Zymosan A é um componente da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e é constituído de 50 a 57% por β (1 \rightarrow 3) glucanas, por isso, foi utilizado como fonte desse tipo de polissacarídeo em um estudo do mecanismo molecular para a produção de TNF- α por macrófagos RAW 264.7. A produção da citocina mostrou ser dose dependente nos tratamentos entre 20 e 100 μ g/mL de Zymosan A, além de aumentar conforme o tempo entre 7,0 e 12,5 horas de tratamento com 100 μ g/mL de polissacarídeo. Através de mutação no sítio de ligação de NF-kB (kB3), comprovou-se ser este um ponto chave para a produção de TNF- α estimulada por Zymosan A (YOUNG *et al*, 2001).

Por outro lado, existem resultados que demonstram que o mesmo tipo de glucana (Zymosan) não foi capaz de ativar NF- κ B e estimular a produção de TNF- α em macrófagos de fígado de rato Wistar, sendo que o fator de transcrição AP-1 (proteína ativadora-1) é que foi ativado. A família de fatores de transcrição AP-1 é composta por *c-jun/c-fos* heterodímeros ou *c-jun/c-jun* homodímeros, e possui regulação mais complexa do que NF- κ B (TRAN-THI *et al*, 1995). Necessita-se de maior investigação para descobrir o motivo desta diferente resposta mediante Zymosan, sendo que SK5 poderia estar atuando através de via semelhante.

Outro trabalho ainda, apresenta a capacidade que uma β glucana extraída de *Lentinus Edodes* (Lentinan 200 μ g/mL) possui em inibir cerca de 75% da produção de TNF- α estimulada por LPS em macrófagos RAW 264.7. ERK e JNK estão envolvidos na produção de mediadores e citocinas inflamatórias e, por isso, foram analisados lisados citoplasmáticos das células por meio de Western blotting com anticorpos específicos contra ERK1/2 e JNK1/2. O resultado demonstrou que Lentinan inibiu a fosforilação de ERK, JNK e p38 MAPK, indicando interferência na resposta mediada por LPS e resultando em inibição da produção de TNF- α e NO (XU *et al*, 2012). Seriam interessantes ensaios semelhantes com a β (1 \rightarrow 3) glucana SK5, uma vez que não apresenta estímulo para a produção de TNF- α ou NO.

Efeitos sobre a produção de óxido nítrico (NO)

A produção de NO por macrófagos é realizada pela isoforma induzível da enzima óxido nítrico sintase (iNOS). Esta não é expressa constitutivamente e precisa de um estímulo pró-inflamatório para que ocorra a produção (XU *et al*, 2012).

Na Figura 25 pode-se observar que a β (1 \rightarrow 3) glucana SK5 não possui capacidade de ativar a produção de NO nas concentrações analisadas.

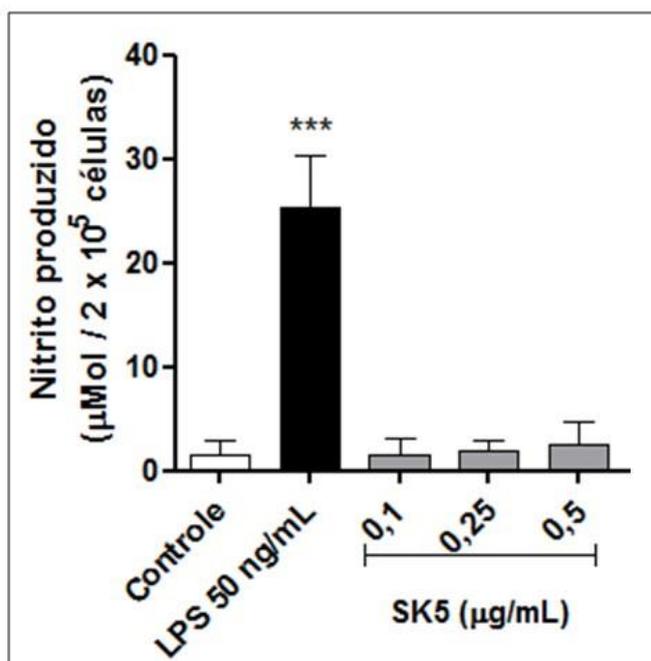


Figura 25. Produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais tratados com SK5 por 48 horas. Resultados obtidos para produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais de camundongos sob o efeito da β (1 \rightarrow 3) glucana SK5 nas concentrações de 0,1 μ g/mL, 0,25 μ g/mL e 0,5 μ g/mL. Como controle positivo para a produção de óxido nítrico utilizou-se LPS (50 ng/mL). Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão (n = 3, cada experimento realizado em triplicata). *** P < 0,001 em relação ao controle (células tratadas apenas com meio de cultura).

Glucanas com estruturas semelhantes à molécula SK5 têm demonstrado diferentes respostas quando avaliadas com relação à produção de NO por macrófagos de camundongo.

A β (1 \rightarrow 3) glucana *Lentinan* (citada anteriormente) possui ramificações com ligação do tipo 1 \rightarrow 6 e na concentração 200 μ g/mL demonstrou capacidade de inibir em aproximadamente 70% a produção de NO em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS. Essa resposta mostrou ser dose-dependente, pois em tratamento com menores concentrações houve percentual menor de inibição. Após 48 horas de tratamento das células com LPS 100 ng/mL, uma forte banda de proteína iNOS foi detectada através da análise Western blot, sendo que houve inibição considerável da mesma quando as células foram tratadas concomitantemente com *Lentinan*. Até mesmo o mRNA para iNOS foi reduzido cerca de 70% nos testes realizados com qPCR (Reação em cadeia da polimerase em tempo real – quantitativo) comparando o tratamento apenas com LPS e com o polissacarídeo (XU *et al*, 2012).

A β (1 \rightarrow 3) glucana SK5 não foi analisada quanto ao efeito inibitório sobre a produção de TNF- α ou NO, mas, por não apresentar estímulo positivo sobre

estes agentes inflamatórios estudos futuros sobre inibição podem apresentar resultados semelhantes aos obtidos com Lentinan.

β (1 \rightarrow 3) glucanas extraídas de *Saccharomyces cerevisiae* com diferentes massas moleculares e diferentes graus de ramificação por ligações 1 \rightarrow 6 não foram capazes de estimular a produção de NO por macrófagos peritoneais *in vivo*, nas concentrações entre 0,25 e 5 $\mu\text{g/mL}$, quando injetadas no peritônio de camundongos QS, nem nos experimentos *in vitro* com cultura de células. No entanto, houve aumento na produção de NO quando as células em cultura foram estimuladas simultaneamente com LPS e β -glucanas de alta massa molecular e alto grau de ramificação (CLEARY *et al.*, 1999). A análise estrutural da molécula SK5 poderá esclarecer essa relação futuramente, pois uma estrutura com menos ramificações e menor peso molecular poderia dificultar o reconhecimento do polissacarídeo pelos receptores responsáveis pelo aumento da expressão de iNOS.

Efeitos sobre a produção de $\text{O}_2^{\cdot-}$

O *burst* oxidativo é um processo onde se observa um rápido aumento no consumo de oxigênio com produção de ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e peróxido de oxigênio (H_2O_2) (BADWEY & KARNOVSKY, 1980). Foi constatado que o *burst* oxidativo pode ter intensidade diferente dependendo da maneira como foram obtidas as células e de seu local de origem. Deste modo, macrófagos residentes teriam resultado inferior quando comparados a macrófagos ativados com PMA, por exemplo, tendo uma produção de espécies reativas de oxigênio três vezes menor (COHEN *et al.*, 1981).

A produção de $\text{O}_2^{\cdot-}$ por macrófagos de camundongo estimulados com a β (1 \rightarrow 3) glucana SK5 foi analisada com o polissacarídeo apenas (Figura 26) e na presença de PMA (Figura 27), como forma de avaliar a ação do polissacarídeo sobre o *burst* oxidativo:

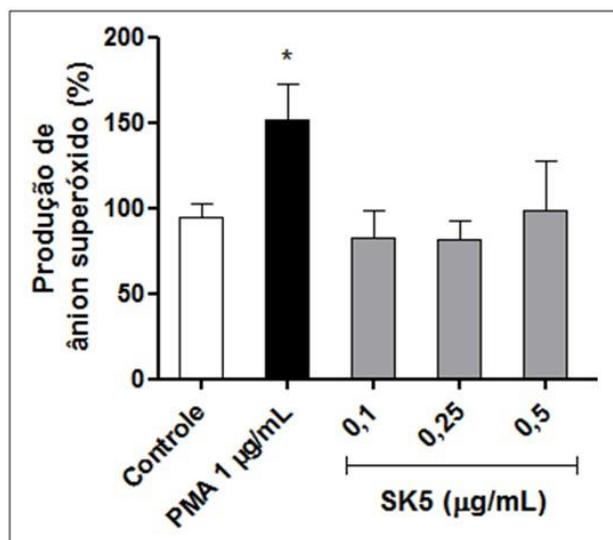


Figura 26. Produção de $O_2^{\cdot-}$ por macrófagos peritoneais tratados com SK5 por 1 hora. Resultados obtidos para produção de $O_2^{\cdot-}$ por macrófagos peritoneais de camundongos sob o efeito da β (1 \rightarrow 3) glucana SK5 nas concentrações de 0,1 μ g/mL, 0,25 μ g/mL e 0,5 μ g/mL. Como controle positivo para a produção de $O_2^{\cdot-}$ utilizou-se PMA 1,0 μ g/mL. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão (n = 3, cada experimento realizado em triplicata). *P < 0,05 em relação ao controle (células tratadas apenas com NBT).

Na Figura 26 a detecção de $O_2^{\cdot-}$ para SK5 (0,1-0,5 μ g/mL) não teve diferença significativa em relação ao grupo controle, sendo assim, a próxima avaliação dos macrófagos, tratados com o polissacarídeo concomitante ao controle positivo verificou a possibilidade de algum tipo de sinergismo, ou antagonismo, entre a β (1 \rightarrow 3) glucana SK5 e o PMA (Figura 27).

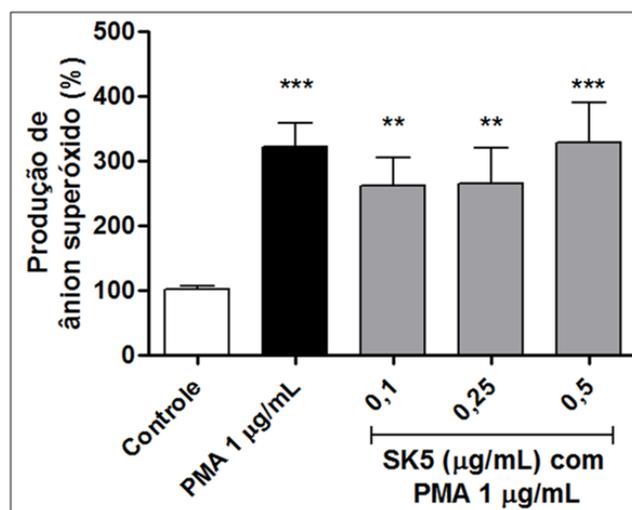


Figura 27. Produção de $O_2^{\cdot-}$ por macrófagos peritoneais tratados concomitantemente com SK5 e PMA por 1 hora. Resultados obtidos para produção de $O_2^{\cdot-}$ por macrófagos peritoneais de camundongos sob o efeito da β (1 \rightarrow 3) glucana SK5 nas concentrações de 0,1 μ g/mL, 0,25 μ g/mL e 0,5 μ g/mL, todas adicionadas de PMA 1 μ g/mL. Como controle positivo para a produção de $O_2^{\cdot-}$ utilizou-se PMA 1,0 μ g/mL. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão (n = 3, cada experimento realizado em triplicata). *P < 0,05 em relação ao controle (células tratadas apenas com NBT).

Observa-se na Figura 27 que a β (1 \rightarrow 3) glucana SK5 não interfere no *burst* respiratório. Outro trabalho realizado *in vitro* apresenta o tratamento com a β (1 \rightarrow 3) (1 \rightarrow 6) glucana GRN obtida de *Grifola frondosa* sobre macrófagos peritoneais de camundongos. Macrófagos residentes foram tratados com Zymosan 50 $\mu\text{g/mL}$, e o pré-tratamento com 250 $\mu\text{g/mL}$ de GRN reduziu a produção de H_2O_2 de 309 para 249 pmol. Quando o pré-tratamento foi realizado com GRN 500 $\mu\text{g/mL}$, a redução foi maior ainda (a produção caiu para 165 pmol de H_2O_2). No entanto, quando o tratamento foi realizado com PMA 100 ng/mL, o pré-tratamento com GRN não promoveu alteração na resposta. O pré-tratamento realizado com uma β glucana pode ocupar os receptores que promoveriam a ativação do *burst* respiratório num estímulo subsequente (ADACHI *et al*, 1993), fato que não ocorreu com relação à SK5.

Experimentos com tratamento *in vivo* demonstraram não haver diferença na produção de $\text{O}_2^{\cdot-}$ entre macrófagos peritoneais de camundongos tratados com β (1 \rightarrow 3) (1 \rightarrow 6) glucanas obtidas de *Saccharomyces cerevisiae* e o grupo controle, no entanto, quando houve a associação com PMA 10 $\mu\text{g/mL}$ os macrófagos foram capazes de elevar a produção de $\text{O}_2^{\cdot-}$, principalmente o grupo de maior massa molecular (CLEARY *et al*, 1999), sugerindo a possibilidade de que SK5 seja uma β -glucana de baixo peso molecular.

No presente trabalho, verificou-se que nas três concentrações polissacarídicas analisadas não houve aumento nem redução na produção de $\text{O}_2^{\cdot-}$ pelas células estimuladas, ou não, com PMA, ou seja, a modificação da resposta biológica ocasionada pela β (1 \rightarrow 3) glucana SK5 não interfere na via de ativação celular através da proteína quinase C (PKC) ou dos receptores de manose (MR) (SCHEPETKIN & QUINN, 2006).

Efeitos sobre o sequestro de $\text{O}_2^{\cdot-}$

Para avaliar uma possível atividade antioxidante ocasionada pela estrutura da β glucana em teste, foram realizados ensaios livres de células (*in vitro*), tendo como base a capacidade do polissacarídeo em inibir a redução do NBT pelo $\text{O}_2^{\cdot-}$ gerado durante a reação. A Figura 28 demonstra que a β (1 \rightarrow 3) glucana SK5 não interfere na disponibilidade de $\text{O}_2^{\cdot-}$:

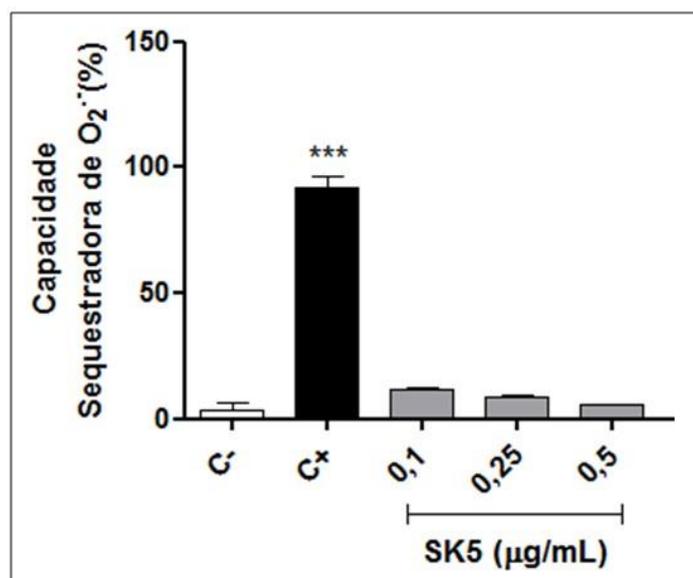


Figura 28. Capacidade sequestradora de O₂^{•-} por SK5. Resultados obtidos para sequestro de O₂^{•-} pela β (1→3) glucana SK5 nas concentrações de 0,1 µg/mL, 0,25 µg/mL e 0,5 µg/mL. C- (controle negativo) corresponde a NADH + PMS + NBT. Como controle positivo (C+) para o sequestro de O₂^{•-} utilizou-se NADH + NBT com ausência de PMS para evitar a formação do *formazan*, simulando o sequestro total de O₂^{•-}. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão (n = 3, cada experimento realizado em triplicata). *** P < 0,001 em relação ao controle negativo.

Segundo o conceito de Lewis podemos considerar a molécula de ânion superóxido como sendo uma base, por possuir a capacidade de doar elétrons (LEWIS & SEABORG, 1939), sendo assim, se a β (1→3) glucana SK5 apresentasse um caráter ácido, poderia então receber elétrons, reagindo assim com o O₂^{•-} e possivelmente impedindo a redução do NBT, ou seja, sequestrando O₂^{•-}.

Um estudo realizado com um polissacarídeo extraído da planta *Phoenix dactylifera* com 5% de NaOH demonstrou ser uma β (1→3)-(1→4) glucana por meio de análise de metilação e hidrólise, sendo que este foi o primeiro relato na literatura sobre o isolamento de uma β glucana de carga neutra (ISHURD *et al*, 2002).

A análise estrutural de um extrato polissacarídico obtido a partir do micélio do fungo *Cordyceps sinensis* foi realizada por meio de metilação e hidrólise, oxidação, ressonância magnética nuclear (NMR) e reação com β glucanase. Os resultados demonstraram tratar-se de outra β (1→3)-(1→4) glucana com carga neutra (WU *et al*, 2005) que, segundo o conceito de Lewis, não reagiria com o O₂^{•-} devido à carga da molécula, semelhantemente ao resultado obtido com a β glucana SK5.

Em síntese, os resultados obtidos para o polissacarídeo SK5, principalmente o aumento da produção de IL-6 e o aumento da capacidade fagocítica, são motivadores para a realização de futuras análises desta molécula. Essas análises

compreenderão testes de atividade fagocítica sobre macrófagos pré-ativados, investigação sobre direcionamento da resposta para imunidade celular ou humoral, ensaios sobre inibição da produção de TNF- α e NO e análise estrutural quanto ao peso molecular e grau de ramificação da molécula e sua relação com os resultados anteriores, com a finalidade de ampliar tanto o conhecimento sobre as propriedades biológicas de SK5 quanto a sua potencial aplicação como imunomodulador.

6. CONCLUSÕES

Com os resultados do presente trabalho pode-se concluir que a β (1 \rightarrow 3) glucana SK5 interfere em algumas funções importantes de macrófagos *in vitro*:

1. Toxicidade celular relevante nas maiores concentrações, o que levou ao emprego de diluições até 0,5 $\mu\text{g/mL}$ para a maioria dos demais ensaios;
2. Capacidade para ativação celular na concentração 0,5 $\mu\text{g/mL}$;
3. Aumento do potencial fagocítico em todas as concentrações analisadas;
4. Produção da citocina IL-6 nas concentrações 0,5 e 1,0 $\mu\text{g/mL}$ (ativadas);
5. Não interferência na produção da citocina TNF- α ;
6. Não interferência na ativação de macrófagos peritoneais de camundongo pela via das espécies reativas de nitrogênio (RNS), demonstrado pela ausência na produção de óxido nítrico (NO);
7. Não interferência na ativação de macrófagos peritoneais de camundongo pela via das espécies reativas de oxigênio (ROS), demonstrado pela ausência na produção de ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$);
8. Ausência de capacidade antioxidante por não ser capaz de sequestrar ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$).

7. REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia celular e molecular*, 7 ed, Editora Elsevier, 560 pp. 2012.
- 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.*, Kidlington, v. 14, p. 1363-1373, 1992.
- 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.*, Tokyo, v. 16, n. 5, p. 462-467, 1993.
- ADAMS, D. O.; HAMILTON, T. A. The cell biology of macrophage activation. *Annu. Rev. Immunol.*, v.2, p.283–318, 1984.
- ADRIAZOLA, I.O.; AMARAL, A.E.; AMORIM, J.C.; CORREIA, B.L.; PETKOWICZ, C.L.O.; MERCÊ, A.L.R.; NOLETO, G.R. Macrophage activation and leishmanicidal activity by galactomannan and its oxovanadium (IV/V) complex *in vitro*. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 132, 45–51. 2014.
- AKRAMIENE, D.; KONDROTAS, A.; DIDZIAPETRIENE, J.; KEVELAITIS, E. Apzvalginis Straipsnis: Effects of β -glucans on the immune system. *Medicina (Kaunas)*, v. 43, p. 587-606, 2007.
- AMARAL, A.E. Avaliação dos efeitos de complexos polissacarídeos-oxovanádio (iv/v) sobre macrófagos peritoneais de camundongos e *leishmania in vitro*. Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências-Bioquímica, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, 2011.
- AYALA, T.S.; TRAMONTINA, R.; OSAKU, C.A.; SILVA, J.L.C.; HENN, C.; PEREIRA, V.A.A.C.; KADOWAKI, M.K. Isolation and Partial Characterization of Polysaccharide from the Fruiting Body of *Ganoderma sp.* *XLI Annual Meeting of The Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society (SBBq)*. Abstract presented on May 19 to 22, 2012.
- BADWEY, J. A.; KARNOVSKY, M. L. Active oxygen species and the function of phagocytic leukocytes. *Ann.Rev.Biochem.*, v. 49, p. 695–726, 1980.
- BOHN, J.A.; BeMILLER, J.N. (1 \rightarrow 3)- β -D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydrate Polymers*, 28.3-14, 1995.

- BURKE, B.; LEWIS, C. E. *The Macrophage*. 2 ed. New York: Oxford University Press, 2002.
- CHANG, Z.Q.; LEE, J.S.; GEBRU, E.; HONG, J.H.; JUNG, H.K.; JO, W.S.; PARK, S.C. Mechanism of macrophage activation induced by β -glucan produced from *Paenibacillus polymyxa* JB115. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 391, 1358–1362, 2010.
- CHENG, A.; WAN, F.; WANG, J.; JIN, Z.; XU, X. Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Glycyrrhiza uralensis* fish. *International Immunopharmacology*, v. 8, p. 43-50, 2008.
- CHOI, E.; KIM, A.; KIM, Y.; HANG, J. Immunomodulating activity of arabinogalactan and fucoidan *in vitro*. *Journal Medical Food*, v. 8, p. 446-453, 2005.
- CLEARY, J.A.; KELLY, G.E.; HUSBAND, A.J. The effect of molecular weight and β -1,6-linkages on priming of macrophage function in mice by (1,3)- β -D-glucan. *Immunology and Cell Biology*. **77**, 395–403, 1999.
- COHEN, S. M.; RYAN, L.; ROOT, K. The oxidative metabolism of thioglycollate-elicited mouse peritoneal macrophages: the relationship between oxygen, superoxide and hydrogen peroxide and the effect on monolayer formation. *J. Immunol.*, v. 127, p. 1007–1011, 1981.
- COOK, M.T.; HAYBALL, P.J.; HUTCHINSON, W.; NOWAK, B.; HAYBALL, J.D. The efficacy of a commercial β -glucan preparation, EcoActivaä, on stimulating respiratory burst activity of head-kidney macrophages from pink snapper (*Pagrus auratus*), Sparidae. *Fish Shellfish Immunol.*, London, v.11, p. 661-672, 2001.
- CZOP, J.K. The role of β -glucan receptors on blood and tissue leukocytes in phagocytosis and metabolic activation. *Pathol. Immunopathol. Res.*, 5, 286296, 1986.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical chemistry*. v. 28, no. 3, 1956.
- ELISSETCHE, J.P.; FERRAZ, A.; FREER, J.; RODRÍGUEZ, J. Enzymes produced by *Ganoderma australe* growing on wood and in submerged cultures. *World J Microbiol Biotechnol*. 23:429–434, 2007.
- FUENTES, A.L.; MILLIS, L.; SIGOLA, L.B. Laminarin, a soluble beta-glucan, inhibits macrophage phagocytosis of zymosan but has no effect on lipopolysaccharide mediated augmentation of phagocytosis. *International Immunopharmacology*. 11, 1939–1945, 2011.

GIAIMIS, J.; LOMBARD, Y.; FONTENEAU, P.; MULLER, C.D.; LEVY, R.; KUMBA, M.M.; LAZDINS, J.; POINDRON, P. Both mannose and β -glucan receptors are involved in phagocytosis of unopsonized, heat-killed *Saccharomyces cerevisiae* by murine macrophages. *Journal of Leucocyte Biology*, v.54, 1993.

GOLDMAN, R. Characteristics of the β -glucan receptor of murine macrophages. *Exp. Cell Res.*, Orlando, v. 174, p. 481-490, 1988.

GOODMAN, S.L.; GILMAN, G.A.; *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 12. ed. Porto Alegre – RS: *AMGH*; 2012.

GORDON, S. AND TAYLOR, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Reviews Immunology*, v. 5, p. 953-964, 2005.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [^{15}N nitrates] in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, v. 126, p. 131-138, 1982.

HUANG, M.H.; YANG, M.C. Evaluation of glucan/poly(vinyl alcohol) blend wound dressing using rat models. *International Journal of Pharmaceutics*. 346, 38–46, 2008.

ISHURD, O.; SUN, C.; XIAO, P.; ASHOUR, A.; PAN, Y. A neutral β -D-glucan from dates of the date palm, *Phoenix dactylifera* L. *Carbohydrate Research*. 337, 1325–1328, 2002.

JANEWAY, C.A.J.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*, 2002.

LEBRON, F.; VASSALO, R.; PURI, V.; LIMPER, A.H. *Pneumocystis carinii* Cell Wall β -Glucans Initiate Macrophage Inflammatory Responses through NF- κ B Activation. *J. Biol. Chem.* 278:25001-25008, 2003.

LEE, J.Y.; KIM, J.Y.; LEE, Y.G.; RHEE, M.H.; HONG, E.K.; CHO, J.Y. Molecular Mechanism of Macrophage Activation by Exopolysaccharides from Liquid Culture of *Lentinus edodes*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18(2), 355–364, 2008.

LEE, J.S.; CHO, J.Y.; HONG, E.K. Study on macrophage activation and structural characteristics of purified polysaccharides from the liquid culture broth of *Hericium erinaceus*. *Carbohydrate Polymers*. 78. 162–168, 2009.

LEUNG, M. Y. K.; LIU, C.; KOON, J. C. M.; FUNG, K. P. Polysaccharide biological response modifiers. *Immunology Letters*, v. 105, p. 101-114, 2006.

LEWIS, G. N.; SEABORG, G. T. Primary and secondary acids and bases. *J. Amer. Chem. Soc.* 61: 1886-1895, 1939.

MAYER, G.; HOPKINS, M. Imunidade mediada por células: Interações célula-célula em respostas imunes específicas. *Microbiology e Immunology On-line. University of South Carolina School of Medicine*. Acesso em <http://pathmicro.med.sc.edu/portuguese/immuno-port-chapter12.htm>, 12/09/2014, 2006.

McLAREN, J. E.; MICHAEL, D. R.; ASHLIN, T. G.; RAMJI, D. P. Cytokines, macrophage lipid metabolism and foam cells: Implications for cardiovascular disease therapy. *Progress in Lipid Research*. p331–347, 2011.

MELLINGER, C.G.; CARBONERO, E.R.; NOLETO, G.R.; CIPRIANI, T.R.; OLIVEIRA, M.B.M.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. Chemical and Biological Properties of an Arabinogalactan from *Phyllanthus niruri*. *J. Nat. Prod.* 68, 1479-1483, 2005.

MOORE, G.E.; MOUNT, D.; TARA, G.; SCHWARTZ, N. Growth of Human Tumor Cells in Suspension Cultures. *Cancer Research*. v. 23, 1963.

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

MOSSER, D.M.; EDWARDS, J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews – Immunology*, v.8, 2008.

MUÑOZ, M.; CEDEÑO, R.; RODRÍGUEZ, J.; KNAAP, W.P.W.V.D.; MIALHE, E.; BACHÈRE, E. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*. 191, 89–107, 2000.

NAUGLER, W. E. AND KARIN, M. The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer. *Trends in Molecular Medicine*, v. 14, p. 109-119, 2008.

NISHIKIMI, M.; RAO, N. A.; YAGI, K. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazinemetosulfate and molecular oxygen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 46, n. 2, p. 849–854, 1972.

NOLETO, G. R.; MERCÊ, A. L. R.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J.; THOMAZ-SOCCOL, V.; OLIVEIRA, M. B. M. Effects of a lichen galactomannan and its vanadyl (IV) complex on peritoneal macrophages and leishmanicidal activity. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 233, p.73-82, 2002.

OHNO, N.; SUZUKI, I.; YADOMAE, T. Structure and Antitumor Activity of a β -1,3-Glucan Isolated from the Culture Filtrate of *Sclerotinia sclerotiorum* IFO 9395. *Chem. Pharm. Bull.* 34 (3) 1362-1365, 1986.

OHNO, N.; ASADA, N.; ADACHI, Y.; YADOMAE, T. Enhancement of LPS Triggered TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α) Production by (1 \rightarrow 3)- β -D-Glucans in Mice. *Biol. Pharm. Bull.* 18(1) 126-133, 1995.

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.*, Tokyo, v. 18, p. 1320-1327, 1995.

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.*, Tokyo, v. 19, n. 1, p. 18-23, 1996.

OLIVEIRA, A.C.; VALENTIM, I.B.; GOULART, M.O.F. Fontes vegetais de antioxidantes. *Quim.Nova*, v.32, n.3, 689-702, 2009.

OOI, V.E.C.; LIU, F. Immunomodulation and Anti-Cancer Activity of Polysaccharide-Protein Complexes. *Current Medicinal Chemistry*, 7, 715-729, 2000.

O'REILLY, P. Fascinated by Fungi: Exploring the History, Mystery, Facts, and Fiction of the quirkiest kingdom on earth. Rhydlewis, Llandysul, Wales: *First Nature*, 2011.

PACHECO, P.; WHITE, D.; SULCHEK, T. Effects of Microparticle Size and Fc Density on Macrophage Phagocytosis. *PLoS ONE*, v.8, 2013.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. *Os reinos dos fungos*. Santa Cruz do Sul: EDUNISC. 2002 pp., 1998.

RAMOS, L.A.; CAVALHEIRO, C.C.S.; CAVALHEIRO, E.T.G. Determinação de nitrito em águas utilizando extrato de flores. *Quim.Nova*, v.29, nº5, 1114-1120, 2006.

REILLY, T. P.; BELLEVEUE, F. H. III; WORSTER, P. M.; SVESSON, C. K. Comparison of the *in vitro* cytotoxicity of hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapson. *Biochemical Pharmacology*, v. 55, p. 803-810, 1998.

RUBEL. R. SANTA, H.S.D.; BONATTO, S.J.R.; BELLO, S.; FERNANDES, L.C.; BERNARDI, R.D.; GERN, J.; SANTOS, C.A.M.; SOCCOL, C.R. Medicinal Mushroom *Ganoderma lucidum* (Leyss: Fr) Karst. Triggers Immunomodulatory Effects and Reduces Nitric Oxide Synthesis in Mice. *J. Med Food* 13 (1), 142-148, 2010.

SAKURAI, T.; OHNO, N.; YADOMAE, T. Intravenously administered (1 \rightarrow 3)- β -glucan, SSG, obtained from *Sclerotinia sclerotiorum* IFO 9395 augments murine

peritoneal macrophages function in vivo. *Chem. Pharm. Bull.*, v. 40, n. 8, p. 2120-2124, 1992.

SAKURAI, T.; OHNO, N.; SUZUKI, I.; YADOMAE, T. Effect of soluble fungal (1→3)- β -D-glucan obtained from *Sclerotinia sclerotiorum* on alveolar macrophage activation. *Immunopharmacology*. 30, 157-166, 1995.

SÁNCHEZ-RAMÓN, S.; LÓPEZ-LONGO, F. J.; CARREÑO, L. Interleucinas em la fisiopatología de la artritis reumatoide: más allá de las citocinas proinflamatorias. *ReumatolClin*. 6(S3):S20–S24, 2011.

SANTANA-FILHO, A.P.; NOLETO, G.R.; GORIN, P.A.J.; SOUZA, L.M.; IACOMINI, M.; SASSAKI, G.L. GC–MS detection and quantification of lipopolysaccharides in polysaccharides through 3-O-acetyl fatty acid methyl esters. *Carbohydrate Polymers*, v. 87, p. 2730-2734, 2012.

SASADA, M.; PABST, M. J.; JOHNSTON, R. B. JR. Activation of mouse peritoneal macrophages by lipopolysaccharide alters the kinetic parameters of the superoxide-producing NADPH oxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 258, p. 9631-9635, 1983.

SCHEPETKIN, I.A.; QUINN, M.T. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *International Immunopharmacology* 6. 317– 333, 2006.

SMET, R.D.; DEMOOR, T.; VERSCHUERE, S.; DULLAERS, M.; OSTROFF, G.R.; LEDERCQ, G.; ALLAIS, L.; PILETTE, C.; DIERENDONCK, M.; GEEST, B.G.D.; CUVELIER, C.A. β -Glucan microparticles are good candidates for mucosal antigen delivery in oral vaccination. *Journal of Controlled Release*. 172, 671–678, 2013.

STUEHR, D. J. Mammalian nitric oxide synthases. *Biochimica and Biophysica Acta*, v. 1411, p. 217-230, 1999.

SUN, Y.; SUN, T.; WANG, F.; ZHANG, J.; LI, C.; CHEN, X.; LI, Q.; SUN, S. A polysaccharide from the fungi of Huaier exhibits anti-tumor potential and immunomodulatory effects. *Carbohydrate Polymers*, 92. 577– 582, 2013.

THOMAS, D. D.; RIDNOUR, L. A.; ISENBERG, J. S.; FLORES-SANTANA, W.; SWITZER, C. H.; DONZELLI, S.; HUSSAIN, P.; VECOLI, C.; PAOLOCCI, N.; AMBS, S.; COLTON, C. A.; HARRIS, C. C.; ROBERTS, D. D.; WINK, D. A. The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 45, p. 18-31, 2008.

- TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM F. *Microbiologia*, 4 ed., São Paulo: Editora Atheneu, 451 pp., 2005.
- TRAN-THI, T.A.; DECKER, K.; BAEUERLE, P.A. Differential activation of transcription factors NF- κ B and AP-1 in rat liver macrophages. *Hepatology*, v.22(2), pp.613-619, 1995.
- VESTVIK, N.; RONNESETH, A.; KALGRAFF, C. A. K.; WINTHER-LARSEN, H. C.; WERGELAND, H. I.; HAUGLAND, G. T. Francisellanoatunensis subsp. noatunensis replicates within Atlantic cod (*Gadusmorhua* L.) leucocytes and inhibit respiratory burst activity. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013.
- VIRIYAKOSOL, S.; FIERER, J.; BROWN, G.D.; KIRKLAND, T.N. Innate Immunity to the Pathogenic Fungus *Coccidioides posadasii* Is Dependent on Toll-Like Receptor 2 and Dectin-1. *Infect. Immun.* 73(3):1553, 2005.
- WU, Y.; SUN, C.; PAN, Y. Structural Analysis of a Neutral (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4)- β -D-Glucan from the Mycelia of *Cordyceps sinensis*. *J. Nat. Prod.*68, 812-814, 2005.
- XU, X.; YASUDA, M.; NAKAMURA-TSURUTA, S.; MIZUNO, M.; ASHIDA, H. β -Glucan from *Lentinus edodes* inhibits nitric oxide and tumor necrosis factor- α production and phosphorylation of mitogen-activated protein kinases in lipopolysaccharide-stimulated murine RAW 264.7 macrophages. *J. Biol. Chem.* 287:871-878, 2012.
- YADAV, M.; SCHOREY, J.S. The β -glucan receptor dectin-1 functions together with TLR2 to mediate macrophage activation by mycobacteria. *Blood*, v. 108, n. 9, 2006.
- YOUNG, S.H.; YE, J.; FRAZER, D.G.; SHI, X.; CASTRANOVA, V. Molecular Mechanism of Tumor Necrosis Factor- α Production in 1 \rightarrow 3- β -Glucan (Zymosan)-activated Macrophages. *J. Biol. Chem*, 276:20781-20787, 2001.

ANEXO 1 - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA



Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA

PARECER DE PROTOCOLO

O protocolo intitulado “Avaliação dos efeitos de polissacarídeos extraídos de fungos sobre macrófagos peritoneais de camundongos”, sob vossa coordenação, foi avaliado pelo CEUA como **APROVADO** para execução.

ATENÇÃO!

O Certificado Experimental deste Protocolo, somente será emitido após o encerramento das atividades previstas e após o encaminhamento do Relatório Final ao CEUA. Este Parecer **NÃO** tem valor como Certificado Experimental.

Cascavel, 09/07/2013

A handwritten signature in dark ink, appearing to read "Luciana", written over a faint circular stamp or watermark.

Profa. Dra. Luciana Oliveira de Fariña
Coordenadora do CEUA
Portaria nº 2861/2012-GRE