

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JULIANA CAROLINA AMORIM

EFEITOS BIOMODULADORES DA PECTINA DA CASCA DOS FRUTOS DE CACAU (*Theobroma cacao* L.) SOBRE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS

CURITIBA
2012

JULIANA CAROLINA AMORIM

EFEITOS BIOMODULADORES DA PECTINA DA CASCA DOS FRUTOS DE CACAU (*Theobroma cacao* L.) SOBRE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Ciências (Bioquímica), Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Guilhermina R. Noletto

CURITIBA
2012

TERMO DE APROVAÇÃO

Juliana Carolina Amorim

EFEITOS BIOMODULADORES DA PECTINA DA CASCA DOS FRUTOS DE CACAU (*Theobroma cacao* L.) SOBRE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Bioquímica pelo Programa de Pós Graduação em Ciências (Bioquímica), Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Profa. Dra. Guilhermina Rodrigues Noletto
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR (orientadora)



Profa. Dra. Carmen Lúcia de Oliveira Petkowicz
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Profa. Dra. Mariana Piemonte Moretão
Universidade Positivo

Curitiba, 29 de Fevereiro de 2012

*"À minha família e aos meus amigos dedico...
Porque entre todos vocês estão comigo sempre,
aonde quer que eu vá".*

AGRADECIMENTOS

À vida por permitir mais essa realização!

À minha querida orientadora, professora Guilhermina, pela amizade, companheirismo, dedicação e pelo exemplo de profissional séria e comprometida. Obrigada por todo esforço e ativa participação em meu crescimento profissional.

Ao meu querido amigo Alex pelo incentivo nos momentos de tristeza, paciência quando entrei em 2010 sem ter experiência com cultura de células animais, companheirismo em longas horas de experimento e por todas vezes que me incentivou a entender ao máximo tudo que me propusesse a fazer. Obrigada, com você aprendi o que é, realmente, querer fazer pesquisa!

À professora Carmen e à aluna de doutorado Lúcia pelo incentivo e luta para que conseguíssemos trabalhar com os polímeros, mesmo quando as condições eram desesperadoras. Agradeço também por todo tempo que dispuseram para sanar minhas dúvidas e compartilhar comigo um pouco do enorme conhecimento que tem em química de carboidratos vegetais.

Aos meus queridos amigos Andréia, Anna, Carina, Carolina, Elizabeth, Evandro, Glaucio, Hudson, João, Louise, Marília, Normanda, Patrícia e Paulo por sua amizade, carinho e muitos momentos de diversão. Vocês ficam no coração!

Às professoras do grupo, Glaucia, Maria Eliane, Sheila e Sílvia, pelas palavras de apoio e incentivo em todos os momentos! E por, juntamente com a professora Guilhermina, estabelecerem um grupo de pesquisa com comprometimento e responsabilidade, ao qual me orgulho de ter feito parte.

Ao meu querido amigo Arquimedes por realizar os experimentos de detecção de LPS nas moléculas de estudo, por toda amizade, apoio e consideração.

Aos funcionários do biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, principalmente Ana e Isellen, por toda dedicação e comprometimento.

A todos os amigos, colegas e funcionários do Laboratório de Oxidações Biológicas e Cultivo Celular, Alex, Amanda do Rocio, Amanda IC, Andréia, Anna, Camila, Carina, Carolina, Caroline Valente, Cláudio, Cristiane, Elizabeth, Fernanda, Franciane, Gisele, Glaucio, Gustavo, Helyn, Hudson, Izabela, João, Juliana Kenski, Juliana IC, Lyvia, Maria Carolina, Marília, Monique, Patrícia, Paulo, Rebeca e Thiago, pelo apoio, compartilhamento de experiências e por tornar o ambiente mais confortável!

À turma de mestrado 2010-2012 por todos momentos passados juntos e pela amizade que ficará sempre!

Ao programa de Pós-graduação em Ciências (Bioquímica), seus professores e a querida secretária Irene pela convivência e oportunidade.

À CAPES-REUNI, CNPq e Fundação Araucária pelo suporte financeiro.

À minha linda família e meus queridos amigos, por mais esse sonho realizado, que é de todos nós! Obrigada por estarem comigo, hoje e sempre!

A Deus por sempre segurar minha mão.

É Proibido

É proibido chorar sem aprender,
Levantar-se um dia sem saber o que fazer
Ter medo de suas lembranças.

É proibido não rir dos problemas
Não lutar pelo que se quer,
Abandonar tudo por medo,

Não transformar sonhos em realidade.
É proibido não demonstrar amor
Fazer com que alguém pague por tuas dúvidas e mau-humor.
É proibido deixar os amigos

Não tentar compreender o que viveram juntos
Chamá-los somente quando necessita deles.
É proibido não ser você mesmo diante das pessoas,
Fingir que elas não te importam,

Ser gentil só para que se lembrem de você,
Esquecer aqueles que gostam de você.
É proibido não fazer as coisas por si mesmo,
Não crer em Deus e fazer seu destino,

Ter medo da vida e de seus compromissos,
Não viver cada dia como se fosse um último suspiro.
É proibido sentir saudades de alguém sem se alegrar,

Esquecer seus olhos, seu sorriso, só porque seus caminhos se
desencontraram,
Esquecer seu passado e pagá-lo com seu presente.
É proibido não tentar compreender as pessoas,
Pensar que as vidas delas valem mais que a sua,

Não saber que cada um tem seu caminho e sua sorte.
É proibido não criar sua história,
Deixar de dar graças a Deus por sua vida,

Não ter um momento para quem necessita de você,
Não compreender que o que a vida te dá, também te tira.
É proibido não buscar a felicidade,

Não viver sua vida com uma atitude positiva,
Não pensar que podemos ser melhores,
Não sentir que sem você este mundo não seria igual.

Pablo Neruda

RESUMO

Neste estudo uma pectina naturalmente acetilada isolada de *Theobroma cacao* L. denominada OP, sua forma parcialmente desacetilada (PDOP) e uma pectina com família de homogalacturonanas (PG), foram avaliadas quanto ao seu potencial de modular algumas funções de macrófagos. Os polímeros PDOP e PG, na concentração de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, foram capazes de promover ativação celular em 77 e 40% respectivamente, em relação ao controle não tratado. Após 48 horas de tratamento dos macrófagos com os polímeros não foi observado qualquer estímulo na fagocitose de partículas de leveduras, comparado ao controle sem tratamento. Em relação a produção de ânion superóxido o polímero PG apresentou-se capaz de estimular essa via em 60%, quando comparado com as células não tratadas, enquanto que os demais (OP e PDOP) não interferiram na produção dessa espécie reativa. O polissacarídeo PDOP (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) aumentou a produção de óxido nítrico em 250% em 48 horas e de TNF-alfa em 87% após 6 horas de tratamento na concentração de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Na mesma concentração os níveis de IL-12 aumentaram em 95 e 30% nos macrófagos tratados com PDOP e PG, respectivamente. Uma via de comum estímulo pelos três polissacarídeos da classe de pectinas foi a de produção da citocina IL-10, onde pode-se observar um aumento, em relação ao controle, de aproximadamente 10% com a molécula OP, 12% para PG e 165% para o polissacarídeo PDOP na concentração de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os resultados obtidos no presente estudo indicam que a pectina nativa, a parcialmente desacetilada e o polímero linear podem ser classificados como modificadores da resposta biológica em macrófagos peritoneais de camundongos. É evidente também que os efeitos observados mostram-se diretamente relacionadas com as características estruturais de cada polímero.

Palavras-chave: macrófagos, *Theobroma cacao* L., pectinas, modificadores da resposta biológica.

ABSTRACT

In this study, a naturally acetylated pectin isolated from *Theobroma cacao* L. (OP), its partially deacetylated form (PDOP) and a pectin with a family of homogalacturonans (PG) were evaluated as potential modulators of certain functions of macrophages. PDOP and PG polymers at concentration of 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ were able to promote morphological changes in 77 and 40% of macrophages, respectively compared to control cells. After 48 hours of treatment these polymers did not promote any alteration on the phagocytic activity compared to the untreated cells. The PG polymer promoted the increase in the superoxide anion production at 60% when compared with untreated cells, while OP and PDOP did not interfere in the production of this reactive species. After 48 hours of treatment the nitric oxide production was increased by PDOP (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) at \sim 250%. The levels of TNF- α was also increased at 87% after 6 hours of incubation with PDOP at the highest concentration (200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). At the same time and concentration PDOP and PG increased IL-12 level at 95% and 30%, respectively. At the highest concentration (200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) these polymers also increased the production of IL-10 at 10, 12 and 165% for OP, PG and PDOP, respectively. The results obtained in the present study indicate that the native pectin, partial deacetylated and the linear polymer can be classified as biological response modifiers in murine peritoneal macrophages. It was also evident that the effects promoted by these polymers are related to their structural characteristics.

Keywords: macrophage, *Theobroma cacao* L., pectins, biological response modifiers.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Vias de ativação de macrófagos.....	18
FIGURA 2	Mecanismo de reconhecimento de patógenos por RRP de macrófagos.....	19
FIGURA 3	Mecanismo de ativação da produção de ânion superóxido.....	20
FIGURA 4	Geração de intermediários reativos pela ativação de outras enzimas do “burst” oxidativo.....	21
FIGURA 5	Componentes e mecanismo de ativação da enzima óxido nítrico sintase.....	23
FIGURA 6	Funções biológicas das moléculas IL-10, IL-12 e TNF-alfa.....	26
FIGURA 7	Vias de reconhecimento de polissacarídeos por macrófagos.....	28
FIGURA 8	Complexidade estrutural de pectinas.....	30
FIGURA 9	Estratégia experimental.....	34
FIGURA 10	Viabilidade celular de macrófagos peritoneais de camundongos tratados com OP, PDOP e PG por 48 horas.....	46
FIGURA 11	Alterações morfológicas em macrófagos peritoneais de camundongos tratados com OP, PDOP e PG por 48 horas.....	50
FIGURA 12	Determinação do perfil de ativação de macrófagos peritoneais de camundongos tratados com OP, PDOP e PG por 48 horas.....	51
FIGURA 13	Atividade fagocítica de macrófagos peritoneais de camundongos tratados com OP, PDOP e PG por 48 horas.....	53
FIGURA 14	Determinação da atividade fagocítica de macrófagos peritoneais de camundongos tratados com OP, PDOP e PG por 48 horas.....	54
FIGURA 15	Quantificação tempo dependente dos níveis de ânion superóxido por macrófagos peritoneais de camundongos tratados com OP,PDOP e PG.....	56
FIGURA 16	Quantificação dose dependente dos níveis de ânion superóxido por macrófagos peritoneais de camundongos tratados com OP, PDOP e PG por 2 horas.....	57
FIGURA 17	Quantificação tempo dependente dos níveis de óxido nítrico por macrófagos peritoneais de camundongos tratados com OP, PDOP e PG.....	61
FIGURA 18	Quantificação dose dependente dos níveis de óxido nítrico por macrófagos peritoneais de camundongos tratados com OP, PDOP e PG por 48 horas.....	62
FIGURA 19	Quantificação de IL-10 em macrófagos peritoneais de camundongos tratados com OP, PDOP e PG por 48 horas.....	65

FIGURA 20	Quantificação de IL-12 em macrófagos peritoneais de camundongos tratados com OP, PDOP e PG por 48 horas.....	67
FIGURA 21	Quantificação de TNF-alfa em macrófagos peritoneais de camundongos tratados com OP, PDOP e PG por 6 horas.....	69

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Algumas atividades biológicas de macrófagos estimuladas por pectinas.....	31
TABELA 2	Algumas atividades descritas para compostos do cacau.....	32
TABELA 3	Composição da pectina OP obtida em condição otimizada da casca dos frutos do cacau.....	33
TABELA 4	Resumo dos resultados obtidos nos experimentos de modulação das atividades em macrófagos pelas pectinas OP, PDOP e PG	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

O ₂ ⁻	Ânion superóxido
STAT1	Ativador de transcrição e transdutor de sinal 1
NK	Células “ <i>natural killer</i> ”
MHC-II	Complexo principal de histocompatibilidade da classe 2
DP	Desvio padrão
TACE	Enzima conversora de TNF-alfa
EP	Erro padrão
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
sTNF- alfa	Fator de necrose tumoral-alfa solúvel
tmTNF-alfa	Fator de necrose tumoral-alfa transmembrana
TNF- β	Fator de necrose tumoral-beta
TGF- β	Fator de transformação do crescimento-beta
CSF	Fator estimulador de colônia
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
HG	Homogalacturonana
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IFN- γ	Interferon - gama
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IL-1 β	Interleucina-1beta
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
Treg	Linfócito T regulatório
Th1	Linfócitos T ativados para resposta 1
Th2	Linfócitos T ativados para resposta 2
LPS	Lipopolissacarídeo
MPO	Mieloperoxidase
MRB	Modificadores da resposta biológica
NOX	Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidase
NO [•]	Óxido nítrico
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
OP	Pectina otimizada do cacau
PDOP	Pectina otimizada parcialmente desacetilada do cacau
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
PG	Poligalacturonato comercial
RG-I	Ramnogalacturonana tipo 1
RG-II	Ramnogalacturonana tipo 2
MR	Receptor de manose
MR	Receptor de manose
RRP	Receptor de reconhecimento padrão
TLRs	Receptores “ <i>toll like</i> ”
SOD	Superóxido dismutase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 JUSTIFICATIVA.....	16
1.2 OBJETIVOS.....	16
1.2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Macrófagos.....	17
2.1.1 Capacidade fagocítica.....	19
2.1.2 Ativação do “burst” oxidativo.....	20
2.1.3 Produção de espécies reativas de nitrogênio.....	22
2.1.4 Capacidade secretória de citocinas IL-10, IL-12 e TNF-alfa.....	23
2.1.4.1 Interleucina-10.....	24
2.1.4.2 Interleucina-12.....	25
2.1.4.3 Fator de necrose tumoral-alfa.....	25
2.2 Polissacarídeos modificadores da resposta biológica.....	27
2.2.1 Pectinas modificadoras da resposta biológica.....	30
2.3 Pectinas do cacau.....	32
3. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL.....	34
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1 EQUIPAMENTOS, MATERIAL, REAGENTES E ESTERILIZAÇÃO.....	35
4.1.1 Equipamentos.....	35
4.1.2 Material e reagentes.....	35
4.1.3 Procedimentos de esterilização.....	36
4.2 POLISSACARÍDEOS.....	36
4.2.1 Soluções dos polissacarídeos.....	37
4.2.2 Dosagem de carboidratos totais e teste de detecção de LPS.....	37
4.3 MEIO E SOLUÇÕES UTILIZADOS NOS PROCEDIMENTOS DE CULTIVO CELULAR..	37
4.3.1 Meio essencial mínimo (MEM).....	37
4.3.2 Solução de azul de tripan.....	38
4.3.3 Solução de bouin.....	38
4.3.4 Solução de citocromo c.....	38
4.3.5 Solução de Griess.....	38

4.3.6 Solução de leveduras.....	38
4.3.7 Solução de MTT.....	39
4.3.8 Solução salina tamponada livre de cálcio e magnésio (PBS).....	39
4.3.9 Solução salina balanceada de Hanks livre de cálcio e magnésio (HBSS).....	39
4.4 CULTIVO CELULAR.....	39
4.4.1 Animais.....	39
4.4.2 Isolamento de macrófagos peritoneais de camundongos.....	40
4.4.3 Determinação da viabilidade celular de macrófagos após coleta.....	40
4.5 MÉTODOS ANALÍTICOS APÓS TRATAMENTOS DOS MACRÓFAGOS COM OS POLÍMEROS.....	41
4.5.1 Determinação da viabilidade celular.....	41
4.5.2 Avaliação da ativação celular.....	41
4.5.3 Avaliação da atividade fagocítica.....	42
4.5.4 Quantificação dos níveis de ânion superóxido.....	42
4.5.5 Quantificação dos níveis de óxido nítrico.....	43
4.5.6 Quantificação dos níveis das citocinas IL-10, IL-12 e TNF-alfa.....	43
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
5.1 Efeitos na viabilidade celular.....	45
5.2 Efeitos na ativação celular.....	47
5.3 Efeitos na atividade fagocítica.....	52
5.4 Efeitos sobre o “burst” oxidativo e na produção de óxido nítrico.....	55
5.4.1 Efeitos na produção de ânion superóxido.....	55
5.4.2 Efeitos na produção de óxido nítrico.....	59
5.5 Efeitos na produção das citocinas IL-10, IL-12 e TNF-alfa.....	63
5.5.1 Efeitos na produção de IL-10.....	63
5.5.2 Efeitos na produção de IL-12.....	65
5.5.3 Efeitos na produção de TNF-alfa.....	67
6. DISCUSSÃO FINAL.....	70
7. CONCLUSÃO.....	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
Anexo - Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal.....	86

1. INTRODUÇÃO

Macrófagos são células amplamente distribuídas no organismo e tem papel central em diversos processos como homeostase, inflamação e comunicação entre resposta imune inata e adquirida (ADAMS; HAMILTON, 1984; ZHANG; GONÇALVES; MOSSER, 2008).

Diversas funções exercidas por macrófagos podem ser aumentadas ou prolongadas para modular a resposta imune do hospedeiro contra infecções e inúmeras outras patologias. Dessas funções destacam-se a fagocitose, ativação do “*burst*” oxidativo, produção de espécies reativas de nitrogênio e a secreção de um grande espectro de citocinas (LEUNG *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2004; ROSÁRIO *et al.*, 2008, 2011).

Tem sido demonstrado uma diversidade de agentes interferentes nas atividades funcionais dos macrófagos, com destaque para moléculas como polissacarídeos, os quais tem sido alvo de grande interesse na aplicação terapêutica (SASAKI *et al.*, 2001; NOLETO *et al.*, 2002; JUNG *et al.*, 2004; COSTA *et al.*, 2010; KANGUSSU MARCOLINO, 2010; AMARAL, 2011).

Diversos trabalhos buscam correlacionar parâmetros estruturais de polissacarídeos, tais como tipo de ligação glicosídica, grau de ramificação, massa molecular e presença de grupos substituintes com atividade biológica (BLEICHER; MACKIN; BETAFECTIN, 1995; POUTSIKA *et al.*, 1993; LEUNG *et al.*, 2004; SCHEPETKIN *et al.*, 2005). Contudo essa correlação vem sendo explorada apenas para polissacarídeos com estruturas simplificadas.

Dentre os polissacarídeos que estimulam o aumento de respostas biológicas destacam-se trabalhos com pectinas, a classe mais complexa estruturalmente de polissacarídeos vegetais (PEREZ; MAZEAU; du PENHOAT, 2000; WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006; MOHNEN, 2008). Entre as respostas biológicas já descritas para as pectinas destacam-se as de ativação de macrófagos (IACOMINI *et al.*, 2005; INNGJERDINGEN *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2006; XIE; SCHEPETKIN; QUINN, 2007; TOGOLA *et al.*, 2008). Porém, a relação estrutura química e atividade biológica de pectinas é pouco compreendida, provavelmente devido à complexidade estrutural destes polímeros.

Diversas atividades têm sido descritas para diferentes compostos isolados do cacau, como atividade antioxidante dos extratos das folhas, inibição de lipoperoxidação e oxidação plasmática dos polifenóis da casca dos frutos, atividade anti-viral e anti-HIV das frações de lignina das sementes (OSMAN; NASARUDIN; LEE, 2004; SAKAGAMI *et al.*, 2008; SCHINELLA *et al.*, 2010), porém há poucos estudos com polissacarídeos desta espécie. Com o objetivo de ampliar o conhecimento sobre os efeitos biológicos dos polissacarídeos isolados de cacau, no presente estudo utilizou-se a pectina da casca dos frutos do cacau, caracterizada pelo Grupo de Química de Carboidratos Vegetais da Universidade Federal do Paraná (VRIESMANN; TEÓFILO, PETKOWICZ, 2011).

1.1 JUSTIFICATIVA

Tem sido proposto que a ativação de macrófagos, por polissacarídeos, está diretamente relacionada com a estrutura destes polímeros, assim como a presença de determinados grupos substituintes (TZIANABOS, 2000; LEUNG *et al.*, 2006; SCHEPETKIN; QUINN, 2006). Alguns estudos têm mostrado que a variação no conteúdo de grupos acetil em determinado polímero está diretamente relacionada a intensidade de efeitos observados em algumas células do sistema imune (WANG; LUI; FANG, 2005; WANG; LUO; ZHA, 2010).

Tendo em vista a escassez de estudos visando avaliar a atividade biológica de polissacarídeos isolados do cacau, a importante busca no esclarecimento do papel da diversidade estrutural e presença de grupamentos substituintes em atividade biológica, pectinas do cacau e um polímero linear de poligalacturonato foram avaliados em relação às suas potenciais propriedades biomoduladoras utilizando como modelo experimental macrófagos peritoneais de camundongos.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos biomodulares da pectina da casca dos frutos de cacau (*Theobroma cacao* L.) na sua forma naturalmente acetilada, parcialmente desacetilada e do polímero poligalacturonato sobre macrófagos peritoneais de camundongos e relacionar os efeitos obtidos com as diferentes estruturas dos polímeros.

1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito dos polímeros sobre algumas funções de macrófagos:

- Viabilidade celular;
- Ativação celular;
- Atividade fagocítica;
- Produção de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$);
- Produção de óxido nítrico (NO^{\cdot});
- Produção de interleucina-10 (IL-10);
- Produção de interleucina-12 (IL-12);
- Produção de fator de necrose tumoral-alfa ($TNF-\alpha$).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Macrófagos

Macrófagos são células que pertencem ao sistema de fagócitos mononucleares e apresentam ampla distribuição nos tecidos do organismo (BURKE; LEWIS, 2002; GORDON; TAYLOR, 2005). São células derivadas da medula óssea a partir de células progenitoras mielóides, denominadas CFU-GM (unidades formadoras de colônias de granulócitos-macrófagos). A célula progenitora dá origem, sequencialmente, a monoblastos, promonócitos e monócitos, os quais saem da medula e direcionam-se, através da circulação, para diferentes tecidos diferenciando-se em macrófagos tecido-específicos (BURKE; LEWIS, 2002; GORDON; TAYLOR, 2005; TAYLOR *et al.*, 2005; TACKE; RANDOLPH, 2006).

Após entrarem em contato com uma diversidade de estímulos endógenos e exógenos macrófagos adquirem representativa heterogeneidade em relação ao fenótipo e função (NATHAN, 1991; MOSSER, 2003; GEISSMANN *et al.*, 2010). As vias ou estados de ativação de macrófagos se caracterizam pela produção de mediadores específicos, como representado na figura 1 (MOSSER, 2003, GORDON; TAYLOR, 2005; MOSSER; EDWARDS, 2008).

A *ativação clássica* é caracterizada pela alta atividade microbicida estimulada pela produção de citocinas pró-inflamatórias, alta produção de mediadores tóxicos como ânion superóxido e óxido nítrico; aumento da expressão de complexo principal de histocompatibilidade da classe dois (MHC-II) e baixa expressão de receptor de manose (MR). Esta via é induzida por interferon- γ (INF- γ) e TNF-alfa produzidos por outras células do sistema imune [linfócitos T ativados para resposta um (Th1) e linfócitos “*natural killers*” (NK)] e produtos bacterianos como lipopolissacarídeo (LPS) (GORDON; TAYLOR, 2005; MOSSER; EDWARDS, 2008).

A *ativação alternativa* é desencadeada por estímulo com IL-4 ou 13 produzidos por outras células do sistema imune [linfócitos T ativados para resposta dois (Th2) e granulócitos] e caracteriza-se pela ativação dos macrófagos para ação na imunidade humoral, respostas alérgicas, antiparasitárias e a processos envolvidos no reparo tecidual. Outra denominação da ativação alternativa, classificada como *ativação alternativa tipo II*, difere da via clássica por suprimir a produção de IL-12 pela ativação de receptores de imunoglobulinas (Fc γ Rs), propiciando a síntese de altas quantidades de IL-10. (GORDON, 2003; MOSSER; EDWARDS, 2008).

A *ativação inata* se apresenta envolvida com a produção de mediadores microbicidas e citocinas pró-inflamatórias, é mediada por agonistas de receptores de reconhecimento padrão (RRP), entre os quais se destacam os receptores “*Toll-like*” (TLRs), presentes na linhagem monócito-macrófago (GORDON, 2003).

A *desativação ou via regulatória* se caracteriza pela grande produção de IL-10, supressão de citocinas pró-inflamatórias e redução da expressão de MHC-II. É induzida pelo tratamento de macrófagos com IL-10, fator de transformação do crescimento-beta (TGF- β), os quais são produzidos por células T regulatórias (Treg), também pode ser estimulada por prostaglandinas, glucocorticóides e células apoptóticas (GORDON; TAYLOR, 2005; MOSSER; EDWARDS, 2008).

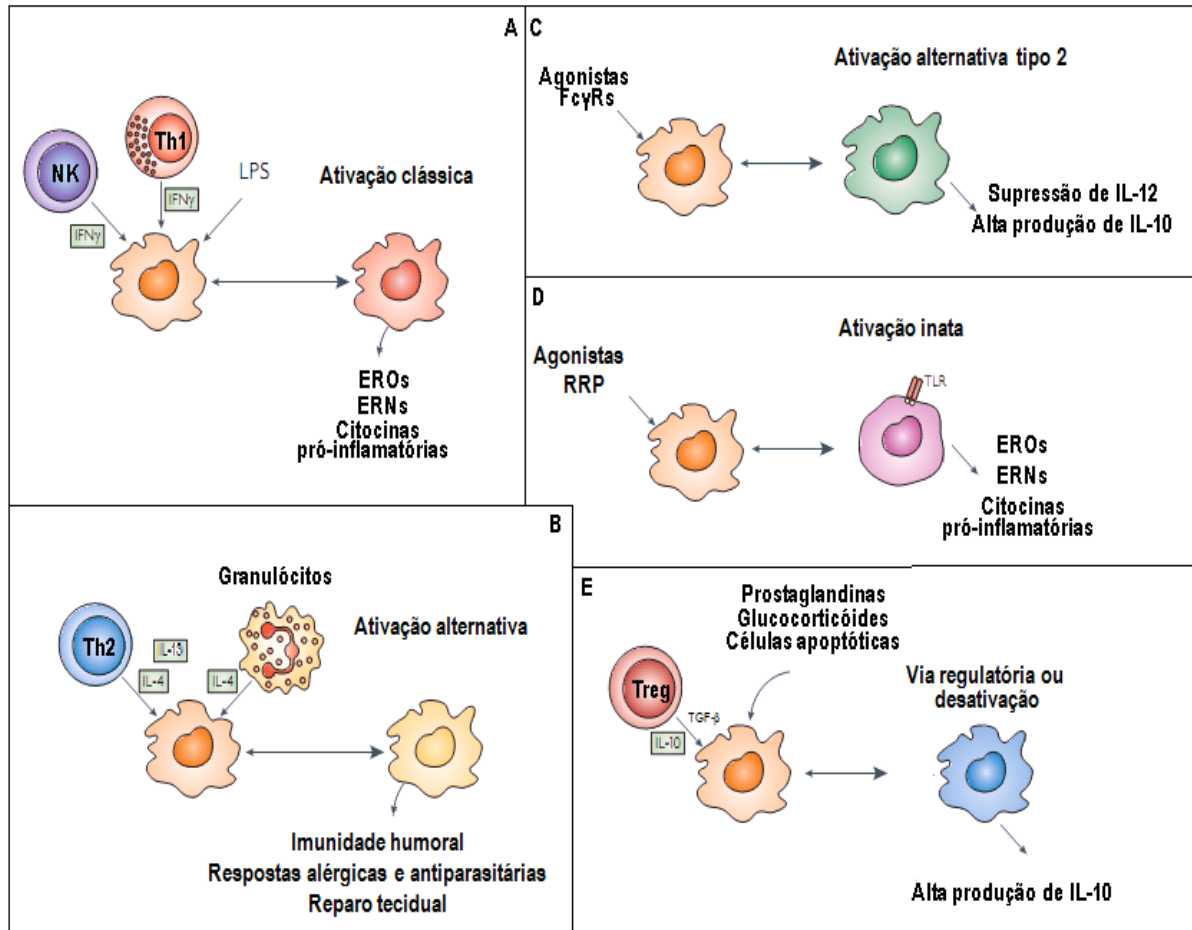


FIGURA 1. VIAS DE ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS

FONTE: adaptada (GORDON, 2003; MOSSER, 2003; MOSSER; EDWARDS, 2008)

Nota. Vias de ativação de macrófagos por diferentes mecanismos. A) Ativação clássica estimulada por interferon- γ e LPS. B) Ativação alternativa estimulada por IL-4 e 13. C) Ativação alternativa tipo II, estimulada por agonistas Fc γ Rs. D) Ativação inata estimulada por agonistas de RRP como TLRs. E) Via regulatória ou de desativação estimulada por IL-10 e TGF- β . EROs, espécies reativas de oxigênio; ERNs, espécies reativas de nitrogênio; RRP, receptores de reconhecimento padrão; Fc γ Rs, receptores de imunoglobulinas; TLR, receptor "Toll like"; IL-10, interleucina-10, TGF- β , fator de crescimento transformante beta.

Entre as muitas alterações encontradas em macrófagos após responderem a estímulos de ativação, pelas mais variadas fontes, encontram-se estímulo da atividade fagocítica, produção de intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio e citocinas, repostas que, por terem sido avaliadas neste trabalho, serão abordados a seguir.

2.1.1 Capacidade fagocítica

O processo de fagocitose pelos macrófagos representa a principal linha de defesa contra agentes estranhos ao organismo (BURKE; LEWIS, 2002). É uma atividade que se inicia pelo reconhecimento de ligantes da partícula estranha por receptores específicos da superfície dessas células, denominados de RRP (JANEWAY, 1992).

A fagocitose é mediada por um elaborado sistema de sinalização que leva a polimerização da actina, no sítio de ingestão, e a partícula é posteriormente internalizada (ADEREM; UNDERHILL, 1999; MINAKAMI; SUMIMOTO, 2006).

Os receptores envolvidos no processo de fagocitose em macrófagos podem reconhecer partículas com uso de opsoninas como anticorpos, colectinas, proteínas do sistema complemento e proteína ligadora de LPS. O reconhecimento pode se dar, contudo, de maneira direta, com a associação dos receptores a ácidos nucléicos, carboidratos, lipídios e proteínas, moléculas essas denominadas de PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos), como demonstrado na figura 2 (GORDON, 2002; GORDON, 2003; KERRINGAN; BROWN, 2009).

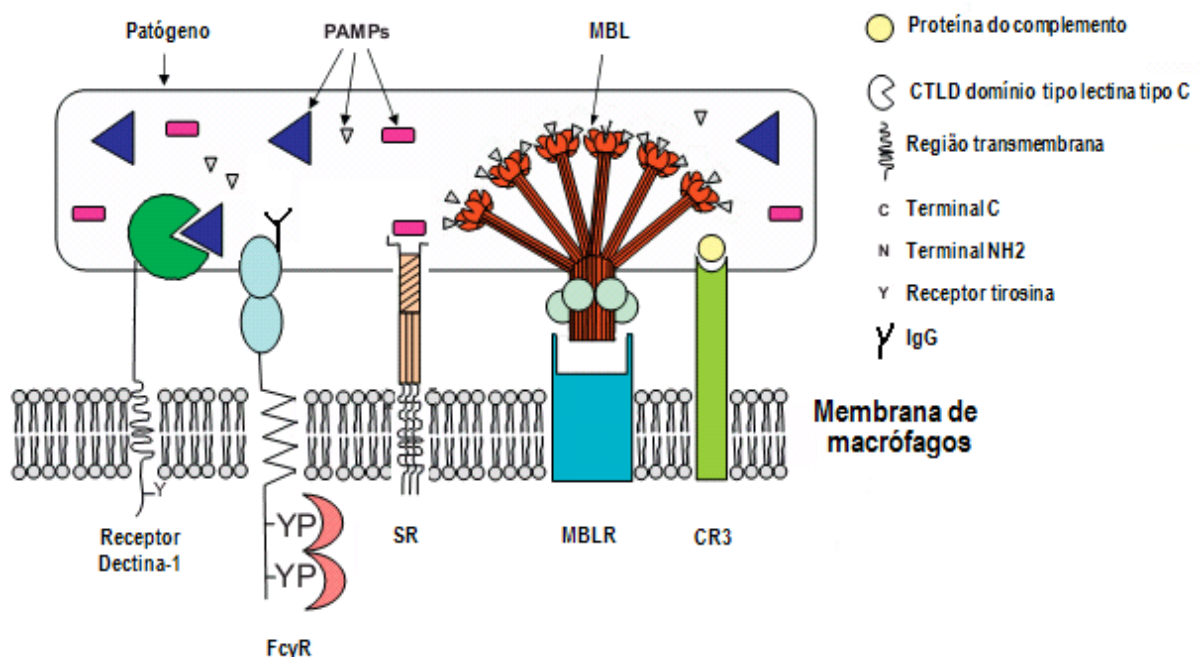


FIGURA 2. MECANISMO DE RECONHECIMENTO DE PATÓGENOS POR RRP DE MACRÓFAGOS
 FONTE: adaptada (KERRINGAN; BROWN, 2009)

Nota. O mecanismo de reconhecimento de patógenos por macrófagos se dá pela associação com receptores específicos da superfície dessas células como os receptores dectina-1, FcγR (receptores de imunoglobulinas), SR (receptor *Scavenger*) MBLR (receptor de lectina ligadora de manose) e CR3 (receptor complemento 3).

2.1.2 Ativação do “burst” oxidativo

Por definição “burst” oxidativo ou respiratório é um processo de proteção celular caracterizado pelo aumento rápido do consumo de oxigênio, seguido da redução deste a ânion superóxido e, posteriormente, a outras espécies reativas de oxigênio. Em macrófagos esse processo é catalisado, inicialmente, por um complexo multienzimático, o qual é denominado de forma geral como NADPH oxidase (TSE; MILTON; PIGANEILI, 2004; VIGNAIS, 2002; CROSS; SEGAL, 2004).

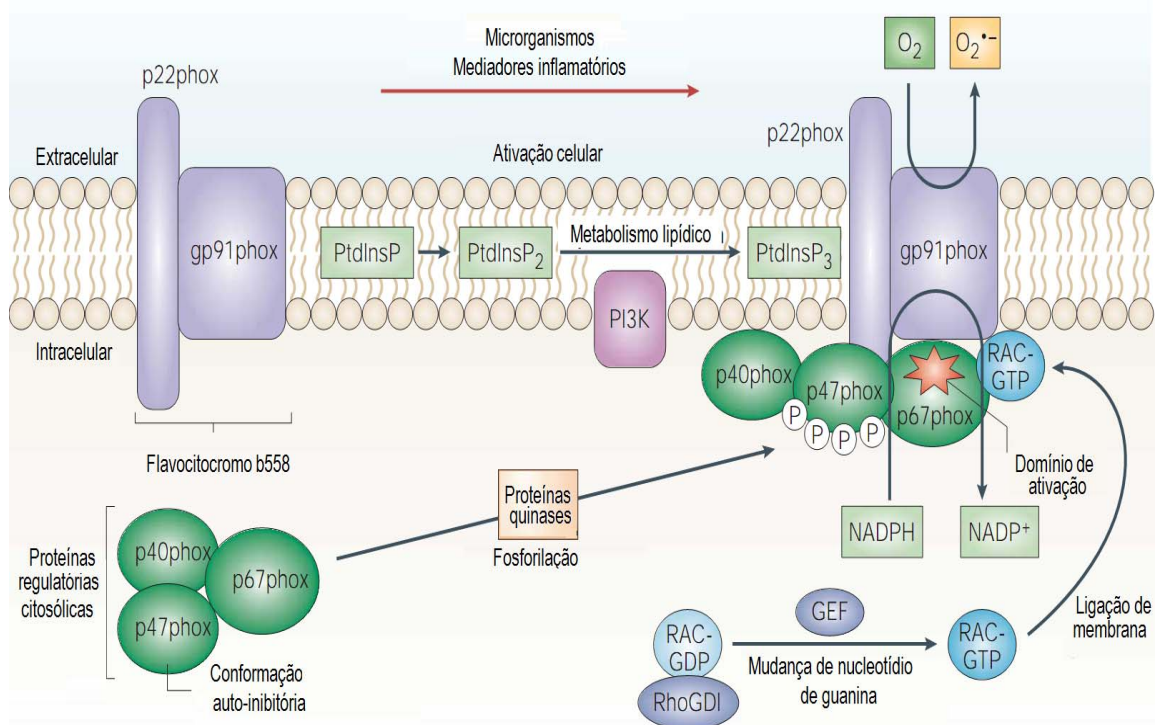


FIGURA 3. MECANISMO DE ATIVAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO PELO COMPLEXO NADPH OXIDASE EM MACRÓFAGOS

FONTE: adaptada (LAMBETH, 2004)

Nota. A ativação do complexo da gp91phox ocorre por pelo menos três etapas de sinalização que resultam na montagem de proteínas reguladoras citosólicas (p40phox, p47phox e p67phox) com flavocitocromo b558 (composto da associada entre as proteínas gp91phox e p22phox). Essas etapas envolvem atividade de proteínas quinases, enzimas que metabolizam lipídios e nucleotídeos de troca de proteínas GDPase RAC. Proteínas quinases, incluindo proteína quinase C e AKT, catalizam fosforilações na região autoinibitória da proteína p47phox, permitindo sua associação com a proteína p22phox. Esse mecanismo alivia a inibição do domínio de p47phox, permitindo ligação aos lipídeos de membrana. Fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e fosfolipase D produzem fosfatidilinositol 3 fosforilado (PtdInsP) e ácido fosfatídico, respectivamente, proporcionando lipídios para que p47phox e p40phox se associem. No processo de ativação, estimulado por GEF (fator de troca de GTP), Rac-GDP deixa de ser inibida pela proteína RhoGDI no citosol, associa-se ao complexo e auxilia na ativação.

O núcleo catalítico do complexo NADPH oxidase é composto por uma glicoproteína ancorada à membrana, gp91phox, a qual possui um domínio transmembrana N-terminal com seis subunidades e

um C-terminal para ligação do NADPH e do FAD e também pela proteína p22phox, que possui duas subunidades (TSE; MILTON; PIGANELLI, 2004; MINAKAMI; SUMIMOTO, 2006).

A regulação da ativação do núcleo catalítico (também conhecido como flavocitocromo b558) é realizada por proteínas citosólicas denominadas p40phox, p47phox e p67phox e por uma guanosina trifosfatase (Rac), como demonstrado na figura 3 (VIGNAIS, 2002; MINAKAMI; SUMIMOTO, 2006). (CROSS; SEGAL, 2004, CASBON *et al.*, 2009).

Alguns agentes capazes de induzir a produção de espécies reativas de oxigênio em macrófagos são IFN- γ , LPS, muramil dipeptídeo e também os ésteres de forbol (PMA) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; SCHEPETKIN; QUINN, 2006).

Concomitante a ativação da NADPH oxidase outras enzimas, SOD (superóxido dismutase) e MPO (mieloperoxidase), agem na conversão do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e neste a ácido hipocloroso, respectivamente. Esses produtos são apontados como tendo papel mais agressivo que o ânion superóxido na ação bactericida, demonstrado na figura 4 (ROOS; WINTERBOURN, 2002; VIGNAIS, 2002; HALLIWELL, 2006).

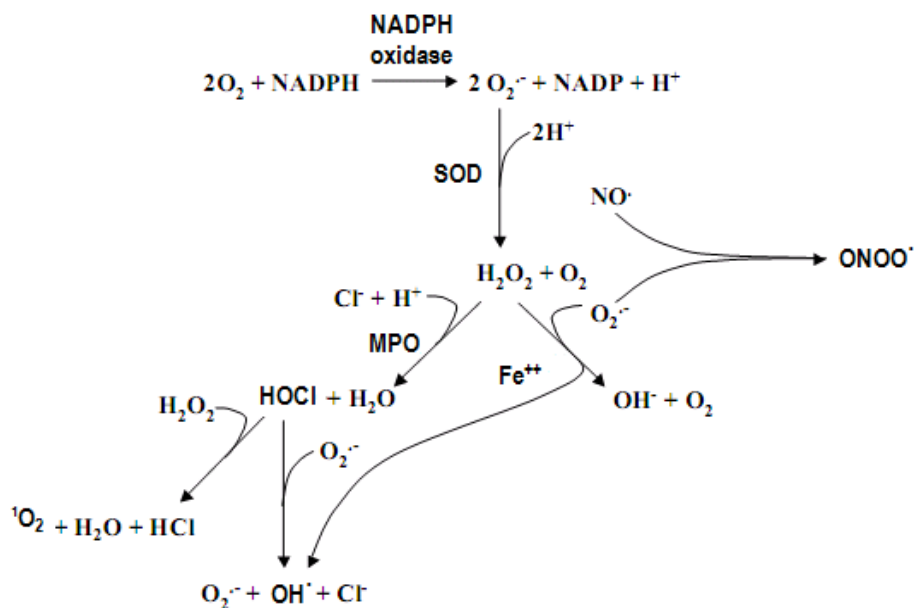


FIGURA 4. GERAÇÃO DE INTERMEDIÁRIOS REATIVOS PELA ATIVAÇÃO DE OUTRAS ENZIMAS DO "BURST" OXIDATIVO

FONTE: adaptada (BEUTLER, 2004).

Nota. O ânion superóxido produzido após ativação do complexo NADPH oxidase serve de substrato para a enzima SOD, que o dismuta a peróxido de hidrogênio, o qual é transformado em ácido hipocloroso e gera oxigênio singlete e hidroxilas. Em outra via paralela o peróxido de hidrogênio, catalizado pelo ferro, gera radical hidroxila. Ânion superóxido na presença de óxido nítrico pode gerar a espécie peroxinitrito, caracterizado como potente destruidor de microrganismos. HOCl, ácido hipocloroso; ONOO \cdot , peroxinitrito; Fe $^{2+}$, ferro no estado dois; ${}^1\text{O}_2$, oxigênio molecular singlete; OH \cdot , radical hidroxila.

Recentemente estudo realizado por Reeves e colaboradores (2002) sugere que a ativação do complexo NADPH oxidase está diretamente relacionada a execução da atividade microbicida através da despolarização da membrana fagossomal. A despolarização gera produção de ânion superóxido, mediando fluxos de íons como H^+ e K^+ para essa região, o que culmina na ativação de proteases da matriz levando a digestão e morte de microrganismos (REEVES *et al.*, 2002).

2.1.3 Produção de óxido nítrico

O óxido nítrico é um gás solúvel em água e lipídios, portanto permeável em membranas biológicas (BOGDAN, 2001). No sistema imune tem ação citostática e citotóxica sob diversos agentes infecciosos, onde é produzido por um amplo número de células como células dendríticas, eosinófilos, mastócitos, macrófagos, monócitos, neutrófilos e células NK (BOGDAN, 2001; BURKE; LEWIS, 2002).

O óxido nítrico é sintetizado pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), a qual é expressa em uma família de três isoenzimas em mamíferos: neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e induzível (iNOS) (MACMICKING; XIE; NATHAN, 1997; ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001; KARPUZOGLU; AHMED, 2006).

A enzima iNOS, a isoforma expressa em macrófagos ativados, é uma proteína solúvel que adquire sua conformação ativa somente na forma de homodímero, a qual requer a ligação da calmodulina (CaM), cofator tetrahydrobiopterina (BH_4), do substrato L-arginina além da incorporação de grupo heme e Zn^{2+} , componentes e mecanismo de ativação representados na figura 5 (ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001; BOGDAN, 2001; STUEHR *et al.*, 2004; LECHNER; LIRK; RIEDER, 2005; FITZPATRICK *et al.*, 2008).

A síntese do óxido nítrico envolve duas etapas; na primeira ocorre a hidroxilação de um dos nitrogênios guanidinos da L-arginina, pelo O_2 e NADPH, para gerar o intermediário N- ω -hidroxi-L-arginina, e a segunda etapa é a conversão da N- ω -hidroxi-L-arginina em L-citrulina e óxido nítrico, (LECHNER; LIRK; RIEDER, 2005).

Os mecanismos regulatórios para expressão do gene da enzima iNOS em macrófagos são mediados pela ativação de duas vias principais e independentes entre si; as quais resultam na ativação do fator de transcrição NF- κ Bp50p65 em uma e do fator STAT1 na outra. A primeira via de ativação é iniciada por agonistas TLRs, como LPS, ou agonistas IL-1 β R e a segunda por agonistas IFN- γ R (AKTAN, 2004).

Moléculas como IL-1 β , IL-6, IFN- γ , TNF- α ativam a transcrição de iNOS. No entanto, outras moléculas inibem sua expressão, tais como IL-4, IL-8 e IL-10 e TNF- β (MATSUURA *et al.*, 2003; AKTAN, 2004; KOIDE *et al.*, 2006).

Alguns estudos demonstram que muitos dos danos atribuídos ao óxido nítrico como a capacidade de reagir com grupos ferro–enxofre e zinco–enxofre presentes em enzimas, oxidação de proteínas, inativação de enzimas do ciclo do ácido cítrico, da cadeia respiratória e também das enzimas envolvidas na síntese de DNA são causadas por outras espécies reativas de nitrogênio (por exemplo, NO_2 e ONOO^-), as quais são mais reativas com biomoléculas (ZHU; GUNN; BECKMAN, 1992; BURKE, LEWIS, 2002; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

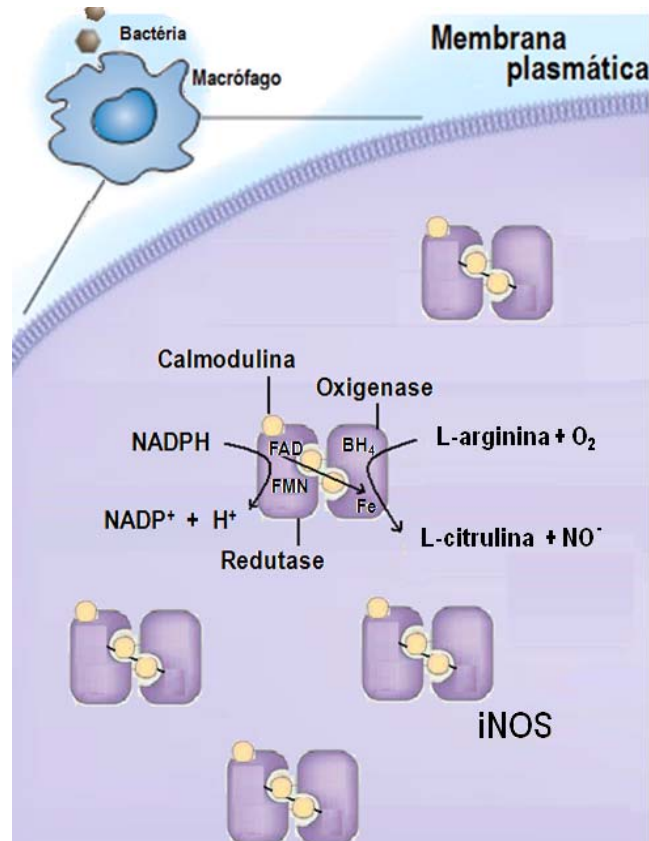


FIGURA 5. COMPONENTES E MECANISMO DE ATIVAÇÃO DA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE INDUZÍVEL

FONTE: adaptada (ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001; WINTERBOURN, 2008)

Nota. A enzima iNOS possui um domínio C-terminal redutase com distintos sítios de ligação para FAD, FMN e NADPH e um domínio N-terminal oxigenase com um grupo heme, um sítio para o cofator tetrahydrobiopterina (BH_4), outro sítio para o substrato arginina, e ainda, localizada entre os dois domínios, uma sequência de reconhecimento para a proteína calmodulina. Após ser estimulada pela interação com patógenos a enzima cataliza a hidroxilação da L-arginina com o oxigênio molecular, pela redução do NADPH, gerando L-citrulina e óxido nítrico.

2.1.4 Capacidade secretória de citocinas IL-10, IL-12 e TNF-alfa

Dentre os inúmeros produtos secretados por macrófagos ativados encontram-se as citocinas, as quais são dotadas de funções diversas, desde sinalização a moléculas efetoras (BURKE; LEWIS, 2002). Essas moléculas são proteínas ou glicoproteínas solúveis de baixo peso molecular que

apresentam ação multifuncional, pleiotrópica, redundante e agem numa ampla gama de estados fisiopatológicos como infecção, inflamação, malignidade e trauma (BELARDELLI; FERRANTINI, 2002).

As citocinas podem ser divididas em diversas categorias; como interferons (IFN), interleucinas (IL), fatores estimuladores de colônia (CSF), fatores de necrose tumoral (TNF), fatores de transformação de crescimento (TGF), entre outras. Podem ser divididas também em citocinas pró e anti-inflamatórias (BURKE; LEWIS, 2002).

Dentre as muitas citocinas produzidas por macrófagos destacam-se IL-10, IL-12 e TNF-alfa, as quais apresentam funções centrais na ligação de resposta imune inata e adquirida e, ainda, exibem uma ampla variedade de efeitos sobre diferentes tipos de células (BELARDELLI; FERRANTINI, 2002; BURKE; LEWIS, 2002; COMMINS; BORISH; STEINKE, 2010).

2.1.4.1 Interleucina-10

Interleucina-10 pertence a superfamília IL-10, a qual também é composta pelas interleucinas 19, 20, 22, 24, 26, 28 e 29. É uma molécula com estrutura homodimérica de 35kDa, composta por dois monômeros não covalentemente ligados (COMMINS; BORISH; STEINKE, 2010; SABAT *et al.*, 2010).

IL-10 é produzida por uma grande gama de tipos celulares, entre os quais destacam-se células dendríticas, eosinófilos, linfócitos B, linfócitos T citotóxicos, linfócitos T regulatórios, mastócitos, macrófagos, neutrófilos e células NK (OUYANG *et al.*, 2011). Os mecanismos de estímulo de produção de IL-10 em macrófagos são mediados por agonistas de TLRs, DC-SIGN e dectin-1, entre as moléculas agonistas se destaca a molécula de LPS (OUYANG *et al.*, 2011).

A atividade pleotrópica de IL-10 é mediada pela associação com seus receptores - IL-10R1 e IL-10R2. Essa citocina é capaz de realizar uma diversidade de funções inibitórias, das quais se destacam a inibição da produção de IFN- γ por linfócitos Th1; de IL-4 e IL-5 por linfócitos Th2; IFN- γ e TNF- α em células NK e MHC II por células apresentadoras de antígenos (SABAT *et al.*, 2010; OUYANG *et al.*, 2011).

Em macrófagos, a IL-10 atua também por mecanismo autócrino e influencia algumas funções importantes nestas células como a supressão da produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, CXCL8, IL-12 e TNF- α); inibição da expressão de MHC de classe II; estimulação da fagocitose através do aumento da expressão de receptores IgG-Fc e CD14. (COMMINS; BORISH; STEINKE, 2010; SABAT *et al.*, 2010).

2.1.4.2 Interleucina-12

A interleucina-12 é membro da família IL-12, que também é composta pela interleucina-23 e 27. É uma molécula com estrutura heterodimérica composta por duas subunidades, p40 e p35, ligadas por pontes dissulfeto e que juntas formam a molécula ativa, IL-12p70 (TRINCHIERI, 1995; COMMINS; BORISH; STEINKE, 2010).

IL-12 é sintetizada por leucócitos polimorfonucleados, linfócitos B, mastócitos, mas é produzida em maior quantidade em células dendríticas e fagócitos para mediar a resposta a patógenos durante a infecção (TRINCHIERI, 2003; COMMINS; BORISH; STEINKE, 2010).

Os mecanismos de produção de IL-12 em macrófagos são mediados por ligantes de TLRs, porém nessas células somente o sinal dos ligantes não é suficiente para estimular a produção do heterodímero, são necessários também moléculas como IFN- γ e IL-4 e, ainda, o fator de transcrição c-Rel para produção de p40. Entre as moléculas ligantes que podem desencadear o primeiro estímulo para produção de IL-12 destaca-se LPS, RNA dupla fita e DNA bacteriano (TRINCHIERI, 1998, 2003).

As funções biológicas que a molécula IL-12 executa tem como alvos muitos tipos celulares. Em células B essa molécula inibe a produção de imunoglobulinas (IgA e IgE); em células T estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias, estimula a proliferação e a ativação da resposta Th1 seguida da supressão da Th2; em células NK age ativando a produção de citocinas pró-inflamatórias, estimulando a proliferação e a citotoxicidade (TRINCHIERI, 1995, 2003; COMMINS; BORISH; STEINKE, 2010).

2.1.4.3 Fator de necrose tumoral-alfa

Fator de necrose tumoral-alfa pertence a superfamília TNF, a qual é composta por 19 membros (WATTS, 2005; VINAY; KWON, 2009). Inicialmente é sintetizada como uma proteína transmembrana de 26kDa (tmTNF-alfa), que é, posteriormente, convertida à proteína solúvel 17kDa (sTNF- alfa), por ação da metaloprotease conversora de TNF-alfa (TACE). Para tornarem-se funcionais as moléculas de TNF-alfa se agrupam em homotrímeros (COMMINS; BORISH; STEINKE, 2010; CAMINERO; COMABELLA; MONTALBAN, 2011).

TNF-alfa é dos mediadores mais importantes da reação de fase aguda, produzida por uma ampla gama de células, das quais destacam-se células dendríticas, células B, células endoteliais,

células T, células NK, mastócitos, monócitos e macrófagos ativados (COMMINIS; BORISH; STEINKE, 2010; CAMINERO; COMABELLA; MONTALBAN, 2011).

O estímulo para secreção de TNF-alfa em macrófagos é mediado por ligantes de TLRs ou ainda por outros produtos como IL-1, IL-2 e CSF-GM (BURKE; LEWIS, 2002).

As funções biológicas executadas pela molécula TNF-alfa são diversas, destacam-se, contudo, a ativação de células endoteliais e linfócitos B e T. Também são funções importantes o recrutamento de macrófagos, neutrófilos e células NK para sítios inflamatórios ou invadidos por microrganismos, através da produção de quimiocinas, e estímulo da produção de eicosanóides (KLEINBOGARD; HEUSCH; SCHULZ, 2010).

Embora TNF-alfa seja secretado no local da inflamação pelos macrófagos, pode, através da circulação, atuar em locais distantes, induzindo a reação de fase aguda sistêmica. A interação de TNF-alfa com células alvos se dá pela associação com seus receptores TNFRs. Uma característica interessante entre a associação das moléculas TNF-alfa com seus receptores é que existe maior afinidade na ligação entre sTNF-alfa pelo receptor 1 (TNFR1) acompanhada pela maior afinidade entre tmTNF-alfa e TNFR2 (WATTS, 2005; CAMINERO; COMABELLA; MONTALBAN, 2011).

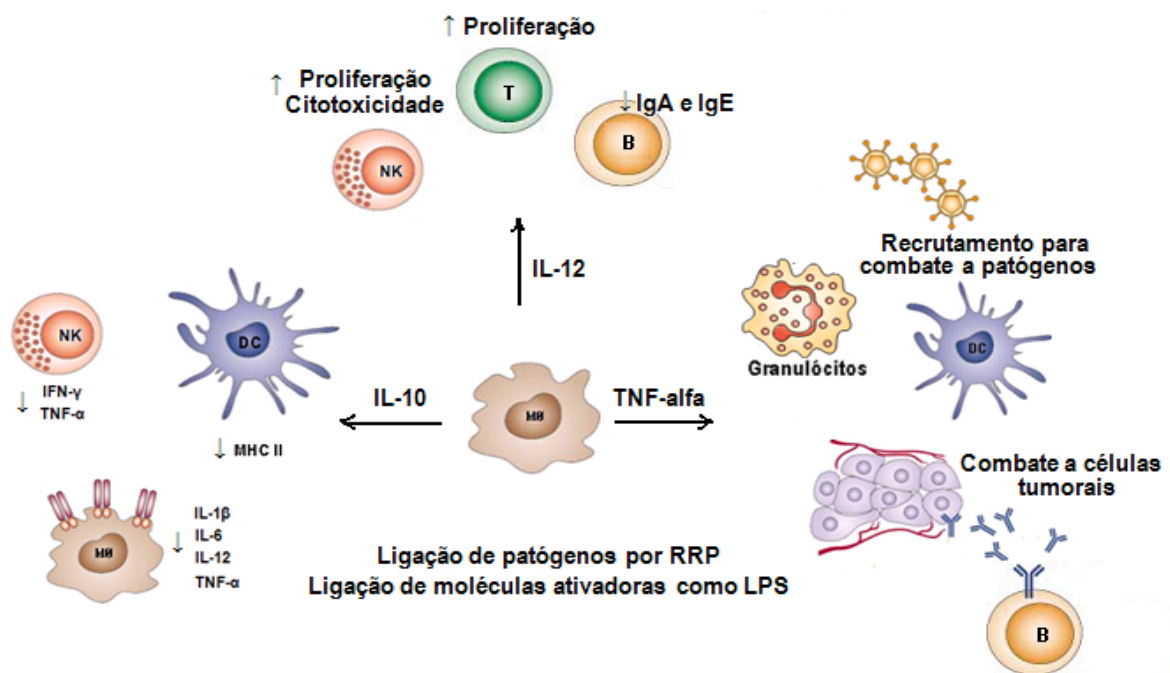


FIGURA 6. FUNÇÕES BIOLÓGICAS DAS MOLÉCULAS IL-10, IL-12 e TNF-ALFA

FONTE: adaptada (GORDON, 2003; MOSSER, 2003; MOSSER; EDWARDS, 2008)

Nota. NK, células "natural killers"; DC, células dendríticas; B, linfócitos B; T, linfócitos T; IgA, imunoglobulina A; IgE, imunoglobulina E; RRP, receptores de reconhecimento padrão; LPS, lipopolissacarídeo.

Tendo em vista que a ativação de macrófagos é essencial para sua ação na defesa do hospedeiro, compostos que modulam as funções destas células, atuando como modificadores da resposta biológica (MRB), por aumentar ou prolongar a duração de uma resposta imune específica, são de grande interesse (BOHN; BeMILLER, 1995; MÜLLER *et al.*, 1996; TZIANABOS, 2000; KLIMP *et al.*, 2002; LEUNG *et al.*, 2006).

Tem sido demonstrado uma diversidade de agentes interferentes nas atividades funcionais dos macrófagos, com destaque para moléculas como polissacarídeos. Considerando que a modificação de atividade biológica por essa classe de polímeros é o objetivo central deste estudo, uma revisão sobre polissacarídeos modificadores da resposta biológica será apresentada.

2.2 Polissacarídeos modificadores da resposta biológica

Compostos que agem como MRB apresentam-se de natureza diversa, como ácidos nucleicos, carboidratos, lipídios e proteínas. Podem ser provenientes de fontes endógenas, tais como citocinas (HAMILTON; ANDERSON, 2004; SCHILLER *et al.*, 2006, STAHEL; SMITH; MOORE, 2007) e de fontes exógenas diversas. Destas fontes exógenas destacam-se os polissacarídeos isolados de algas (PUGH *et al.*, 2001; PONCE *et al.*, 2003; COSTA *et al.*, 2010), bactérias (TZIANABOS; WANG; KASPER, 2003); fungos (LEE *et al.*, 2004; HSU *et al.*, 2004) e plantas (ANDO *et al.*, 2002; HAN *et al.*, 2003; SHAO *et al.*, 2004; SCHEPETKIN *et al.*, 2005).

As propriedades terapêuticas descritas para polissacarídeos são diversas e incluem atividade antiviral (SASAKI *et al.*, 2001; JUNG *et al.*, 2004), antibacteriana (RUIZ-BRAVO *et al.*, 2001), anticoagulante (COSTA *et al.*, 2010), antioxidante (TANNIN-SPITZ *et al.*, 2005), antitumoral (MORETÃO *et al.*, 2004; YALIN *et al.*, 2005) e leishmanicida (NOLETO *et al.*, 2002; KANGUSSU MARCOLINO, 2010; AMARAL, 2011).

Grande parte das propriedades terapêuticas dos polissacarídeos deve-se ao potencial que essas moléculas tem em biomodular a resposta de células do sistema imune (LEUNG *et al.*, 2006; SCHEPETKIN; QUINN, 2006). Polissacarídeos, bem como outras classes de moléculas MRB, que exercem efeitos sobre células do sistema imunológico, em especial macrófagos, são também classificados como imunomoduladores (TZIANABOS, 2000; LEUNG *et al.*, 2006; SCHEPETKIN; QUINN, 2006; ROSÁRIO *et al.*, 2008, 2011).

Sugere-se que a interação polissacarídeo e macrófago está relacionada com características estruturais de cada polímero, podendo ou não levar a uma resposta biológica. Esses polímeros são

capazes de orientar esta resposta associando-se diretamente à membrana plasmática ou a receptores específicos na superfície dessas células. Essa interação irá desencadear a ativação de vias de sinalização intracelular, as quais resultam na ativação ou repressão da transcrição de diferentes genes, conforme representado na figura 7 (SCHEPETKIN; QUINN, 2006).

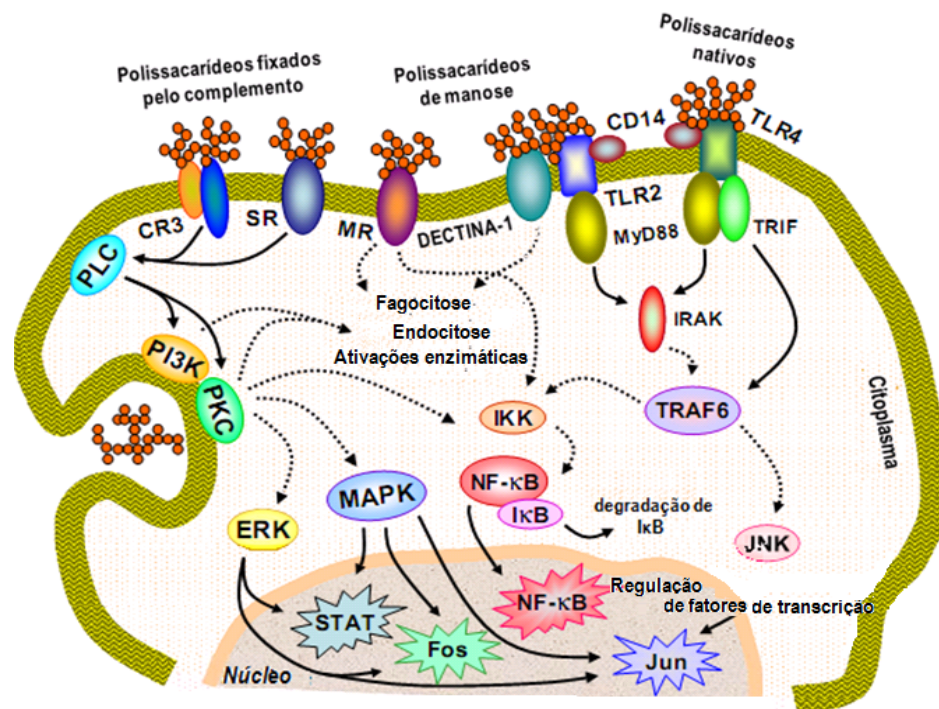


FIGURA 7. MECANISMOS DE RECONHECIMENTO DE POLISSACARÍDEOS POR MACRÓFAGOS
 FONTE: adaptada (SCHEPETKIN; QUINN, 2006)

Nota. Mecanismo de reconhecimento de ligantes através da membrana plasmática ou receptores (receptor para complemento 3, receptor "scavenger", receptor de manose, dectina-1; e receptores "toll-like") desencadeando ativação, fosforilação ou desfosforilação de enzimas em cascata, como proteína quinase C, fosfolipase C, fosfoinositol 3 quinase, proteínas quinase ativada por mitógeno, fatores de transcrição como STAT, NF-κB, Jun, Fos, as quais resultam na ativação ou repressão da transcrição de diferentes genes.

Estudos com o objetivo de relacionar a estrutura de polímeros com a atividade biológica têm sido descritos para algumas classes de polissacarídeos MRB. Para os quais é possível evidenciar o estímulo de atividades biológicas e correlacionar com tipos de ligações glicosídicas, grau de ramificação do polímero, massa molecular e presença de grupamentos substituintes na estrutura (TZIANABOS, 2000; LEUNG *et al.*, 2006; SCHEPETKIN; QUINN, 2006).

As D-glucanas ligadas β -(1→3) representam os polímeros melhor descritos quanto a estrutura e função biológica (LEUNG *et al.*, 2006). Observa-se que o aumento da massa molecular dessas moléculas está relacionado ao estímulo de atividades biológicas em macrófagos, como secreção de

citocinas (OKAZAKI *et al.*, 1995; FALCH *et al.*, 2000). Onde assume-se que polissacarídeos com maior massa molecular tem a chance de colidir mais com os receptores ou proteínas ligadoras de polissacarídeos (LEUNG *et al.*, 2006). Foi observado, ainda, que β -D-glucanas (1 \rightarrow 3), com ramificações de β -D-glucanas (1 \rightarrow 6), aumentam as atividades microbicidas em células do sistema imune (POUTSIKA *et al.*, 1993; BLEICHER; MACKIN; BETAFFECTIN, 1995).

As mananas, tanto α -mananas de leveduras quanto β -mananas de *Aloe vera*, são polímeros caracterizados por terem sua estrutura conhecida e relacionada com estímulo de atividades em macrófagos (LEUNG *et al.*, 2006). Observa-se que o aumento da massa molecular juntamente com o tipo de ligação glicosídica, D-mananas ligadas β -(1 \rightarrow 4), acetiladas em C-6 em *Aloe vera*, são as características mais relevantes quanto ao estímulo de funções celulares como secreção de citocinas (LEUNG *et al.*, 2004).

As arabinogalactanas são uma classe de polissacarídeos que vem sendo especulados com relação a atividade biológica. Estes polímeros ocorrem em duas formas estruturalmente diferentes, denominadas arabinogalactanas tipo I e tipo II.

As arabinogalactanas tipo I são polissacarídeos com estrutura linear de D-galactose ligadas β -(1 \rightarrow 4) com cadeias laterais, ligadas em O-3, de unidades de L-arabinose ligadas α -(1 \rightarrow 5). Arabinogalactanas tipo II são polímeros com alto grau de ramificação, constituídos por unidades de β -D-galactose unidas por ligações (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 6). As cadeias externas do polímero são, ainda, geralmente terminadas em unidades de L-arabinose (PEREZ; MAZEAU; du PENHOAT, 2000). A complexidade estrutural dificulta a correlação entre ligações glicosídicas e atividade biológica, no entanto correlações acerca de massa molecular vem sendo descritas.

Diversos efeitos em macrófagos já foram descritos para arabinogalactanas, como estímulo da produção de EROs, ERNs e citocinas. Onde se observa que os polímeros com as maiores massas moleculares exibem maior intensidade de efeitos (GAO *et al.*, 1996; SCHEPETKIN *et al.*, 2005).

Nas últimas décadas polissacarídeos vegetais têm sido alvos de estudo visando identificar atividades MRB, por apresentarem baixa toxicidade quando comparados a outros biocompostos (TZIANABOS, 2000; PAULSEN, 2001; LEUNG *et al.*, 2004; SCHEPETKIN; QUINN, 2006). Dentre os polissacarídeos vegetais de grande interesse destacam-se as pectinas.

2.2.1 Pectinas modificadoras da resposta biológica

Pectinas constituem os polissacarídeos mais complexos estruturalmente da parede celular de plantas (YAGO, 2011). Apresentam perfil polidisperso e polimolecular, com três principais moléculas compondo a estrutura principal, as homogalacturonanas (HG), ramnogalacturonanas tipo I (RG-I) e tipo II (RG-II). Esses polímeros exibem significativa heterogeneidade com relação à massa molecular e composição química, esta demonstrada na figura 8 (PEREZ; MAZEAU; du PENHOAT, 2000; WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006; MOHNEN, 2008).

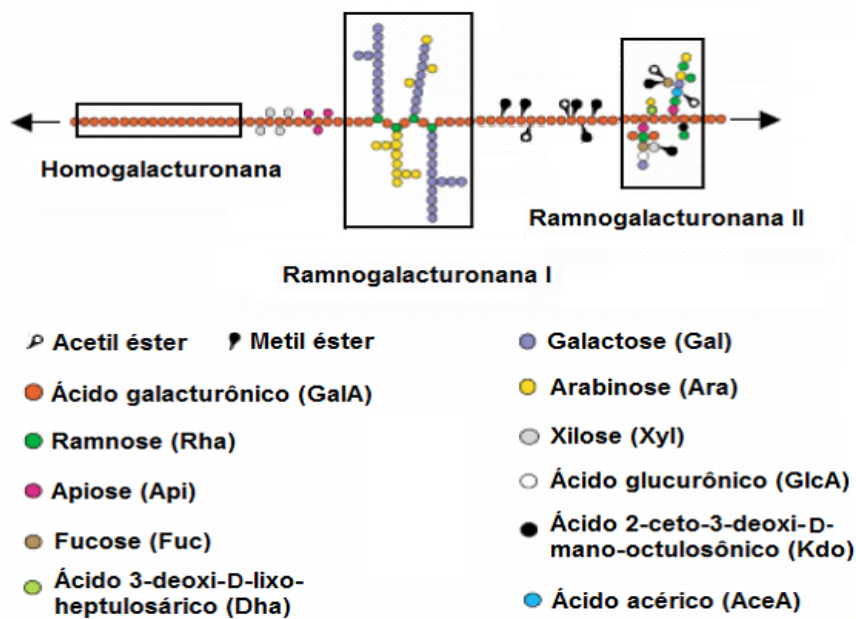


FIGURA 8. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE PECTINAS
 FONTE: adaptada (WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006)

O polímero linear, denominado HG, é constituído de unidades de ácido D-galacturônico unidas por ligações glicosídicas do tipo α -(1→4). A cadeia principal pode estar esterificada com grupos metil em C-6 e O-acetilados em O-2 ou O-3 (RIDLEY; O'NEILL; MOHNEM, 2001).

O polímero RG-I consiste de uma cadeia principal constituída de unidades de ácido D-galacturônico ligados α -(1→4) alternando com unidades de ramnose ligadas α -(1→2), as quais podem estar parcialmente substituídas em O-3 ou O-4. As substituições podem ser por açúcares simples ou por cadeias laterais poliméricas como L-arabinanas ligadas α -(1→5), D-galactanas ligadas β -(1→4), arabinogalactanas tipo I (AG-I) e tipo II (AG-II) e possivelmente galacto-arabinanas. As RG-I podem estar também acetil-esterificadas em O-2 e/ ou O-3 (YAPO, 2011).

O RG-II é um polímero constituído por unidades de ácido D-galacturônico unidos por ligações α -(1→4) compondo a cadeia principal e cadeias laterais complexas com diferentes monossacarídeos, grande parte deles raros, como ácido acérico (3-C-carboxi-5-deoxi-L-xilose), Dha (ácido 3-deoxi-D-lixo-2-heptulosárico) e Kdo (ácido 2-ceto-3-deoxi-D-mano-octulosônico), e cerca de 20 tipos de ligações glicosídicas. As cadeias principais de RG-II podem, ainda, estar metil-esterificadas em C-6 (YAPO, 2011).

As pectinas estão entre os polissacarídeos MRB mais estudados em relação ao estímulo das funções de macrófagos. Na tabela 1 estão resumidos alguns dos efeitos biológicos estimulados em macrófagos por pectinas.

TABELA1. ALGUMAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE MACRÓFAGOS ESTIMULADAS POR PECTINAS

Fonte de pectina	Atividades biológicas	Células testadas	Referências
Folhas de <i>Panax ginseng</i>	↑↑ Expressão de receptor Fc	Macrófagos murinos	SHIN <i>et al.</i> , 1997
Fruto de <i>Spondias cytherea</i>	Ativação celular	Macrófagos murinos	IACOMINI <i>et al.</i> , 2005
Folhas de <i>Glinus oppositifolius</i>	↓↓ Hemólise celular e ↑NO	Macrófagos murinos	INNGJERDINGEN <i>et al.</i> , 2005
Pectinas de <i>Citrus</i>	↓↓ iNOS e COX-2	Macrófagos murinos e linhagem RAW 264.7 estimulada com LPS	CHEN <i>et al.</i> , 2006
Flores de <i>Tanacetum vulgare</i>	↑↑ NO e ↑↑TNF-alfa	Linhagem J774.A1	XIE; SCHEPETKIN; QUINN, 2007
Folhas de <i>Opilia celtidifolia</i>	↑ NO	R2 Wistar	TOGOLA <i>et al.</i> , 2008

FONTE: o autor (2012)

Nota. COX-2, ciclooxigenase 2; Fc, receptor de imunoglobulina; RAW 264.7 e J774.A1 linhagens imortalizadas de macrófagos murinos.

A relação estrutura de pectinas e atividade biológica é limitada devido a complexidade estrutural dos polímeros (LEUNG *et al.*, 2006). Porém alguns estudos tem sido realizados relacionando modificações de cadeias laterais e grupos substituintes dos polímeros com funções de alguns tipos celulares (SAMUELSEN *et al.*, 1996; YU *et al.*, 1998, 2001; WANG; LIU; FANG, 2005; CHEN *et al.*, 2006; SALMAN *et al.*, 2008; WANG; LUO; ZHA, 2010).

2.3 Pectinas do cacau

Polissacarídeos do cacau foram isolados pela primeira vez por Whistler e colaboradores (1956), onde os autores descreveram a riqueza e complexidade da estrutura química e caracterizaram a fonte como sendo constituída, majoritariamente, por pectinas. Posteriormente outros autores exploraram a riqueza e aplicabilidade dessa fonte de polissacarídeos complexos através de diferentes metodologias de extração e purificação (ADOMAKO, 1972; VRIESMANN; AMBONI; PETKOWICZ, 2011).

TABELA 2. ALGUMAS ATIVIDADES DESCRITAS PARA OS COMPOSTOS DO CACAU

Fonte de cacau	Atividade	Teste	Referência
Extrato bruto das folhas	Antioxidante	Redução do Fe ⁺⁺⁺	OSMAN; NASARUDIN; LEE, 2004
Compostos fenólicos da casca do fruto	Antioxidante Esquemia	DPPH Viabilidade da linhagem SHSY5Y	ARLÓRIO <i>et al.</i> , 2005
Fibras e polifenóis da casca das sementes	Antioxidante	Métodos FRAP e TEAC	LECUMBERRI <i>et al.</i> , 2007
Frações com lignina da casca do fruto	Anti-HIV, Anti-H1N1, Antimicrobica Produção de NO Sequestro de radicais	Viabilidade da linhagem HTLVI Viabilidade da linhagem MDCK Mortalidade <i>Streptococcus mutans</i> Reagente de Griess ERS	SAKAGAMI <i>et al.</i> , 2008
Extrato bruto da casca do fruto	Inibição da degradação de triptofano pela inibição da enzima IDO	Viabilidade celular da monócitos ELISA HPLC	JENNY <i>et al.</i> , 2009
Polifenóis da casca do fruto	Antioxidante Inibição da lipoperoxidação Oxidação plasmática	ABTS DPPH FRAP TBARS	SCHINELLA <i>et al.</i> , 2010

FONTE: o autor (2012)

Nota. DPPH, espécie reativa ; ERS, ressonância espectroscópica; FRAP, técnica de detecção de redução do ferro; TBARS, técnica de detecção de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico; TEAC, técnica de detecção do sequestro do radical ABTS; HTLVI, linhagem leucêmica sensível ao vírus HIV; MDCK, linhagem renal sensível ao vírus H1N1.

Alguns estudos tem sido realizados com extratos e compostos isolados de diversas partes do cacau, como mostrados na tabela 2, no entanto estudos com polissacarídeos isolados da fonte ainda são escassos.

Recentemente Vriesmann e colaboradores (2011), isolaram uma pectina naturalmente acetilada da casca dos frutos do cacau por extração mediada por ácido nítrico utilizando metodologia de superfície. Os resultados indicaram maior rendimento da amostra e enriquecimento em relação a sua porcentagem de ácido urônico (VRIESMANN; TEÓFILO, PETKOWICZ, 2011).

O polímero, denominada de OP (pectina otimizada), é caracterizado por apresentar massa molecular - entre $1,681 \cdot 10^6$ a $3,498 \cdot 10^5$ g.mol⁻¹ - diversidade monossacarídica e a presença de grupamentos substituintes – grupamentos acetil e metil – como pode ser observado na tabela 3 (VRIESMANN; TEÓFILO, PETKOWICZ, 2011).

Tendo em vista a escassez de estudos visando avaliar a atividade biológica de polissacarídeos isolados das cascas do fruto do cacau, a importante busca no esclarecimento do papel da estrutural principal e presença de grupamentos substituintes dos polímeros em atividade biológica. No presente estudo uma pectina naturalmente acetilada, isolada dessa fonte, sua forma parcialmente desacetilada (PDOP) e ainda um polímero linear de poligalacturonato (PG) foram avaliadas em relação às suas potenciais propriedades biomoduladoras utilizando como modelo experimental macrófagos peritoneais de camundongos.

TABELA 3. COMPOSIÇÃO DA PECTINA OP OBTIDA EM CONDIÇÃO OTIMIZADA DA CASCA DOS FRUTOS DE CACAU

Composição	Porcentagem massa/ massa
Umidade	5,8 ± 0,2
Carboidratos	69,9 ± 1,2
Proteína	3,6 ± 1,8
Fenólicos	3,9 ± 0,6
Monossacarídeos	
Ramnose	10,0 ± 1,0
Arabinose	2,7 ± 1,8
Xilose	0,7 ± 0,5
Manose	1,0 ± 0,5
Galactose	16,8 ± 0,9
Glucose	2,8 ± 0,6
Ácido urônico	66,0 ± 2,2
Grau de esterificação	56,6 ± 1,4
Grau de acetilação	17,1 ± 0,5

FONTE: adaptada (VRIESMANN; TEÓFILO, PETKOWICZ, 2011)

3. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

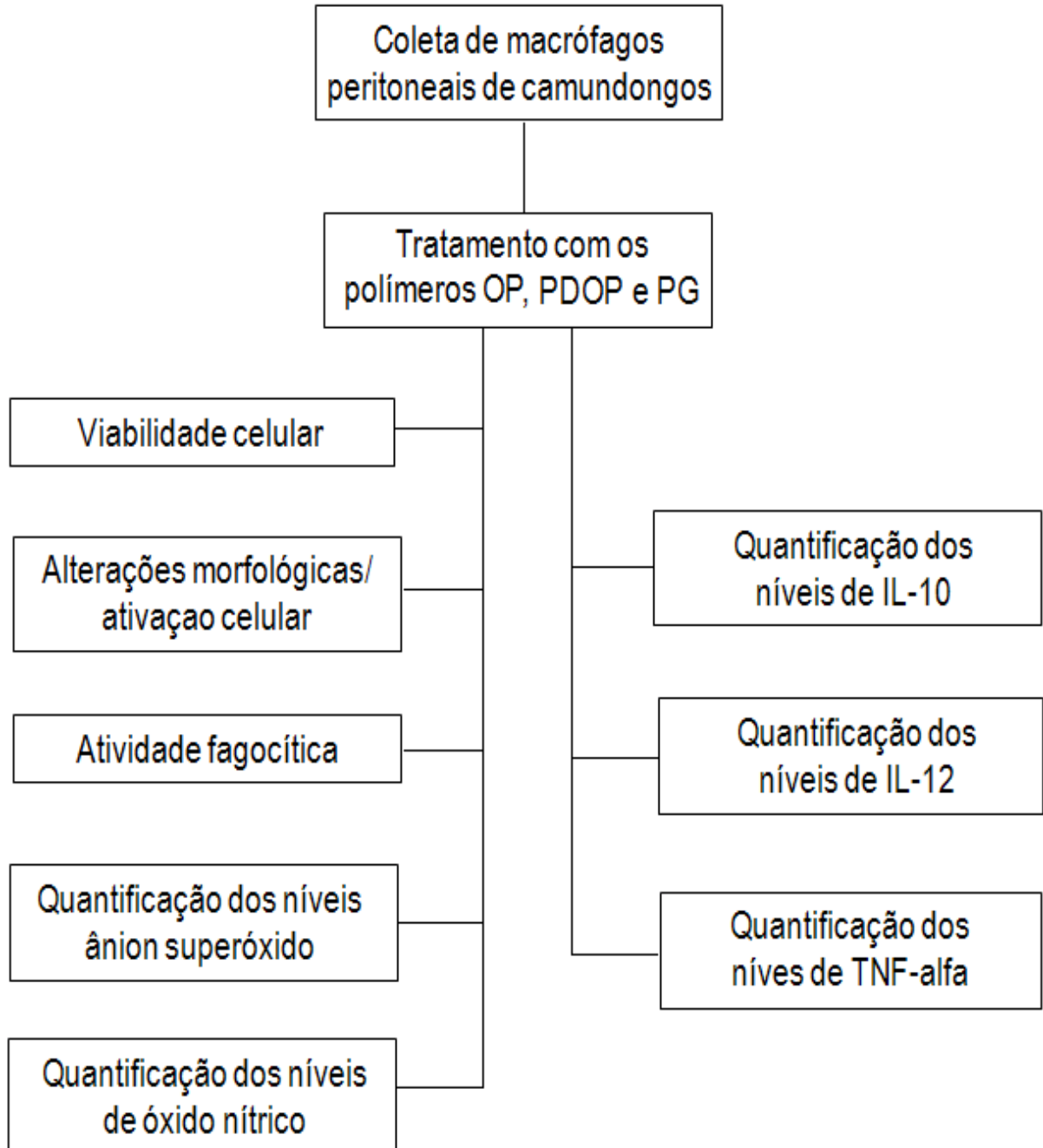


FIGURA 9. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL
FONTE: o autor (2012)

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 EQUIPAMENTOS, MATERIAL, REAGENTES E ESTERILIZAÇÃO

4.1.1 Equipamentos

Os equipamentos utilizados no presente trabalho foram: autoclave vertical Prismatec®; ultrapurificador de água Gehaka®; fluxo laminar Veco® CFLV12; centrífuga Hitachi Himac® CR21E; microscópio óptico comum acoplado a máquina fotográfica Bel Photonics®; microscópio óptico invertido Olympus® MODCK2; leitor de microplacas Biotek® Epoch; pHmetro Qualxtron® 1500; aparelho de esterilização sob pressão Sartorius®; aparelho microondas Eletrolux® ME46X; estufa de CO₂ Sanyo®; destilador Quimis®; refrigerador Consul® biplex 450; freezer Eletrolux®; espectrofotômetro Shimadzu® UV 2450; banho-maria Biopar® BMD03; programa estatístico Graphpad Prism® versão 5.1; programa de espectrofotômetro UV probe® 2450; programa de leitor de microplacas GEN® 5 1.11.

4.1.2 Material e reagentes

Material adquirido da BD (Becton Drive)®: seringas de plástico e agulhas 25 x 7 mm.

Material adquirido da Millipore®: filtros millex descartáveis de 0,22 µm de poro e membranas de acetado de celulose de 0,22 µm de poro.

Material adquirido da RayBiotech (RayBio®): placas de ensaio imunoabsorvente para as citocinas IL-10, IL-12 e TNF-α.

Material adquirido da TPP (Techno Plastic Products)®: placas de cultura multiposços e tubos Falcon de 15 e 50 mL.

Reagentes adquiridos da Merk® do Brasil: ácido acético glacial, ácido clorídrico, ácido pícrico, ácido sulfúrico, cloreto de cálcio, cloreto de potássio, cloreto de sódio, dimetilsulfóxido, entellan, etanol, eosina, formaldeído, fosfato dibásico de potássio, fosfato dibásico de sódio, fosfato monobásico de potássio, fosfato monobásico de sódio, giemsa, glucose, hematoxilina, hidróxido de sódio, sulfato de alumínio, sulfato de magnésio heptahidratado e metanol.

Reagentes adquiridos da Sigma Chemical Co® (St Louis, MO): ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2'-etanossulfônico (HEPES), brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio (MTT),

citocromo c de coração equino, forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS), N-naftil etilenodiamino (NED) e sulfanilamida.

Reagentes adquiridos da Cultilab® (Campinas, SP): gentamicina, meio mínimo essencial (MEM) e soro fetal bovino.

4.1.3 Procedimentos de esterilização

O material e as soluções utilizados nos experimentos foram esterilizados fazendo-se uso de três sistemas diferentes de esterilização. Esterilização por autoclave (temperatura de 121°C, pressão de uma atmosfera durante 40 minutos) para soluções não sensíveis a altas temperaturas e material de vidro. Esterilização por microondas (potência de 50 W, atmosfera umidecida com recipiente de água durante 40 minutos) para material de plástico. Esterilização por membrana de celulose sob pressão (através da passagem das soluções em membrana esterilizante de 0,22 µm de poro) para meios de cultura e soluções sensíveis à altas temperaturas.

As soluções e reagentes foram preparados utilizando água deionizada através do sistema de ultrapurificação, bem como água usada para reconstituir meios e soluções citada no decorrer do texto, a qual ainda foi esterilizada em autoclave nas condições descritas no parágrafo anterior. A refrigeração dos meios e soluções foi controlada a 4°C em geladeira, o congelamento a - 20°C em freezer e a temperatura ambiente considerada está controlada a uma média de 25°C.

4.2 POLISSACARÍDEOS

Os polissacarídeos utilizados no presente trabalho foram, gentilmente, cedidos pela Profa. Dra. Carmen Lúcia de Oliveira Petkowicz do Laboratório de Química de Carboidratos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

A pectina naturalmente acetilada (OP), um polímero que tem como características estruturais a presença de famílias de homogalacturonanas e inserções de ramnogalacturonanas tipo I, foi isolado da casca dos frutos de cacau *Theobroma cacao* L. e caracterizado pela aluna de doutorado Lúcia Cristina Vriesmann (VRIESMANN; TEÓFILO; PETKOWICZ, 2011).

A forma parcialmente desacetilada do polímero OP, polímero PDOP, foi preparada para o desenvolvimento deste trabalho, também pela aluna Lúcia, onde aproximadamente 50% dos grupamentos acetil desta estrutura foram removidos. O terceiro composto testado, poligalacturonato

(PG), é um polímero linear constituído somente pela família de homogalacturonanas, obtido da empresa Sigma, inscrito sob o código 81325 e lote 1294924.

4.2.1 Soluções dos polissacarídeos

O polissacarídeo OP foi solubilizado em solução de tampão fosfato (PBS), enquanto os polissacarídeos PDOP e PG em água, todos na concentração de 1 mg.mL^{-1} (solução estoque), condições essas que apresentaram a melhor solubilidade para as amostras. Posteriormente estas soluções foram filtradas, estratégia mais eficiente para esterilização das amostras (comparada a autoclavagem). As concentrações destas soluções foram corrigidas através da dosagem de carboidratos. As soluções foram alíquotadas, congeladas e posteriormente diluídas em meio de cultura (MEM) ou solução (HBSS) para realização dos experimentos.

4.2.2 Dosagem de carboidratos totais e teste de detecção de LPS

Para determinação das concentrações dos polissacarídeos, após filtração em membrana de $0,22 \mu\text{m}$, realizou-se dosagem de carboidratos totais nas amostras através do método do fenol sulfúrico, descrito por Dubois e colaboradores (1956).

Após a dosagem de carboidratos totais uma alíquota de cada amostra foi submetida à análise para identificar presença de LPS nas soluções dos polímeros, a fim de descartar possíveis efeitos mediados por essa molécula. Estas determinações foram realizadas por GC-MS (SANTANA-FILHO *et al.*, 2012), pelo aluno de doutorado Arquimedes Paixão de Santana Filho do grupo de Bioquímica de Glicocompostos da Universidade Federal do Paraná.

4.3 MEIO E SOLUÇÕES UTILIZADOS NOS PROCEDIMENTOS DE CULTIVO CELULAR

4.3.1 Meio essencial mínimo (MEM)

Meio essencial mínimo (MEM) (EAGLE, 1959), utilizado para cultivo de macrófagos peritoneais foi reconstituído em água e esterilizado por filtração sob pressão. Este meio foi suplementado com HEPES estéril para concentração final de 20 mmol.L^{-1} , 5% de soro fetal bovino e $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de gentamicina, seu pH foi ajustado a 7,4 com solução estéril de bicarbonato de sódio a $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$.

4.3.2 Solução de azul de tripan

A solução de azul de tripan foi preparada através da solubilização do corante em solução de PBS na concentração de 0,4% (p/v). A solução foi preparada com volume suficiente para todos os experimentos independentes e armazenada sob refrigeração.

4.3.3 Solução de bouin

A solução de bouin foi preparada na proporção de 15: 5: 1 de ácido pícrico saturado, formaldeído e ácido acético glacial. A solução foi preparada para todos os experimentos independentes e o ácido acético adicionado imediatamente na hora do uso para evitar precipitação da solução.

4.3.4 Solução de citocromo c

Citocromo c, na concentração de 80 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, foi solubilizado em solução de HBSS e sua concentração foi determinada utilizando-se o coeficiente de extinção molar do citocromo c (cit c. oxid. red. = $2,1 \times 10^4 \text{ mol.L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) em procedimento acompanhado em espectrofotometria a 550 nm. A solução foi preparada com volume suficiente para todos os experimentos independentes, aliqüotada e armazenada sob congelamento.

4.3.5 Solução de Griess

O reagente de Griess foi preparado pela mistura de duas soluções na proporção 1: 1, imediatamente antes do uso. A primeira solução é constituída por naftiletlenodiamino 0,1% (p/v) em ácido orto-fosfórico 5% (v/v) e a segunda por sulfonamina *p*-aminobenzeno 1% (p/v) em ácido fosfórico 5% (v/v) (KELLER *et al.*, 1990). As soluções foram preparadas com volume suficiente para todos os experimentos independentes e armazenadas sob refrigeração.

4.3.6 Solução de leveduras

As leveduras foram preparadas com cinco lavagens com PBS, centrifugações a 2000 r.p.m por 15 minutos, de forma alternada e sucessiva. Posteriormente foram reconstituídas em meio MEM, em concentração já determinada para os ensaios, aliqüotadas e mantidas sob congelamento até utilização.

4.3.7 Solução de MTT

Brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio foi solubilizado em solução de HBSS para concentração estoque de 5 mg.mL^{-1} em volume necessário para todos experimentos independentes. A solução foi preparada e armazenada, protegida da luz, para período máximo de uma semana de utilização.

4.3.8 Solução salina tamponada livre de cálcio e magnésio (PBS)

Solução constituída de Na_2HPO_4 $40,5 \text{ mmol.L}^{-1}$, KH_2PO_4 $7,3 \text{ mmol.L}^{-1}$ e NaCl 680 mmol.L^{-1} foi preparada como solução estoque cinco vezes concentrada e seu pH foi ajustado para 7,4 com solução de bicarbonato de sódio $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$. Em seguida foi esterilizada em autoclave e armazenada sob refrigeração. Para uso a solução foi diluída com água e posteriormente armazenada sob refrigeração.

4.3.9 Solução salina balanceada de Hanks livre de cálcio e magnésio (HBSS)

A solução salina balanceada de Hanks (HBSS) (HANKS; WALLACE, 1949) foi preparada através da mistura de duas soluções, A e B, as quais foram preparadas na forma de soluções estoque vinte vezes concentradas. A solução A constituída por NaCl $2,737 \text{ mol.L}^{-1}$ e KCl 104 mmol.L^{-1} e a solução B por Na_2HPO_4 $8,4 \text{ mmol.L}^{-1}$, KH_2PO_4 $8,7 \text{ mmol.L}^{-1}$ e glucose 100 mmol.L^{-1} . As duas soluções foram diluídas com água e misturadas, seu pH ajustado para 7,4 com solução de bicarbonato de sódio $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$. A solução para uso foi, então, esterilizada por filtração.

4.4 CULTIVO CELULAR

4.4.1 Animais

Os animais utilizados neste trabalho foram camundongos albinos Swiss fêmeas (*Mus musculus*). Estes foram mantidos no Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná até dois meses de idade, submetidos a ciclos luz-escuro de 12/12 horas, com água e ração à vontade.

Para desenvolvimento das atividades laboratoriais foi obtida a aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA), no Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, em anexo na página 86. Foram respeitadas todas as recomendações de manejo científico de animais, de acordo com a lei nacional brasileira (nº. 6.638 de 5 de Novembro, 1979).

4.4.2 Isolamento de macrófagos peritoneais de camundongos

Os animais foram eutanasiados com uso do anestésico isoflurano, administrado em aparato hermeticamente fechado em capela de vapor químico estruturada para eutanásia de pequenos animais. Seguiu-se com exposição peritoneal e inoculação do volume de 10 mL de solução de HBSS nesta cavidade. O exsudado coletado foi transferido para tubos de centrifuga e as células centrifugadas à 2000 r.p.m. por 10 minutos à 4 °C, o “*pellet*” ressuscitado em MEM em volume conhecido.

Seguida a contagem de células e determinada a viabilidade de macrófagos, pelo método de azul de tripan descrita no tópico 4.4.3, as células foram plaqueadas e colocadas para aderir à atmosfera de 5% de CO₂ e temperatura de 37 °C por um período de duas horas (NOLETO *et al.*, 2002). Seguindo ao processo de adesão foi realizada lavagem das células uma vez com solução de HBSS. Por esse processo garante-se que acima de 90% das células são macrófagos, sendo desnecessário qualquer processo de purificação da cultura (ADAMS, 1979). A partir do exposto as condições experimentais variam de acordo com cada protocolo.

4.4.3 Determinação da viabilidade celular de macrófagos após coleta

Para determinação da viabilidade dos macrófagos, logo após a coleta, utilizou-se do protocolo descrito por Philips (1973). Esse ensaio se baseia na capacidade de células viáveis em excluírem o corante azul de tripan, através do seu potencial de membrana, do citoplasma celular. Células mortas são incapazes de excluí-lo e coram-se de azul.

Logo após a centrifugação das células coletadas o “*pellet*” foi suspenso em um volume conhecido de meio e retirado alíquota de 10 µL desse volume, misturado a 10 µL de solução de azul de tripan e 80 µL de meio de cultura e, posteriormente, realizada contagem em câmara de Neubauer. A proporção entre o número de células viáveis e o total (vivas e mortas) fornece uma porcentagem de viabilidade celular, a qual deve ser superior a 90% (MORGAN; DARLING, 1993).

4.5 MÉTODOS ANALÍTICOS APÓS TRATAMENTO DOS MACRÓFAGOS COM OS POLÍMEROS

4.5.1 Determinação da viabilidade celular

Para determinação da viabilidade dos macrófagos, após tratamento com os polímeros, foi utilizado o método descrito por Mosmann (1983), com modificações. A viabilidade se confirma pela presença de cristais de formazan formados pela redução do sal de tetrazólio por desidrogenases presentes em células metabolicamente viáveis.

Em fluxo laminar, aos macrófagos peritoneais plaqueados 4.10^5 células/poço em placa de 96 poços e aderidos como exposto no item anterior 4.4.2, foram adicionadas somente meio (controle) ou as soluções de polissacarídeos nas concentrações de 25, 50, 100, 200 e 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ seguida de incubação a 37 °C em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ por 48 horas. Após o tempo de tratamento o sobrenadante foi removido, as células lavadas uma vez com solução de HBSS e adicionada solução de MTT, descrita no item 4.3.7. A placa foi incubada por mais três horas, em condições semelhantes às de tratamento. Após o tempo de incubação o excesso de MTT foi removido e os cristais de formazan foram dissolvidos em DMSO. A absorbância foi determinada em leitor de microplacas, após a estabilização da reação por dez minutos, em comprimento de onda de 550 nm.

4.5.2 Avaliação da ativação celular

A ativação dos macrófagos tratados com os polissacarídeos foi determinada através de observações em microscopia óptica e posterior contagem das células residentes e ativadas conforme Moretão e colaboradores (2003).

Os macrófagos foram plaqueados, em fluxo laminar, 4.10^5 células/poço em placa de 24 poços contendo lamínulas (redondas) de vidro e, em seguida aderidos como exposto no item 4.4.2, na sequência foi adicionado MEM contendo os polissacarídeos em concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Após 48 horas de tratamento o sobrenadante foi removido e as lamínulas lavadas duas vezes com solução de HBSS. Na sequência as células foram fixadas com bouin, por cinco minutos, lavadas sucessivamente duas vezes com álcool 70% e duas vezes com água destilada. As lamínulas foram, posteriormente, coradas com hematoxilina por um minuto, o excesso de corante retirado pela exposição das lamínulas à água corrente por 10 minutos e na sequência coradas com eosina por 30 segundos. A seguir foram desidratadas com soluções sucessivas de acetona pura, acetona: xilol (2: 1),

acetona: xilol (1: 1), acetona: xilol (1: 2), xilol puro e, por último, montadas, seguida de análise em microscópio óptico. Como controle os macrófagos foram tratados somente com MEM. Para observação de características de macrófagos ativados as células foram tratadas com LPS 100 ng.mL^{-1} (controle positivo de ativação).

4.5.3 Avaliação da atividade fagocítica

Para avaliar a interferência dos polissacarídeos na atividade fagocitária dos macrófagos, estas células na densidade de 4.10^5 células/poço em placa de 24 poços, contendo lamínulas (redondas) de vidro estéreis, foram expostas aos polissacarídeos nas concentrações de 100 e $200 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$. Após 48 horas de tratamento o sobrenadante foi removido e as lamínulas lavadas duas vezes com solução de HBSS. A seguir realizou-se a incubação com as leveduras, feita na proporção de 10: 1 partículas/macrófago, durante uma hora de exposição. Em seguida foram realizadas duas lavagens sucessivas com solução de HBSS, para retirada das partículas não fagocitadas. As lamínulas foram processadas como descrito por Moretão e colaboradores (2003). Posteriormente as células foram fixadas com bouin por cinco minutos, lavadas sucessivamente duas vezes com álcool a 70% e duas vezes com água destilada. As lamínulas foram então coradas com giemsa, durante uma hora, desidratadas com soluções sucessivas de acetona pura, acetona: xilol (2: 1), acetona: xilol (1: 1), acetona: xilol (1: 2), xilol puro e, por último, montadas, seguida de análise em microscópio óptico. Como controle os macrófagos foram incubados somente com MEM.

4.5.4 Quantificação dos níveis de ânion superóxido

A avaliação da produção de ânion superóxido pelos macrófagos submetidos ao tratamento com os polissacarídeos foi realizada conforme descrito por Johnston, Godzik e Cohn (1978). A qual se baseia na redução extracelular do citocromo c na presença de ânion superóxido.

Os macrófagos (4.10^5 células/poço) foram incubados em placas de 96 poços, após adesão foram tratados com os polissacarídeos nas concentrações de 100 e $200 \text{ } \mu\text{g. mL}^{-1}$ (diluídos em solução de $80 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ de citocromo c em HBSS). Decorrido o tempo de tratamento, de meia, uma, uma e meia e duas horas a $37 \text{ } ^\circ\text{C}$ e atmosfera de 5% de CO_2 , o sobrenadante foi transferido para outra placa e submetido à leitura de absorbância em comprimento de onda de 550 nm em leitor de microplacas, como branco utilizou-se citocromo c diluído em HBSS. Como controle as células foram incubados

somente com HBSS e citocromo c e como controle positivo os macrófagos foram incubados na presença de PMA ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Para determinar a concentração de ânion superóxido utilizou-se o coeficiente de extinção molar do citocromo c oxidado/reduzido (coef. ext. mol. cit c oxid. red. = $2,1 \times 10^4 \text{ mol. L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

4.5.5 Quantificação dos níveis de óxido nítrico

Por possuir um tempo de meia vida curto a determinação da produção do óxido nítrico foi mensurada indiretamente pela dosagem dos seus produtos de degradação mais estáveis como o nitrito. O protocolo seguido foi o descrito por Keller e colaboradores (1990).

Os macrófagos isolados da cavidade peritoneal foram plaqueados na densidade de 4.10^5 células/poço em placas de cultura de 96 poços. Aos macrófagos aderidos foram adicionadas as soluções de polissacarídeos nas concentrações de 100 e $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Após os tempos de tratamento, 12, 24 e 48 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2 , $100 \mu\text{L}$ do sobrenadante foi transferido para outra placa de 96 poços e adicionado $100 \mu\text{L}$ do reagente de Griess. Após a estabilização da reação, pelo tempo de dez minutos, a absorbância foi medida em 550 nm, em leitor de microplacas, utilizando como branco MEM mais o reagente de Griess. As concentrações de nitrito foram determinadas utilizando uma curva padrão de NaNO_2 (nas concentrações de 5, 10, 30 e $60 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Como controle positivo da ativação da produção de óxido nítrico foi utilizado LPS na concentração de 100 ng.mL^{-1} , e como controle os macrófagos foram incubados somente com meio de cultura.

4.5.6 Quantificação dos níveis das citocinas IL-10, IL-12 e TNF-alfa

Para quantificação das citocinas foi utilizado o ensaio de enzima ligada ao imunoabsorvente (ELISA) de captura. Para a avaliação da produção de IL-10, IL-12 e TNF-alfa pelos macrófagos, estas células foram plaqueadas a uma densidade de 4.10^5 células/poço em placas de 96 poços. Após a adesão o meio de cultura foi retirado e adicionou-se meio de cultura contendo os polissacarídeos OP, PDOP e PG nas concentrações de 100 e $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Após período de tratamento, 48 horas para produção de IL-10 e IL-12, e 6 horas para o TNF-alfa, a 37°C em atmosfera de 5% CO_2 . Posteriormente o sobrenadante foi retirado e as concentrações das citocinas determinadas por ELISA, segundo especificações do fabricante (RayBiotech®) em comprimento de onda de 450 nm. Como

controle as células foram tratadas apenas com meio de cultura e como controle positivo utilizou-se LPS (100 ng.mL⁻¹).

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos testes das atividades foram submetidos à análise de variância Anova (fator único) seguido de pós-teste de Tukey, para comparação das médias, utilizando programa estatístico descrito no tópico equipamentos. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (média ± DP) ou média ± erro padrão (média ± EP) de no mínimo três experimentos independentes em duplicata ou triplicata. Foram considerados estatisticamente significativos os valores comparados ao nível de significância igual 95% ou menor ($p \leq 0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Efeitos dos polissacarídeos sobre a viabilidade celular

O efeito dos polissacarídeos sobre macrófagos foi observado, inicialmente, pelo ensaio de citotoxicidade, utilizando o teste do MTT, para determinar em quais concentrações esses polímeros poderiam ser utilizados nas avaliações posteriores. Este método foi o mais adequado devido às características destas células. Macrófagos são células pinocíticas e permanecem aderidas em placas de cultivo mesmo depois de mortas, portanto, protocolos como viabilidade por azul de tripan e cristal violeta os quais avaliam, respectivamente, a integridade da membrana utilizando as células em suspensão e coloração do DNA em células aderidas não se mostraram satisfatórios.

O ensaio de redução do sal MTT a cristais de formazan pelo complexo succinato desidrogenase de células metabolicamente viáveis é um dos testes mais difundidos para determinação da ação citotóxica de drogas em cultura de células (CHIBA; KAWAKAMI; TOHYAMA, 1998). Por ser uma técnica que sofre influência de condições de tratamento, tais como mudança de pH do meio de cultura, concentração de D-glucose e nucleotídeos de pirimidina (JABBAR; TWENTYMAN; WATSON, 1989; VISTICA *et al.*, 1991), no presente estudo a técnica utilizada por Mosmann (1983) foi alterada com o acréscimo da lavagem das células com HBSS após tratamento. Essa estratégia colabora para que não sejam considerados resultados falso positivos pelo contato do sal com meio de tratamento, contendo os polissacarídeos, e com produtos do metabolismo celular.

Os macrófagos foram expostos a diferentes concentrações dos polímeros, durante um período de 48 horas de tratamento, como pode ser observado na figura 10. Esta figura mostra que somente os compostos PDOP e PG, na concentração de 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, diminuíram a viabilidade de macrófagos peritoneais, em 21 e 25% respectivamente, em relação ao controle.

Como já mencionado polissacarídeos de plantas são alvos de estudos como biomoduladores por apresentarem baixa toxicidade quando comparados com outros compostos (TZIANABOS, 2000; PAULSEN, 2001; LEUNG *et al.*, 2004; SCHEPETKIN; QUINN, 2006). Neste sentido, as pectinas utilizadas no presente estudo podem ser consideradas de baixa toxicidade para macrófagos peritoneais de camundongos. Onde observou-se que as mesmas interferiram discretamente na viabilidade destas células, em concentrações consideradas altas para testes de citotoxicidade *in vitro*, quando comparado com outros estudos do grupo, desenvolvidos em condições semelhantes (KANGUSSU MARCOLINO, 2010; SILVEIRA, 2010; AMARAL, 2011).

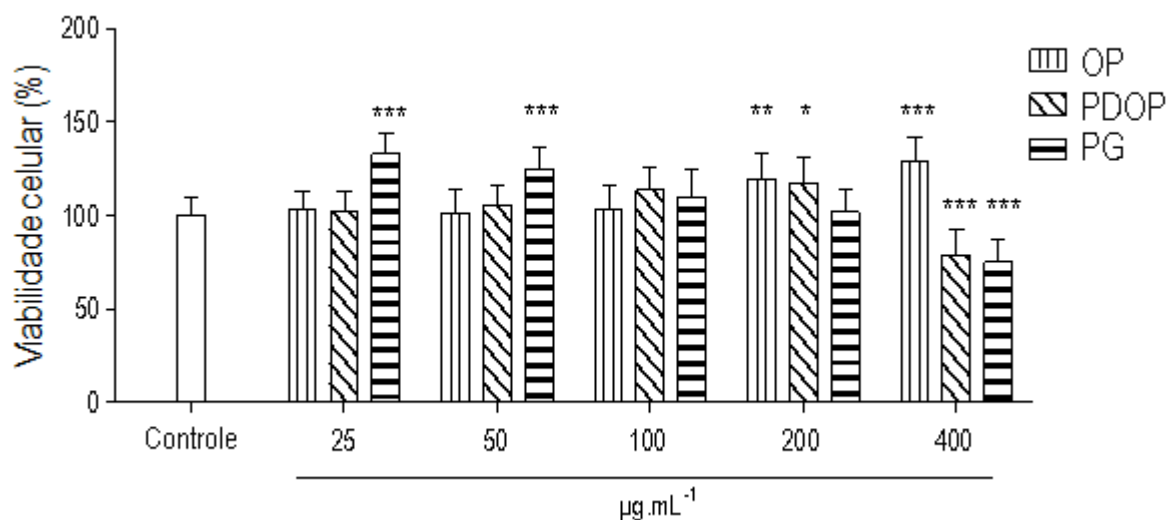


FIGURA 10. VIABILIDADE CELULAR DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM OP, PDOP E PG POR 48 HORAS

FONTE: o autor (2012)

Nota. Resultados obtidos para viabilidade celular de macrófagos peritoneais de camundongos sobre efeito de OP, PDOP e PG nas concentrações de 25, 50, 100, 200 e 400 µg.mL⁻¹. Após 48 horas na presença dos polissacarídeos a 37 °C sob 5% de CO₂, o meio de reação foi retirado, as células foram lavadas uma vez com HBSS e adicionou-se 20 µL de MTT (5 mg.mL⁻¹ em HBSS) em 180 µL de HBSS, seguindo-se incubação por mais três horas a 37 °C sob 5% de CO₂. Após três horas, o MTT foi removido e os cristais formados foram solubilizados em DMSO. A absorbância foi medida em 550 nm. Os resultados estão expressos como média ± DP (n = 5, sendo cada experimento em triplicata). ANOVA de significância * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001 em relação ao controle (células tratadas apenas com meio de cultura, e consideradas 100% viáveis ± 9,6 para normalização dos resultados).

Apresentar baixa toxicidade é uma característica também observada para pectinas de outras fontes como da flor de *Tanacetum vulgare* (catinga-de-mulata), onde a concentração de até 1,6 mg.mL⁻¹ de diferentes frações do polissacarídeo não se apresentaram tóxicas para a linhagem J774.A1 em 24 horas de tratamento (XIE; SCHEPETKIN; QUINN, 2007). E ainda quatro frações de pectinas extraídas do caule do cacto *Opuntia polyacantha* não comprometeram a viabilidade dessa mesma linhagem de macrófagos, descrita acima, em concentrações de 800 µg.mL⁻¹ dos polímeros, em condições experimentais semelhantes ao trabalho anterior (SCHEPETKIN *et al.*, 2008).

A arabinogalactana isolada da planta *Phyllanthus niruri* (quebra-pedra) comprometeu a viabilidade de macrófagos peritoneais de camundongos em aproximadamente 20% em concentrações superiores a 25 µg.mL⁻¹, comparado ao controle no período de tratamento de 48 horas. Condições semelhantes de tratamento, mas em período de 24 horas, foram descritas não comprometer a viabilidade dessas células (MELLINGER *et al.*, 2005).

As xiloglucanas das sementes de *Copaifera langsdorffii* (cobaíba) e *Hymenaea courbaril*, (jatobá) causaram diminuição na viabilidade de macrófagos peritoneais em aproximadamente 30% em

concentrações superiores a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, como pode ser observado no trabalho de Rosário e colaboradores (2008).

Uma observação interessante no presente estudo é o aumento da viabilidade celular, em relação ao controle, (figura 10). Onde o polissacarídeo OP nas concentrações de 200 e $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$ promoveu aumento de 20 e 30% na viabilidade de macrófagos, o polímero PDOP aumentou em 17% na dose de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e o polímero PG nas concentrações de 25 e $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ aumentou em 33 e 25% a viabilidade dessas células. Esse aumento na viabilidade pode ser um indicativo de ativação dessas células, uma vez que algumas enzimas expressas de maneira mais pronunciada em macrófagos no estado ativado, como a enzima iNOS, estão também envolvidas com a redução do sal de tetrazólio (POZZOLINI *et al.*, 2003).

Após a determinação das concentrações que não comprometeram a viabilidade celular, concentrações de até $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para os compostos PDOP e PG, estabeleceu-se que para a realização dos próximos experimentos as concentrações utilizadas dos três compostos seriam 100 e $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

5.2 Efeitos na ativação celular

A ativação de macrófagos pode ser observada tanto por alteração na sua morfologia como pela quantificação bioquímica de produtos de secreção resultantes de sua ativação, como o ânion superóxido e o óxido nítrico.

Inicialmente os ensaios de ativação foram realizados através da análise da morfologia e quantificação dos macrófagos residentes e ativados após o tratamentos com os polissacarídeos.

Para evidenciar mudanças na morfologia de macrófagos foram utilizados os corantes hematoxilina e eosina. A hematoxilina por ser um corante básico apresenta afinidade por componentes ácidos da célula, como resíduos de lisina de histonas do núcleo, os quais após coloração apresentam cor violeta evidenciando a presença de componentes ácidos. A eosina é um corante ácido, portanto cora componentes básicos da célula, os mesmos localizados em sua maioria no citoplasma como proteínas citoplasmáticas e mitocôndrias, as quais passam a apresentar cor rosea após coloração (RAPHAEL, 1986).

Para classificação de macrófagos em estado residente ou ativado levou-se em consideração características celulares em cada estado. Células residentes são caracterizadas por apresentarem núcleo pequeno, centralizado e com cromatina condensada; célula com formato alongado, conferindo

pouco potencial de espraiamento na superfície aderente e ainda baixa razão citoplasma núcleo. Células ativadas apresentam-se com aumento no volume celular; alta capacidade de espraiamento na superfície de adesão (caracterizado pelo aumento da produção de moléculas de adesão), adquirindo, portanto, formato celular arredondado; apresentam grande razão citoplasma núcleo; núcleo deslocado para periferia celular e a presença de vacuolizações citoplasmáticas (ADAMS, 1979; ADAMS; HAMILTON, 1984; BURKE; LEWIS, 2002).

A partir do processamento das laminulas pode-se observar que após tratamento de 48 horas, com os polímeros OP, PDOP e PG nas concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g. mL}^{-1}$, houve alterações na morfologia de macrófagos.

Na figura 11C-D, que representa o tratamento com o polímero OP nas concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, observa-se que o polissacarídeo não alterou de forma expressiva a morfologia de células residentes quando comparado ao controle, as quais estão representadas na figura 11A. As células de ambas concentrações de tratamentos mostram-se, na sua maioria, com formato alongado, núcleo centralizado e baixa razão citoplasma núcleo. Vale ressaltar que na figura representativa do controle, tratamento apenas com meio de cultura, pode-se observar que algumas células apresentam morfologia ativada, esse evento é esperado uma vez que os experimentos foram realizados com macrófagos obtidos de camundongos de biotério convencional.

O tratamento com o polímero PDOP, diferente da pectina acetilada, promoveu alteração do estado residente de macrófagos de maneira expressiva em relação ao controle, como pode ser observado na figura 11E-F, onde nota-se que a maior parte das células encontra-se no estado ativado. Estas se apresentam com tamanho celular e espraiamento aumentados, formato circular e presença de vacuolizações características de células ativadas, como indicado pelas setas. Da mesma forma, macrófagos tratados com o polímero PG, pectina sem ramificações e grupamentos acetil na estrutura, apresentou alterações na morfologia de macrófagos em relação ao controle, contudo o efeito apresentou-se mais evidente na dose de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (figura 11H).

Para expressar de forma quantitativa a ativação dos macrófagos as células residentes e ativadas foram contadas e os resultados estão apresentados na figura 12. Onde em cada um dos grupos, controle e concentrações dos polissacarídeos, foram contadas 500 células por laminula, em duplicata, em cada um dos experimentos independentes.

De acordo com os resultados o polímero OP não promoveu alterações significativas no perfil de ativação quando comparado ao controle (sem tratamento), onde somente em torno 23% das células se apresentaram no estado ativado. Observa-se, após o tratamento de 48 horas com OP, que

aproximadamente 30% das células se apresentam no estado ativado, nas duas concentrações testadas.

O tratamento com o polímero PDOP apresentou significativo aumento no perfil de ativação de macrófagos comparado ao controle. Onde em ambas concentrações testadas aproximadamente 77% das células se apresentavam com perfil ativado, indicando com isso que o estímulo não se demonstra dose dependente.

O estímulo de ativação observado para o tratamento com o polímero PG foi de menor intensidade, mas apresenta-se significativo na concentração de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, onde aproximadamente 40% das células adquirem morfologia ativada, aumento de 17% em relação ao controle.

Alterações na morfologia de macrófagos utilizando pectinas foram relatados em outros trabalhos. Uma fração de ramnogalacturonana tipo I da polpa da fruto de *Spondias cytherea* (cajá-manga) na dose de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foi capaz de aumentar em 18% a ativação de macrófagos peritoneais de camundongos em relação ao controle (IACOMINI *et al.*, 2005).

Outras classes de polissacarídeos de plantas, como arabinogalactanas isoladas de *Anadenanthera colubrina* (angico branco), demonstram-se potentes ativadores da morfologia de macrófagos. Os autores relatam que após tratamento de 48 horas com o polímero, numa concentração de 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, há aumento de 50% do perfil ativado das células em relação ao controle (MORETÃO *et al.*, 2003). Neste mesmo estudo, o polímero foi administrado na cavidade peritoneal de camundongos numa concentração de 500 mg.kg^{-1} . Após 24 horas de exposição 75% das células isoladas da cavidade peritoneal dos camundongos tratados apresentarem-se no estado ativado, enquanto que as do grupo controle apenas 34% das células apresentavam esse perfil, demonstrando assim a capacidade de modulação da arabinogalactana também *in vivo* (MORETÃO *et al.*, 2003).

No presente estudo avaliações *in vivo* com as pectinas não foram possíveis de serem realizadas devido a suas baixas solubilidades nos veículos em concentrações requeridas para os tratamentos. Este parâmetro relacionado a solubilidade futuramente deverá ser solucionado considerando-se a revelância de se avaliar os efeitos biomoduladores *in vivo* dos polímeros assim como a possível utilização destas moléculas em preparações terapêuticas.

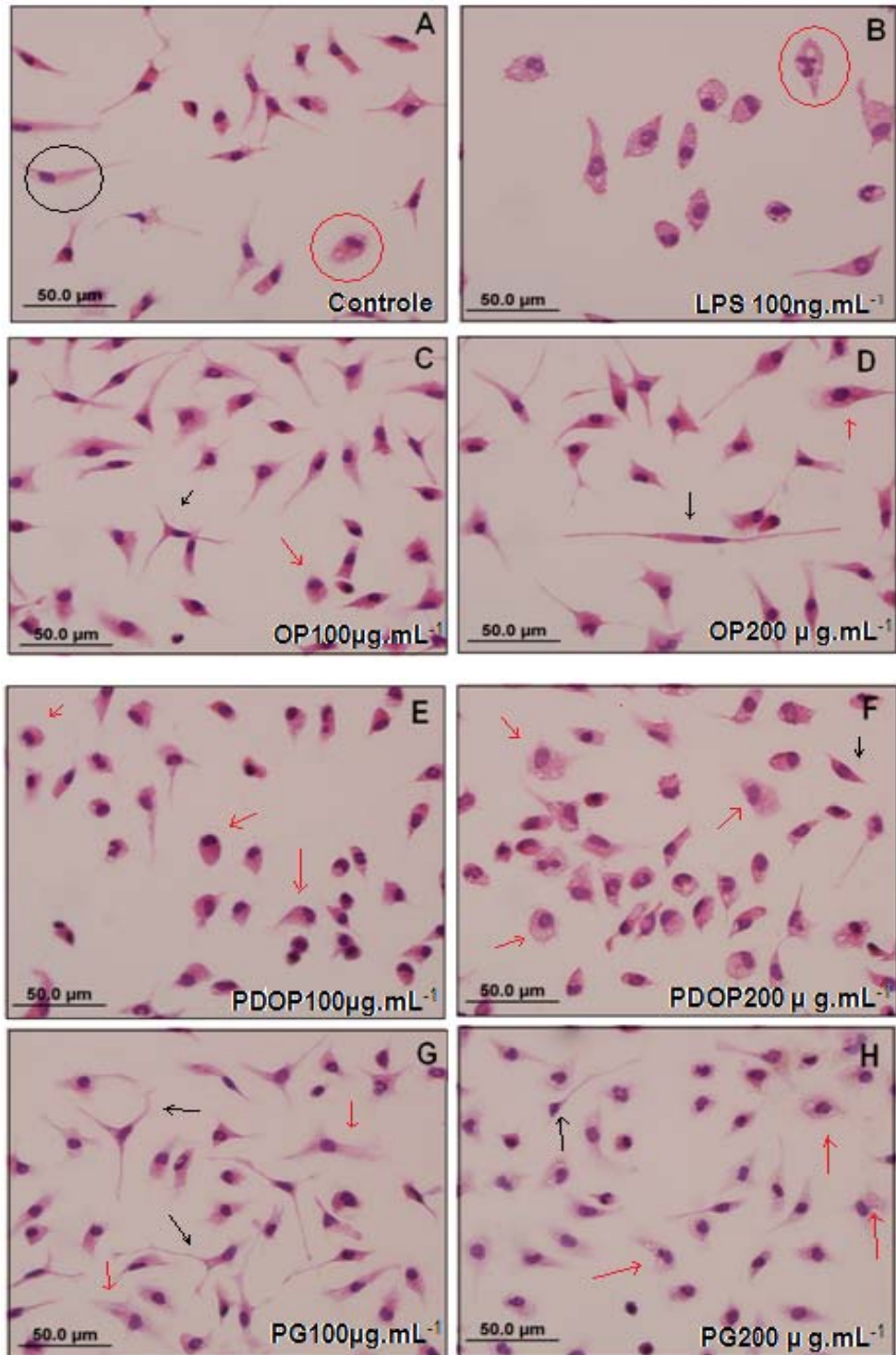


FIGURA 11. ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM OP, PDOP E PG POR 48 HORAS
 FONTE: o autor (2012)

Nota. Micrografias representativas dos tratamentos de macrófagos peritoneais de camundongos com os polissacarídeos OP, PDOP e PG nas concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Após 48 horas de tratamento com os polímeros a 37°C sob 5% de CO_2 , as células foram processadas para microscopia óptica através de coloração com hematoxilina e eosina. Circulos e setas pretos - células com morfologia típica de macrófagos residentes; circulos e setas vermelhos - células com morfologia típica de macrófagos ativados. A) Controle. B) LPS 100 ng.mL^{-1} . C) OP 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. D) OP 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. E) PDOP 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. F) PDOP 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. G) PG 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. H) PG 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Os resultados de ativação, visualizado pela análise da morfologia, evidenciam que a modulação destas células está diretamente relacionada com características estruturais dos polímeros. Onde observa-se que a presença de um “core” comum na estrutura dos polímeros (família de homogalacturonanas) e a desacetilação parcial do polímero têm importância significativa na capacidade de ativar macrófagos. Essa hipótese é confirmada comparando-se os resultados obtidos com as moléculas PG e PDOP. Estes apresentam como semelhança estrutural apenas a região de homogalacturonanas, ambos demonstram perfil mais semelhante de ativação entre si ao se comparar as moléculas OP e PDOP, as quais só diferem na proporção de grupamentos acetil. Com isso tem-se que a retirada em aproximadamente 50% de grupamentos acetil da molécula OP, resultando na molécula PDOP, foi importante para promover o aumento de aproximadamente 47% na ativação de macrófagos peritoneais de camundongos *in vitro*.

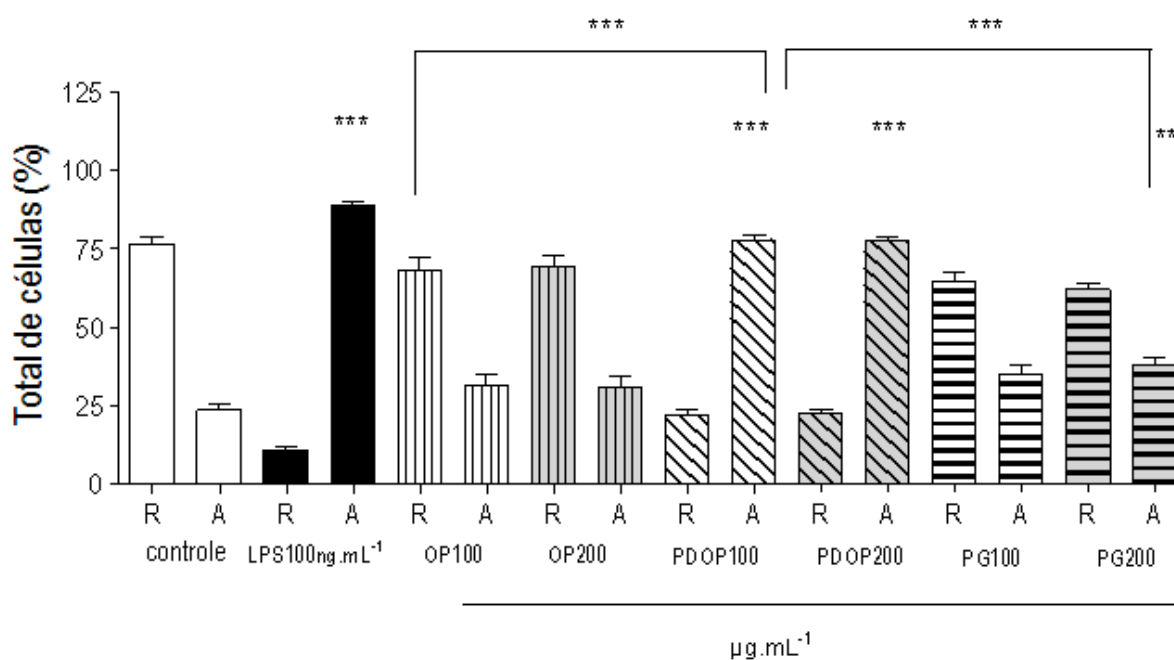


FIGURA 12. DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM OP, PDOP E PG POR 48 HORAS
 FONTE: o autor (2012)

Nota. Resultados obtidos para determinação do perfil de ativação de macrófagos peritoneais de camundongos tratados com os compostos OP, PDOP e PG nas concentrações de 100 e 200 µg.mL⁻¹. Após 48 horas de tratamento a 37 °C sob 5% de CO₂, as células foram coradas com hematoxilina e eosina e a quantificação das alterações morfológicas foi realizada por contagem em microscopia óptica, onde foram contadas 500 células por lamínula. Os resultados estão expressos como média ± DP (n = 3, sendo cada experimento em duplicata). Como controle positivo para ativação celular de macrófagos utilizou-se LPS (100 ng.mL⁻¹). ANOVA de significância ** P < 0,01 e *** P < 0,001 em relação ao controle (células tratadas apenas com meio de cultura) e entre grupos. R, células com morfologia residente; A, células com morfologia ativada.

Confirmado o efeito biomodulador dos polissacarídeos sobre macrófagos peritoneais de camundongos pela análise da morfologia, o estudo foi direcionado para verificar se esses polímeros poderiam modular a atividade fagocítica, produção dos mediadores ânion superóxido e óxido nítrico, além de citocinas.

5.3 Efeitos na atividade fagocítica

Uma das características mais importantes de macrófagos é sua elevada capacidade fagocítica, função essa já presente em macrófagos em estado estacionário - células que migram para sítios em estado não inflamatório - e também em seus precursores, monócitos (GESSMANN *et al.*, 2010).

Para verificar a interferência no processo de fagocitose os macrófagos foram tratados durante 48 horas com os polissacarídeos OP, PDOP e PG nas concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g. mL}^{-1}$. Em seguida os macrófagos foram incubados com leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*, que possui constuição de quitina, α -manana, β -(1 \rightarrow 3) glucanas e β -(1 \rightarrow 6) glucanas) como partículas fagocitantes, na proporção de 10:1 (levedura: macrófagos), os resultados estão representados nas figuras 13 e 14.

Como pode ser observado, nenhum dos polímeros demonstrou estimular a atividade fagocítica de maneira expressiva em relação às células tratadas apenas com meio de cultura. Porém para confirmar esses resultados os experimentos foram quantificados, onde em cada um dos grupos, controle e concentrações dos polissacarídeos, foram contadas 500 células por lamínula, em duplicata, em cada um dos experimentos independentes. Os resultados estão expressos em número de leveduras fagocitadas por macrófago, figura 14.

Pode-se observar na figura 14, que os dados estão em concordância com as micrografias, ou seja, nenhum dos três polímeros interferiu na atividade fagocítica dos macrófagos no tempo e concentrações testados.

O estímulo da atividade fagocítica em células como macrófagos, após tratamento com polissacarídeos de variadas fontes, vem sendo descrito em muitos estudos (MORETÃO *et al.*, 2003; KANGUSSO MARCOLINO, 2010; SILVEIRA, 2010). Entre esses, o tratamento *in vivo* de macrófagos peritoneais durante sete dias com uma α -glucana, isolada do líquen *Ramalina celastri*, na dose de 200 mg. kg^{-1} , demonstrou estimular o aumento da fagocitose de partículas de látex em aproximadamente 70% comparado ao grupo controle (STUELP-CAMPELO *et al.*, 2002).

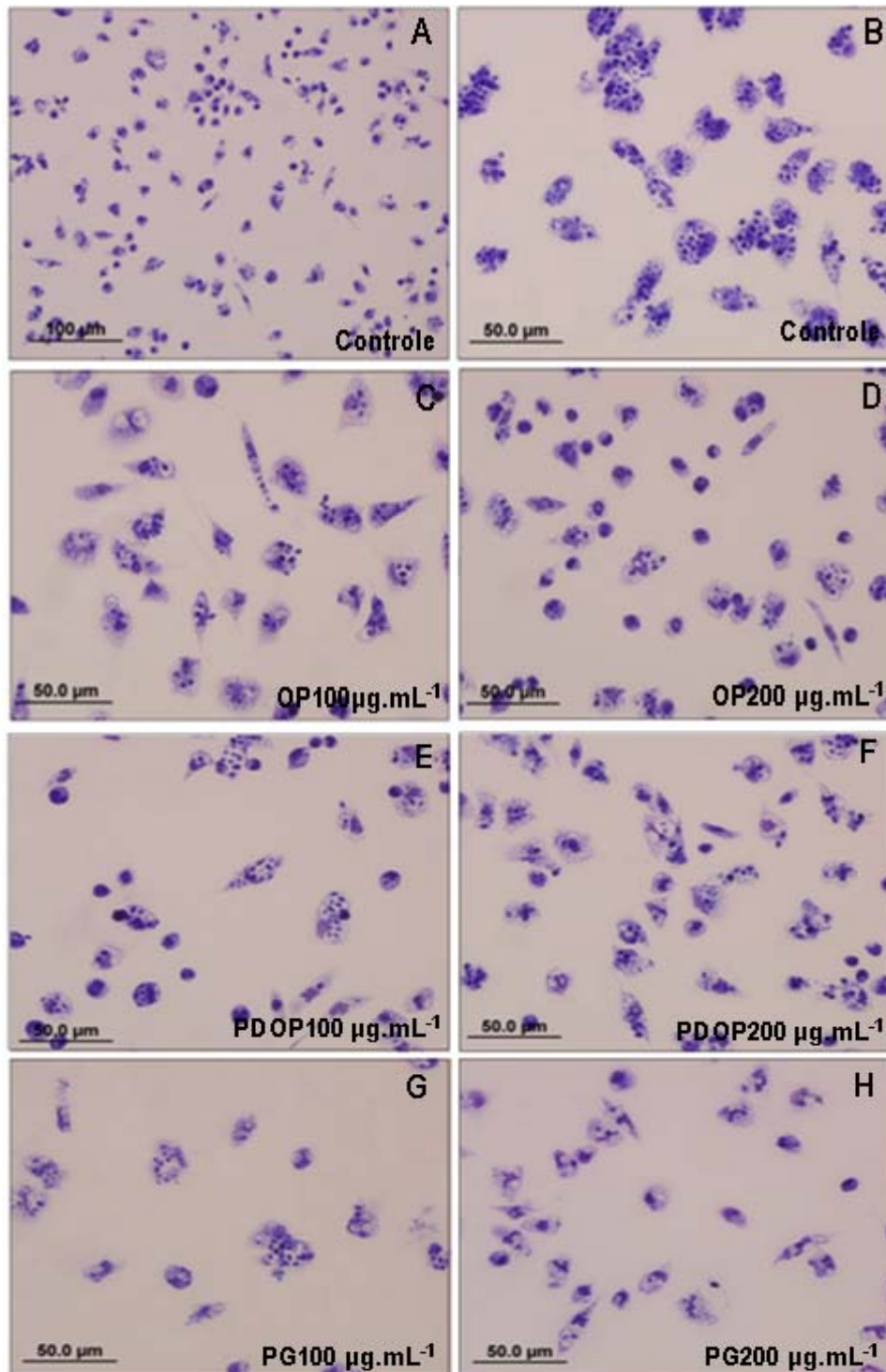


FIGURA 13. ATIVIDADE FAGOCÍTICA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM OP, PDOP E PG POR 48 HORAS

FONTE: o autor, 2012

Nota. Micrografias obtidas de macrófagos peritoneais de camundongos pré-tratados durante 48 horas com os polissacarídeos OP, PDOP e PG nas concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ 37°C sob 5% de CO_2 , seguido de incubação com leveduras na proporção levedura: macrófago (10:1) durante 1 h e processadas para microscopia óptica através de coloração com giemsa. A) Controle em menor aumento. B) Controle. C) OP 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. D) OP 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. E) PDOP 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. F) PDOP 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. G) PG 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. H) PG 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Uma xiloglucana isolada de *Hymenaea courbaril* (jatobá) estimulou em aproximadamente 106% a fagocitose de partículas de leveduras por macrófagos da linhagem RAW 264.7, após tratamento de 24 horas na dose de $0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do polímero, em relação ao controle (células não tratadas) (SILVEIRA, 2010).

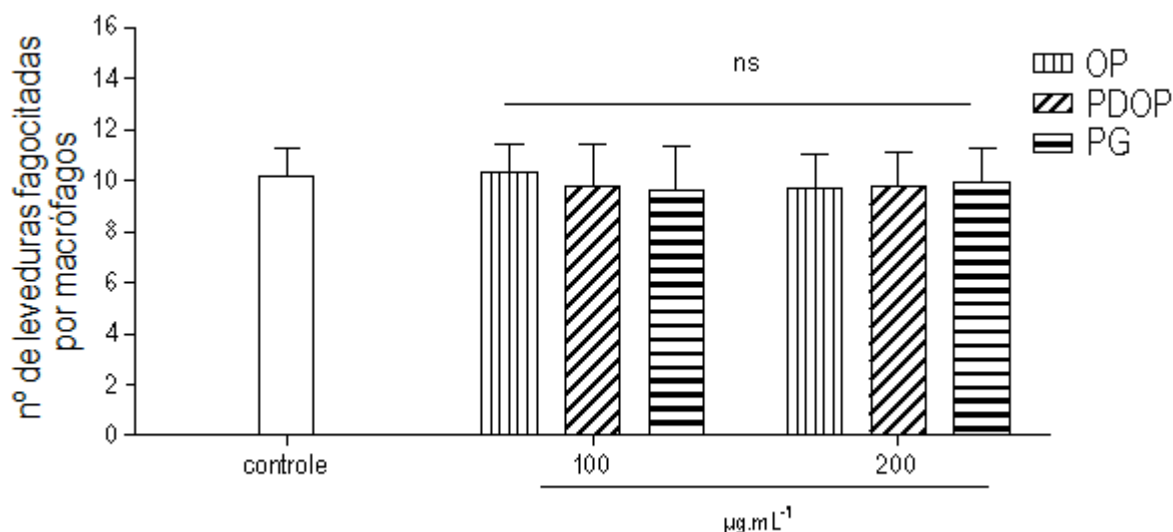


FIGURA 14. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE FAGOCÍTICA EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM OP, PDOP E PG POR 48 HORAS

FONTE: o autor (2012)

Nota. Resultados obtidos para determinação da atividade fagocítica de macrófagos peritoneais de camundongos sobre efeito de OP, PDOP e PG nas concentrações de 100 e $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Após 48 horas de tratamento com os polímeros a 37°C sob 5% de CO_2 , as células foram lavadas com solução de HBSS, posteriormente incubadas com leveduras na proporção de 1: 10, em seguida coradas com giemsa e a quantificação da atividade fagocítica foi realizada por contagem em microscópio óptico, onde foram contadas 500 células por lamínula. Os resultados estão expressos como média \pm DP ($n = 3$, sendo cada experimento em duplicata). ANOVA de significância ns = não significativo em relação ao controle (células tratadas apenas com meio de cultura) e entre grupos com $P > 0,05$.

O tratamento de macrófagos peritoneais de camundongos por 24 horas com uma fração polissacarídica ácida das raízes de *Panax ginseng* (ginseng), a qual é constituída por 43% de ácido galacturônico e 47% dos monossacarídeos glucose e galactose, demonstrou que o polímero, em concentrações de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, foi capaz de estimular a fagocitose de partículas de zimosan (polímero constituído por α -mananas e β -glucanas) em aproximadamente 60% em relação ao grupo controle. Os autores atribuem esse estímulo representativo ao aumento da expressão do receptor CD14, o qual está envolvido com o reconhecimento de partículas de zimosan (SHIN *et al.*, 2002).

Uma galactoglucomanana isolada de sementes de *Leucaena leucocephala* (leucena), e suas formas quimicamente glicosilada e sulfatada foram avaliadas quanto a capacidade de interferir na atividade fagocítica de macrófagos da linhagem RAW 264.7. Os autores observaram um aumento da

fagocitose de partículas de FITC-zimosan de 20, 30 e 40% após tratamento com os polímeros nativo, glicosilado e sulfatado, respectivamente em concentração de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ após uma hora de tratamento (GAMAL-ELDEEN *et al.*, 2007).

Uma galactana sulfatada isolada da alga *Gymnogongrus griffithsiae* em concentrações de 2,5 a $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ não estimulou a fagocitose de partículas de leveduras por macrófagos peritoneais de camundongos tratados com o polímero por período de 48 horas, em condições semelhantes as do presente estudo (KANGUSSU MARCOLINO *et al.*, 2010).

Analisando os importantes efeitos de diferentes polissacarídeos sobre a atividade fagocítica de macrófagos pode-se sugerir que a ativação desse processo pelos polímeros é dependente de características químicas da estrutura peculiar de cada um, que o permitem interagir com determinados receptores de maneira complementar. Além disso, a natureza da partícula fagocitada também pode influenciar na atividade fagocítica.

Eventos que apresentam estreita relação com a atividade fagocítica, apesar de poderem ser desencadeados por vias independentes, são o estímulo do “*burst*” respiratório culminando na produção de intermediários reativos de oxigênio e a via de produção de óxido nítrico.

5.4 Efeitos sobre o “*burst*” oxidativo e na produção de óxido nítrico

As vias de produção de intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio, juntamente com a ativação da fagocitose, representam a barreira mais eficiente na destruição de patógenos por células fagocíticas. Juntas, essas vias culminam na formação de espécies altamente tóxicas que permitem a interdição de infecções por microrganismos antes que os mesmos possam se proliferar, disseminar e oprimir o hospedeiro (BEUTLER, 2004). Os produtos iniciais da ativação de cada via são as espécies reativas ânion superóxido e óxido nítrico, as quais foram quantificadas nesse estudo.

5.4.1 Efeitos na produção de ânion superóxido

Para determinação da ativação da via de produção de ânion superóxido pelos polissacarídeos OP, PDOP e PG utilizou-se do método de redução do citocromo c. Este método se fundamenta na redução extracelular do citocromo c oxidado na presença de ânion superóxido (JOHNSTON; GODZIK; COHN, 1978). Para se garantir que a primeira espécie reativa a ser detectada no meio extracelular

seria o ânion superóxido, resultado da ativação do complexo NADPH oxidase da membrana externa, os polissacarídeos foram incubados juntamente com a solução de citocromo c (BILITEWSKI, 2008).

A produção de ânion superóxido está representada por redução de citocromo c em $\mu\text{mol.L}^{-1}$ por 4.10^5 células, seus resultados foram normalizados utilizando o coeficiente de extinção molar de citocromo c reduzido e oxidado $2,1.10^4 \text{ mol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ e como controle positivo de ativação da via utilizou-se PMA $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Pode-se observar que somente o polímero PG promoveu aumento na produção de ânion superóxido na concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Onde observa-se um estímulo de aproximadamente 60% na produção dessa espécie reativa, quando comparado com os macrófagos na presença somente do meio de reação. Entretanto, as pectinas do cacau não apresentaram-se capazes de estimular a produção de ânion superóxido em níveis superiores aos observados no grupo controle, sem tratamento, demonstrado na figura 15.

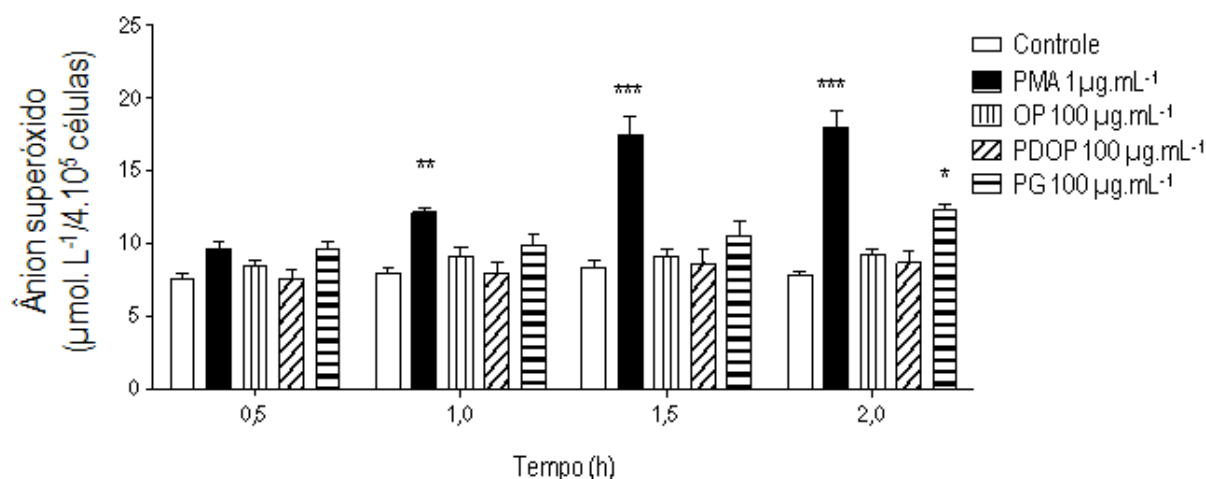


FIGURA 15. QUANTIFICAÇÃO TEMPO DEPENDENTE DOS NÍVEIS DE ÂNION SUPERÓXIDO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM OP, PDOP E PG
 FONTE : o autor (2012)

Nota. Resultados obtidos para quantificação tempo dependente dos níveis de ânion superóxido em macrófagos peritoneais de camundongos tratados com OP, PDOP e PG na concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Após incubação nos tempos determinados, na presença dos polímeros e de citocromo c (concentração de $80 \mu\text{mol.L}^{-1}$), a 37°C sob 5% de CO_2 realizou-se leitura em leitor de microplacas a 550 nm . Como controle positivo de ativação da via de produção de ânion superóxido utilizou-se PMA ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Os resultados estão expressos como média \pm EP ($n = 3$, sendo cada experimento em duplicata), para normalização dos mesmos utilizou-se o coeficiente de extinção molar do citocromo c oxidado/ reduzido de $2,1.10^4 \text{ mol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. ANOVA de significância ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ em relação ao controle (células tratadas com solução de citocromo c).

Após determinado o tempo mais adequado para quantificação do ânion superóxido no presente sistema experimental, os polissacarídeos foram administrados nas doses de 100 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ durante duas horas de tratamento, para se observar a influência da dose na ativação dessa via.

Observou-se que o polímero PG se apresentou capaz de estimular a produção de ânion superóxido com significância, onde foi verificado haver aumento de 60% de produção na dose de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em relação ao controle, figura 16. As pectinas do cacau não apresentaram-se capazes de estimular a produção de ânion superóxido em níveis superiores aos observados no grupo controle.

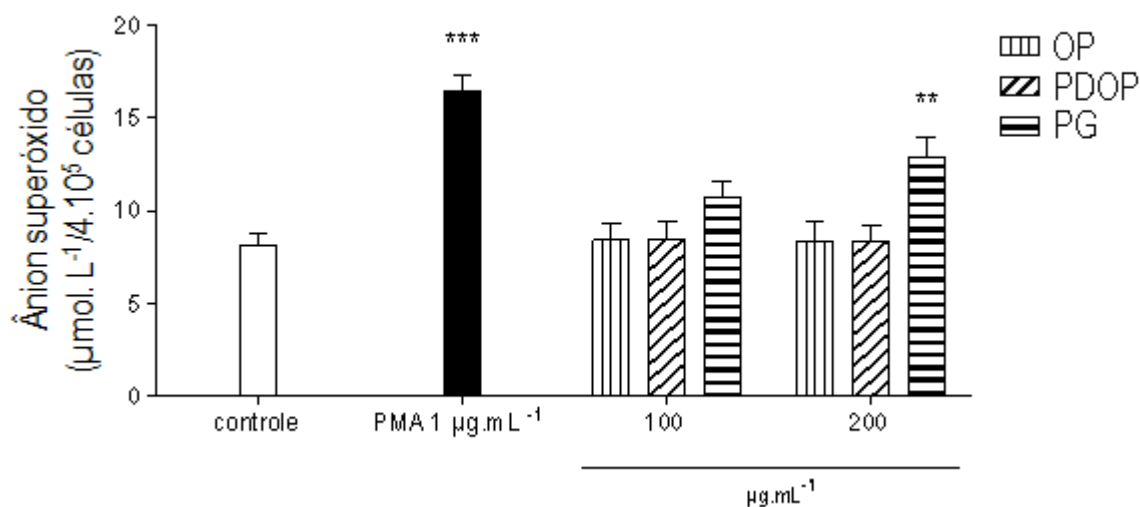


FIGURA 16. QUANTIFICAÇÃO DOSE DEPENDENTE DE ÂNION SUPERÓXIDO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM OP, PDOP E PG POR 2 HORAS

FONTE: o autor (2012)

Nota. Resultados obtidos para quantificação dose dependente de ânion superóxido em macrófagos peritoneais de camundongos tratados com OP, PDOP e PG nas concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Após duas horas de incubação na presença dos polímeros e de citocromo c (concentração de 80 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) a 37 °C sob 5% de CO_2 realizou-se leitura em leitor de microplacas a 550 nm. Como controle positivo de ativação da via de produção de ânion superóxido utilizou-se PMA (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Os resultados estão expressos como média \pm EP (n = 4, sendo cada experimento em triplicata), para normalização dos mesmos utilizou-se o coeficiente de extinção molar do citocromo c oxidado/ reduzido de $2,1.10^4 \text{ mol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. ANOVA de significância ** P < 0,01 e *** P < 0,001 em relação ao controle (células tratadas apenas com solução de citocromo c).

Vale ressaltar as diferenças encontradas para os resultados tempo e dose dependente para produção de ânion superóxido na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Onde observa-se que no ensaio tempo dependente há produção significativa dessa espécie reativa, com valor de aproximadamente 60% de aumento em relação ao controle. No entanto no ensaio dose dependente foi observado que esse resultado apresenta aumento de 32%, não mostra-se significativo em relação ao controle. Contudo deve-se observar a tendência do perfil, que tende a um aumento, levar-se em consideração a

instabilidade da espécie estudada, a qual apresenta meia-vida de aproximadamente um microsegundo (BILITEWSKI, 2008) e também levar-se em consideração a heterogeneidade de respostas de cultura primária de células.

Uma arabinogalactana isolada de *Phyllanthus niruri* (quebra-pedra) estimulou a produção de ânion superóxido. Neste trabalho os autores concluíram que na concentração de 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do polímero, após duas horas de tratamento em macrófagos peritoneais de camundongos, a produção de ânion superóxido aumentou em aproximadamente três vezes comparado ao controle sem tratamento (MELLINGER *et al.*, 2005).

Quatro frações de arabinogalactanas com diferentes massas moleculares obtidas de folhas de *Juniperus scopolorum* foram administradas em macrófagos peritoneais de camundongos por 48 horas e à linhagem J774. A1 durante 24 horas. Todos os polímeros estimularam a produção de EROs de maneira dose-dependente nas concentrações de 25-200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, alcançando valores de aproximadamente três e quatro vezes de aumento em relação ao controle, na maior concentração testada para a fração com maior massa molecular, na linhagem J774. A1 e macrófagos peritoneais, respectivamente. Os autores observaram que a maior intensidade de ativação da via se dava de maneira diretamente proporcional ao aumento da massa molecular dos polímeros (SCHEPETKIN *et al.*, 2005).

Quatro frações de pectina isoladas do caule do cacto *Opuntia polyacantha* demonstraram estimular a produção de EROs em macrófagos murinos da linhagem J774. A1 de maneira dose-dependente. Os autores observaram que o estímulo da produção das espécies reativas foi diretamente proporcional ao aumento da massa molecular dos polímeros. E ainda foi observado que a fração com maior massa molecular e com concentração de 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ demonstrou estimular o aumento da produção de EROs em aproximadamente oito vezes em relação ao controle (SCHEPETKIN *et al.*, 2008).

Uma fração polissacarídica, constituído por arabinose, galactose, glucose, manose, ramnose, xilose, ácido galacturônico e glucurônico, isolada de *Gynostemma pentaphyllum* (uma erva de origem chinesa), demonstrou aumentar, de forma dose-dependente, a produção intracelular de EROs em experimentos *in vivo* e *in vitro*. Os autores observaram que na concentração de 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, a mais alta testada, o polissacarídeo estimulou aumento de aproximadamente 230% na produção dessas espécies reativas, em relação ao controle, nos experimentos *in vitro*. Nos experimentos *in vivo*, com a inoculação intraperitoneal do polímero (100 mg.kg^{-1}) houve aumento de aproximadamente 220% em relação ao controle, sem tratamento (YANG *et al.*, 2008).

Xiloglucanas obtidas de sementes de diferentes espécies não interferiram no “burst” respiratório de macrófagos peritoneais de camundongos, avaliadas em condições semelhantes do presente estudo (ROSÁRIO *et al.*, 2008, 2011).

Como observado nos artigos citados e nos resultados obtidos no presente estudo a ativação do complexo envolvido na produção de ânion superóxido tem relação com características estruturais de cada polímero. Contudo, também se observa a importância de parâmetros como massa molecular na ativação da via, uma vez que em relação aos polímeros do cacau o polímero PG, o qual apresenta menor massa molecular pela ausência da região de RGI, ativou a produção de ânion superóxido em aproximadamente 55%.

5.4.2 Efeitos na produção de óxido nítrico

Outra via de produção de espécies reativas de importância para macrófagos, e através da qual completam sua função microbicida, é a de produção de óxido nítrico. A ativação desta via em macrófagos está relacionada com a atividade da enzima iNOS e mostra-se bastante complexa em seus mecanismos de regulação (LOWENSTEIN *et al.*, 1993, MATSUURA *et al.*, 2003). A ativação dessa enzima pode ser estimulada por diferentes vias de sinalização sob o efeito dos mais variados compostos, como por exemplo IFN γ e LPS (OHLSSON; BERGENFELDT; BJORK, 1988; NATHAN, 1991). Certos polissacarídeos já foram caracterizados como sendo ativadores desta via (JEON *et al.*, 2001; SCHEPETKIN *et al.*, 2005; KAGUSSU MARCOLINO, 2010).

No presente estudo a determinação da ativação da enzima iNOS nos macrófagos foi determinada através da produção de óxido nítrico. Para a quantificação da produção desta espécie reativa utilizou-se o reagente de Griess, que indiretamente quantifica a ativação da via de produção do NO \cdot através da medida de alguns de seus produtos, como o nitrito. Essa técnica se baseia na reação do nitrito, primeiramente com a sulfanilamida em meio ácido para formar um composto intermediário, o sal de diazônio. Em seguida, este sal reage com N-naftiletilenodiamina formando um composto azo estável de coloração púrpura, podendo assim ser quantificado em espectrofotômetro. Esse método é um dos mais indicados para quantificar a produção de óxido nítrico pela ativação de iNOS em macrófagos (TARPEY; WINK; GRISHAM, 2004).

Os resultados de tais experimentos estão apresentados nas figuras 17 e 18, onde a produção de óxido nítrico está representada em nitrito $\mu\text{mol.L}^{-1}$ por 4.10^5 células, seus resultados foram

normalizados utilizando-se coeficientes de concentrações conhecidas de padrão nitrito de sódio e como controle positivo de ativação da via utilizou-se LPS 100 ng.mL⁻¹.

Com a finalidade de verificar o melhor tempo para a ativação da produção de óxido nítrico pelos macrófagos na presença dos polímeros OP, PDOP e PG, experimentos foram elaborados para dosagem em 12, 24 e 48 horas de tratamento (figura 17).

Os resultados mostram que o tempo inicial, nas condições experimentais utilizadas, para a avaliação da produção de óxido nítrico foi de 24 horas, visto que, houve um aumento significativo da produção dessa espécie reativa pelo LPS, composto conhecidamente ativador desta via, utilizado no presente estudo como controle positivo, e também pelo polímero PDOP.

O polímero PDOP no período de 24 horas foi capaz de estimular a produção da espécie reativa em questão em níveis superiores até mesmo aos encontrados pelo LPS. Este polímero atingiu, ainda, aproximadamente 100% de estímulo da produção de NO[•] em relação ao controle no período de 48 horas de tratamento. Por outro lado, os polímeros OP e PG não se mostraram capazes de estimular a via de produção do intermediário reativo de nitrogênio, óxido nítrico, em nenhum dos tempos testados.

Após determinação do melhor tempo para quantificação de óxido nítrico na presente condição experimental as avaliações foram direcionadas a verificar se esta ativação era dependente da concentração dos polissacarídeos. Para tanto, foram utilizadas as concentrações de 100 e 200 µg.mL⁻¹ dos polímeros durante 48 horas de tratamento.

Na figura 18 pode-se observar uma concordância com os resultados apresentados na figura 17, onde apenas o polímero PDOP foi capaz de promover a ativação dessa via em níveis de significância comparado ao controle sem tratamento. Observa-se, ainda, que não houve diferença de intensidade entre as concentrações testadas, uma vez que em ambas o aumento foi de aproximadamente 250%.

A diferença de intensidade de ativação para a concentração de 100 µg.mL⁻¹ de 100% de estímulo de ativação comparado ao controle (figura 17) e de 250% (figura 18) pode ser atribuída a heterogeneidade de respostas observadas para macrófagos obtidos de cultura primária e oriundos de biotério tipo convencional.

Os resultados das análises de GC-MS para detecção de LPS mostraram ausência deste contaminante nas amostras dos polímeros, assim o aumento na produção de óxido nos macrófagos tratados, principalmente com o polímero PDOP, é um efeito do polissacarídeo e não de possível contaminação por LPS.

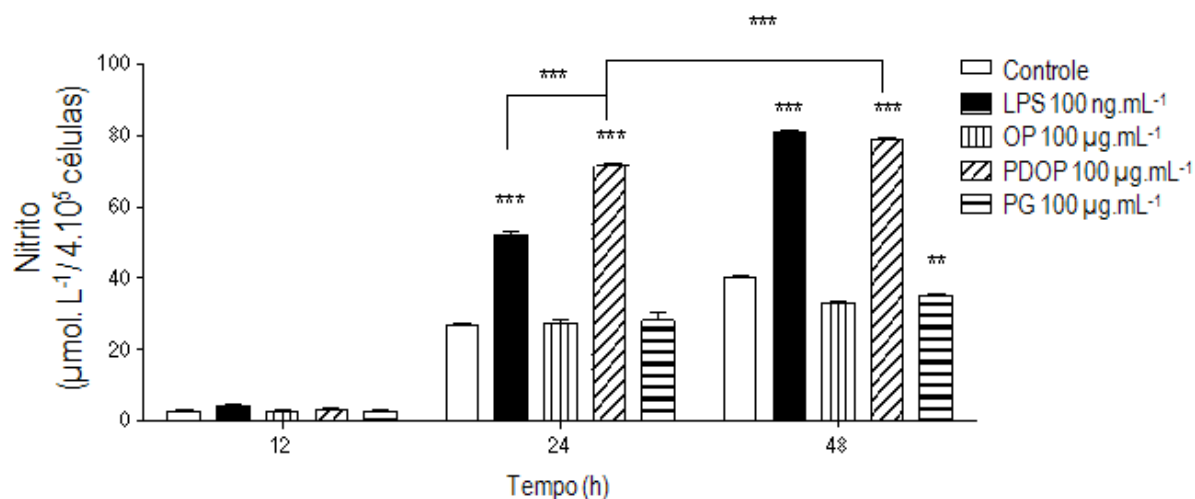


FIGURA 17. QUANTIFICAÇÃO TEMPO DEPENDENTE DOS NÍVEIS DE ÓXIDO NÍTRICO EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM OP, PDOP E PG

FONTE: o autor (2012)

Nota. Resultados obtidos para quantificação dos níveis de óxido nítrico por macrófagos peritoneais de camundongos sobre efeito de OP, PDOP e PG nas concentrações de 100 µg.mL⁻¹. Após os períodos de tratamento com os polímeros a 37°C sob 5% de CO₂, uma alíquota de 100 µL do meio de reação foi misturada a 100 µL do reagente de Griess. Após estabilização da reação por 10 minutos realizou-se leitura em leitor de microplacas a 550 nm. Como controle positivo de ativação da via de produção de óxido nítrico utilizou-se LPS (100 ng.mL⁻¹). Os resultados estão expressos como média ± EP (n = 3, sendo cada experimento em duplicata), para normalização dos mesmos utilizou-se coeficientes de soluções de padrão de nitrito de sódio. ANOVA de significância ** P < 0,01 e *** P < 0,001 em comparação com o controle (células tratadas apenas com meio de cultura) e entre grupos.

Comportamento semelhante aos observados para as moléculas OP e PG foram obtidos para duas pectinas isoladas de raízes de *Vernonia kotschyana* (uma planta herbácea originária do continente africano). Onde concentrações de até 500 µg.mL⁻¹ dos polímeros não estimularam a produção de óxido nítrico em macrófagos humanos em período de 24 horas de exposição (NERGARD *et al.*, 2005). Da mesma forma, outras duas frações de pectinas isoladas de *Glinus oppositifolius*, a primeira constituída de arabinogalactanas tipo I e II e a outra rica em ácido galaturônico não estimularam a via de produção de óxido nítrico em concentrações de até 500 µg.mL⁻¹ (INNGJERDINGEN *et al.*, 2005).

Assim como a fração PDOP, pectinas de outras fontes promoveram estímulo da secreção de óxido nítrico. Pectinas isoladas de flores de *Tanacetum vulgare* (catinga-de-mulata), em concentrações variando entre 200 a 1600 µg.mL⁻¹, apresentaram-se capazes de estimular a produção de óxido nítrico em macrófagos J774. A1 em 24 horas de incubação. Onde observou-se padrão dose-dependente de resposta, em níveis comparáveis ao controle positivo por LPS 50 ng.mL⁻¹, com produção de aproximadamente 6 µmol.L⁻¹ de nitrito (XIE; SCHEPETKIN; QUINN, 2007).

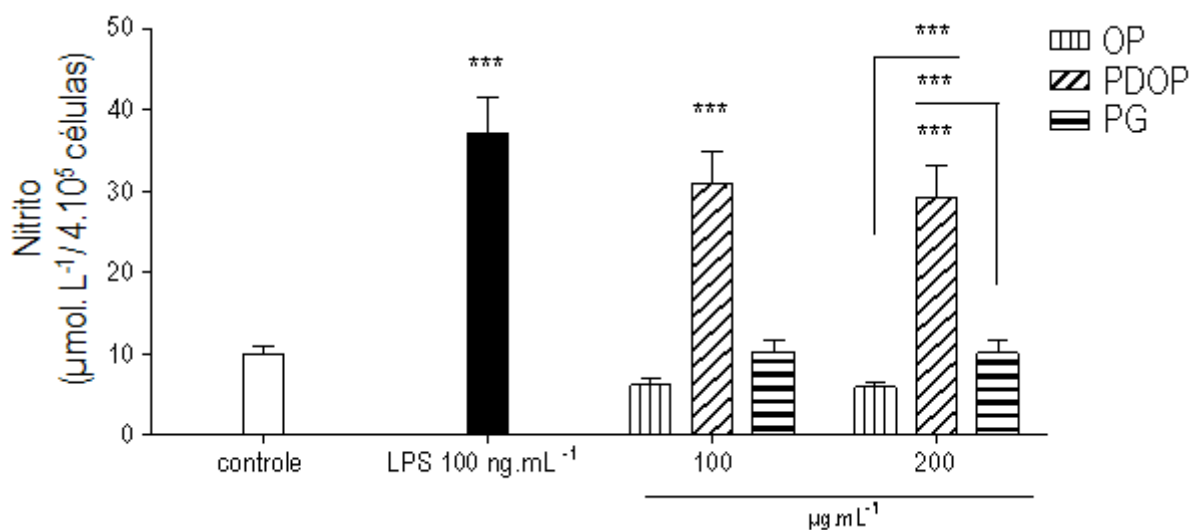


FIGURA 18. QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM OP, PDOP E PG POR 48 HORAS

FONTE: o autor (2012)

Nota. Resultados obtidos para produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais de camundongos sobre efeito de OP, PDOP e PG nas concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Após 48 horas de tratamento com os polímeros a 37 °C sob 5% de CO_2 , uma alíquota de 100 μL do meio de reação foi misturada a 100 μL do reagente de Griess. Após estabilizar a reação por 10 minutos, realizou-se a leitura em leitor de microplacas a 550 nm. Como controle positivo de ativação da via de produção de óxido nítrico utilizou-se LPS (100 ng.mL^{-1}). Os resultados estão expressos como média \pm EP (n = 4, sendo cada experimento em triplicata), para normalização dos mesmos utilizou-se coeficientes de solução do padrão de nitrito de sódio. ANOVA de significância *** $P < 0,001$ em comparação ao controle (células tratadas apenas com meio de cultura) e entre grupos.

Uma pectina isolada de flores de *Nerium indicum* (uma árvore de pequeno porte originária da Ásia) apresentou-se como potente estimuladora da secreção de óxido nítrico em macrófagos RAW 264.7, num período de 24 horas de exposição. Concentrações entre 31,25 a 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do polímero alcançaram níveis de estímulo de produção de óxido nítrico comparáveis ao controle positivo de LPS 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, onde foi produzido aproximadamente 45 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de nitrito (DONG *et al.*, 2010).

Estudo com seis frações de polissacarídeos pécticos isolados das folhas de *Opilia celtidifolia* (uma árvore de grande porte originária do continente africano) estimularam a via de produção de óxido nítrico em macrófagos R2 de Wistar. Todas as frações com massa molecular variável, apresentaram alto potencial de estimular a produção de óxido nítrico e os valores exibiram um comportamento dose-dependente de produção para todas as frações, cujas intensidades foram comparáveis a ativação por LPS 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, com aproximadamente 8 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de nitrito (TOGOLA, *et al.*, 2008).

Tendo em vista que a retirada de aproximadamente 50% de grupamentos acetil da molécula OP, resultando na molécula PDOP propiciou um aumento de aproximadamente 250% na produção de óxido nítrico. Os resultados obtidos sugerem que as características particulares dos polímeros, como

porcentagem de grupos acetil, está diretamente envolvida na ativação de macrófagos peritoneais de camundongos para a produção de óxido nítrico.

Além de serem células executoras de funções de proteção, os macrófagos também são importantes como células reguladoras de várias funções de outras células, para tanto secretam vários mediadores de sinalização, entre eles citocinas.

5.5 Efeitos na produção das citocinas IL-10, IL-12 e TNF-alfa

As interleucinas possuem tempos de meia-vida variando de horas até dias (BURKE; LEWIS, 2002). Desta forma, por vezes não é possível quantificar várias destas moléculas em um mesmo tempo de tratamento. Além disso, é possível que as condições experimentais das avaliações também possam interferir na integridade destes mediadores e, conseqüentemente, nas quantificações.

Neste trabalho os níveis das citocinas avaliadas foram determinados no sobrenadante de macrófagos peritoneais de camundongos após tratamento com os polissacarídeos no tempo de 6 horas para o TNF-alfa e 48 horas para IL-10 e IL-12, utilizando o ensaio imunosorvente ligado a enzima.

O ELISA (do inglês *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), é um dos métodos mais bem estabelecidos para quantificação de produtos em sobrenadantes de cultura de células, mostrando-se, ainda, o mais adequado quando necessária alta sensibilidade na técnica. Este ensaio emprega um anticorpo específico, para captura de determinada citocina, ligado a placa. Após a ligação da citocina de interesse ao anticorpo de captura é utilizado anticorpo biotilado de detecção, o qual reconhece o complexo citocina-anticorpo de captura. Seguido a esse evento a reação é ampliada pela conjugação do anticorpo secundário estreptavidina-HRP, que na presença do substrato da enzima peroxidase, tetrametilbenzidina (TMB), revela a reação (RAYBIOTECH, 2011).

A produção das citocinas IL-10, IL-12 e TNF-alfa está representada em pg.mL⁻¹ de produto por 4.10⁵ células. A concentração de cada citocina foi determinada através de uma curva padrão específica. LPS 100 ng.mL⁻¹ foi utilizado como controle positivo de ativação das vias avaliadas.

5.5.1 Efeitos na produção de IL-10

Atualmente sabe-se que a habilidade de produzir interleucina-10 não está limitada aos subtipos de linfócitos T, mas também a uma gama de outras células, entre as quais se encontram monócitos e

macrófagos, células que podem ser ativadas para produção dessa citocina tanto por mediadores endógenos quanto exógenos (WOLK *et al.*, 2002; SABAT *et al.*, 2010).

Para verificar se os compostos OP, PDOP e PG poderiam atuar como mediadores de estímulo da produção de IL-10, macrófagos foram tratados com os polímeros nas concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ pelo período de 48 horas.

Observa-se, na figura 19, que a pectina naturalmente acilada (OP) promoveu aumento significativo de 10% na produção de IL-10 apenas na concentração de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, quando comparado ao controle (macrófagos tratados apenas com meio de cultura).

O tratamento com o polissacarídeo parcialmente desacetilado, polímero PDOP, apresentou aumento significativo na produção de interleucina-10 de 140% e 165% nas concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, demonstrando que a modulação dessa via por esse polissacarídeo é um evento dose-dependente.

A pectina homogaturonato apresentou comportamento semelhante ao polímero OP estimulando em aproximadamente 12% a produção de IL-10 apenas na concentração de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, comparado ao controle tratado com meio.

Os efeitos de polissacarídeos sobre macrófagos para a produção de IL-10 tem sido variados, mesmo dentro de uma mesma classe de polímeros. Uma pectina, composta em sua maioria por uma região linear de ácido galacturônico, isolada de rizomas de *Acorus calamus* (cálamo-aromático) demonstrou não estimular a produção da interleucina-10 em macrófagos peritoneais de camundongos, em relação ao controle, na concentração de 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ durante 24 horas de tratamento (BELSKA *et al.*, 2010).

Uma pectina isolada de talos de *Apium graveolens* (aipo) aumentou em 40% a sobrevivência de camundongos tratados com dose letal de 50 mg.kg^{-1} de LPS. Os autores sugerem que esse resultado se deve ao aumento, em aproximadamente 45%, na produção de interleucina-10 após a administração por via oral de 50 mg.kg^{-1} da pectina (OVODOVA *et al.*, 2009). De forma semelhante outra pectina extraída de *Capsicum annum* (pimentão), administrada oralmente na concentração de 50 mg.kg^{-1} no tempo de tratamento de 48 horas, estimulou a produção de IL-10 em aproximadamente 100% em relação ao controle. Os autores sugerem que o estímulo na produção de IL-10 foi responsável pelo aumento na sobrevivência de camundongos em aproximadamente 40% comparado ao controle, sem tratamento (POPOV *et al.*, 2010).

Uma arabinogalactana isolada de *Anadenanthera colubrina* (angico branco), uma galactomanana isolada de *Mimosa scabrella* (bracatinga) e uma xiloglucana isolada de *Hymenaea*

courbaril (jatobá), nas concentrações de 10 e 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, não estimularam macrófagos peritoneais a produzirem IL-10 em 48 horas de tratamento (AMARAL, 2011).

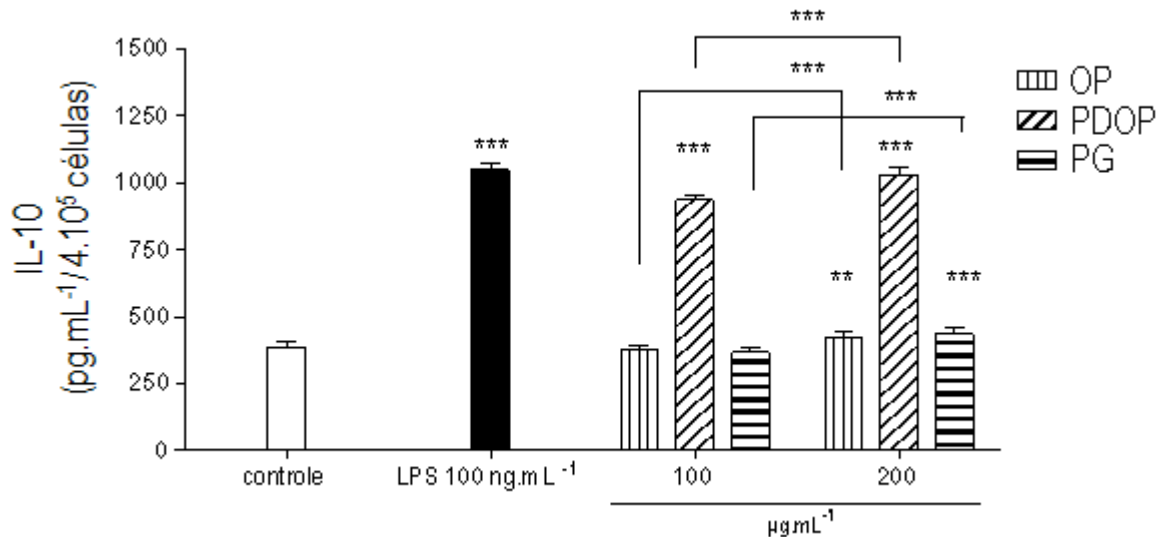


FIGURA 19. QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE IL-10 EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM OP, PDOP E PG POR 48 HORAS

FONTE: o autor (2012)

Nota. Resultados obtidos para os níveis de produção de IL-10 em macrófagos peritoneais de camundongos sobre efeito dos polímeros OP, PDOP e PG nas concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Após 48 horas de tratamento com os polímeros a 37 °C sob 5% de CO_2 , uma alíquota de 100 μL do meio de reação foi retirada para quantificação de IL-10 por ELISA, segundo especificações do fabricante. Como controle positivo de ativação da via de produção de IL-10 utilizou-se LPS (100 ng. mL^{-1}). Os resultados estão expressos como média \pm DP (n = 5, sendo cada experimento em duplicata), para normalização dos mesmos utilizou-se os coeficientes da solução padrão da citocina IL-10. ANOVA de significância ** P < 0,01 e *** P < 0,001 em relação ao controle (células tratadas apenas com meio de cultura) e entre grupos.

De maneira geral a via de produção de interleucina-10, estimulada pelos polissacarídeos de estudo, parece estar relacionada com características estruturais comuns as três pectinas, como a estrutura linear de homogalacturonanas. Contudo, deve-se observar a expressiva produção de IL-10 após a desacetilação parcial do OP, originando o polímero PDOP, onde observa-se um aumento de aproximadamente 155% na ativação da via.

5.5.2 Efeitos na produção de IL - 12

A síntese de interleucina-12 tem papel essencial na ligação entre a resposta inata e a adquirida (COLOMBO; TRINCHIERI, 2002). Ao contrário de IL-12p35, que é produzida por grande diversidade de células e expressa de maneira constitutiva, a síntese de IL-12p40 e IL-12p70 é limitada a linhagem de

células apresentadoras de antígenos, como macrófagos, e expressa somente quando essas células são ativadas (TRINCHIERI, 1995, 1998).

Na figura 20 estão apresentados os resultados dos tratamentos de macrófagos peritoneais, durante o período de 48 horas com os polímeros OP, PDOP e PG nas concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, para quantificação da produção de IL-12.

Observa-se que a pectina OP não apresentou estímulo significativo na produção de IL-12, a níveis superiores aos evidenciados no grupo controle, nas duas concentrações testadas. Ao contrário, o tratamento com o polímero PDOP promoveu aumento de aproximadamente 70 e 95% nas concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente em relação ao controle. Onde uma diferença de produção de aproximadamente 30 pg.mL^{-1} entre as doses, indica um perfil dose-dependente para estimulação de IL-12.

Os resultados do tratamento de macrófagos com o polissacarídeo PG mostram que em ambas as concentrações (100 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) a intensidade de estímulo de produção de IL-12 foi similar, alcançando aproximadamente 30% de aumento em relação ao controle.

Estudos demonstrando a produção de IL-12 por macrófagos na presença de pectinas ainda não foram descritos na literatura, até o momento, mas para outras classes de polissacarídeos de plantas este efeito já foi observado.

Frações de arabinogalactanas, com diferentes massas moleculares, obtidas de folhas de *Juniperus scopolorum*, foram testadas quanto ao estímulo de produção de IL-12 na linhagem de macrófagos J774. A1. O estudo mostrou que após 24 horas de tratamento, na concentração de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, apenas as frações com maiores massas moleculares foram capazes de estimular a produção dessa citocina com significância em relação ao controle, onde observou-se aumento de aproximadamente 12 vezes na produção IL-12 (SCHEPETKIN *et al.*, 2005).

Uma glucoarabinogalactana isolada de *Glycyrrhiza uralensis* (uma herbácea originada da Ásia) demonstrou estimular a produção de IL-12 de maneira dose-tempo-dependente em macrófagos peritoneais de camundongos. Na dose de 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 72 horas o polímero demonstrou aumento de aproximadamente três vezes na produção dessa citocina em relação ao controle (CHENG *et al.*, 2008).

Diante dos resultados obtidos no presente estudo observa-se que a produção da citocina IL-12, desencadeada pelos polissacarídeos estudados, está relacionada com a região linear dos polímeros. Uma vez que os polímeros PDOP e PG exibiram maior intensidade na produção desta citocina. Enquanto que o polímero OP, o qual apresenta alto grau de acetilação, foi menos eficaz na ativação da mesma.

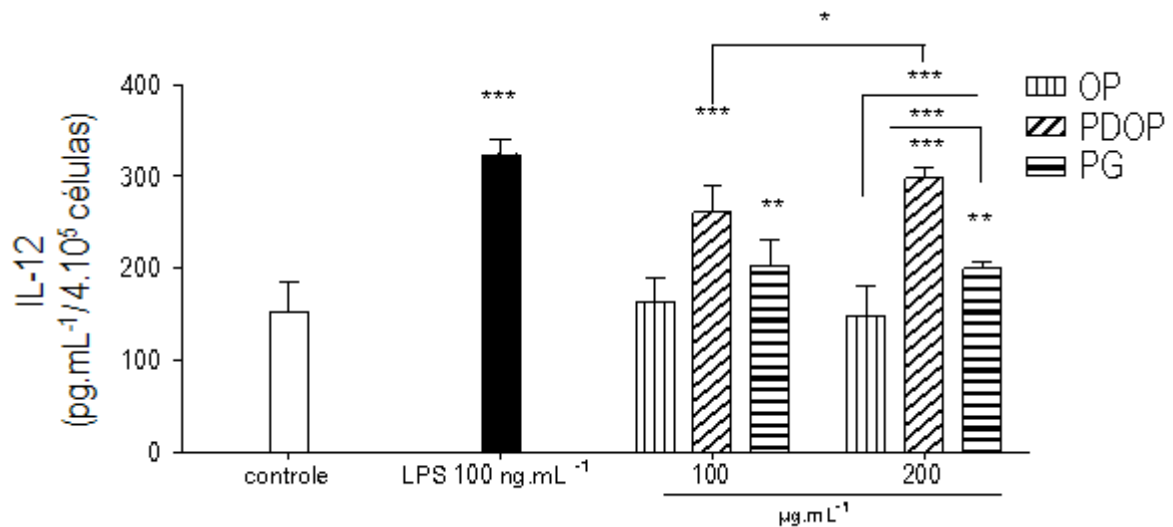


FIGURA 20. QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE IL-12 EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM OP, PDOP E PG POR 48 HORAS

FONTE: o autor (2012)

Nota. Resultados obtidos para os níveis de detecção de IL-12 em macrófagos peritoneais de camundongos sobre efeito dos polímeros OP, PDOP e PG nas concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g. mL}^{-1}$. Após 48 horas de tratamento com os polímeros a 37 °C sob 5% de CO_2 , uma alíquota de 100 μL do meio de reação foi retirada para quantificação de IL-12 por ELISA, segundo especificações do fabricante. Como controle positivo de ativação da via de produção de IL-12 utilizou-se LPS (100 ng. mL^{-1}). Os resultados estão expressos como média \pm DP ($n = 5$, sendo cada experimento em duplicata), para normalização dos mesmos utilizou-se os coeficientes da solução padrão da citocina IL-12. ANOVA de significância * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ em relação ao controle (células tratadas apenas com meio de cultura) e entre grupos.

5.5.3 Efeitos na produção de TNF-alfa.

A citocina TNF-alfa apresenta múltiplos papéis metabólicos. Contudo, quando produzida por macrófagos tem ação direta como molécula tumoricida, atração de outras células do sistema imune para sítios de vigília e também na modulação da produção de outros coadjuvantes e mediadores inflamatórios, como moléculas de adesão, outras citocinas e expressão de enzimas produtoras de espécies reativas (BAUGH; BUCALA, 2001; CAMINERO; COMABELLA; MONTALBAN, 2011).

Para quantificação dos níveis de TNF-alfa optou-se por realizar o tratamento no período de seis horas, condição determinada em trabalhos anteriores do grupo como sendo melhor tempo de tratamento para a quantificação desta citocina nas condições experimentais utilizadas.

Na figura 21 observa-se que os polímeros OP e PG não estimularam a produção de TNF-alfa em relação ao controle sem tratamento. No entanto, com o tratamento dos macrófagos com o polímero PDOP observou-se aumento na produção de TNF-alfa em aproximadamente 60 e 87% nas

concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. A diferença de intensidade de aproximadamente 50 pg.mL^{-1} , entre os tratamentos, indica um efeito dose-dependente de estímulo.

Três frações de mananas acetiladas, com diferentes massas moleculares, isoladas das folhas de *Aloe vera* (babosa) estimularam a produção de TNF-alfa tanto *in vitro* quanto *in vivo* em macrófagos peritoneais de camundongos. Os autores observaram que nas avaliações *in vitro*, após 48 horas de tratamento e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de concentração do polímero, os polissacarídeos foram capazes de estimular a produção de TNF-alfa em aproximadamente 1000 vezes comparado ao controle não tratado. Para o tratamento *in vivo* na mesma concentração do experimento *in vitro*, após uma hora e meia de administração dos polímeros, esse aumento foi de aproximadamente 700 vezes. Os autores destacam que as maiores intensidades de estímulo observadas foram desencadeadas pelo polímero com maior massa molecular (LEUNG *et al.*, 2004).

Uma fração polissacarídica extraída de rizomas de *Curcuma zedoaria* (zedoária), contendo 41% de açúcares neutros (sendo esses Rha, Fuc, Ara, Xyl, Man, Gal e Glc), 3,6% de ácido urônico e 20% de proteínas, foi descrita como potente ativadora na produção de TNF-alfa na linhagem RAW 264.7 após 24 horas de tratamento. Os autores observaram efeito dose-dependente alcançando intensidade de até 2500 vezes na concentração de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ da fração (KIM *et al.*, 2001).

Uma galactoglucomanana isolada de sementes de *Leucaena leucocephala* (leucena), e suas formas quimicamente glicosilada e sulfatada foram avaliadas quanto a capacidade de estimular a produção de TNF-alfa na linhagem RAW 264.7 após 24 horas de tratamento. Nesse estudo foi observado que a galactoglucomanana nativa e sua forma glicosilada não apresentam qualquer estímulo na produção de TNF-alfa. No entanto, o polímero sulfatado (10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) promoveu um estímulo com intensidade cinco vezes maior ao quantificado para os macrófagos controle, sem tratamento (GAMAL-ELDEEN *et al.*, 2007).

Uma fração polissacarídica isolada de raízes de *Bupleurum smithii* (uma herbácea tradicional na medicina chinesa) composta por 75% de carboidratos, sendo que desses aproximadamente 42% são ácido urônico e a composição monossacarídica constituída por arabinose, galactose, glucose e ramnose, foi administrada por via intragástrica em camundongos nas doses de 20, 40 e 80 $\text{mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ durante 6 dias. Após tratamento os autores não observaram aumento na produção de TNF-alfa em níveis superiores aos observados no grupo controle. No entanto quando se realizou tratamento, nas mesmas condições estabelecidas anteriormente, porém com as células tratadas previamente com LPS 1 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ durante 24 horas, os polissacarídeos inibiram os produtos induzidos pela toxina, entre esses TNF-alfa (CHENG *et al.*, 2010).

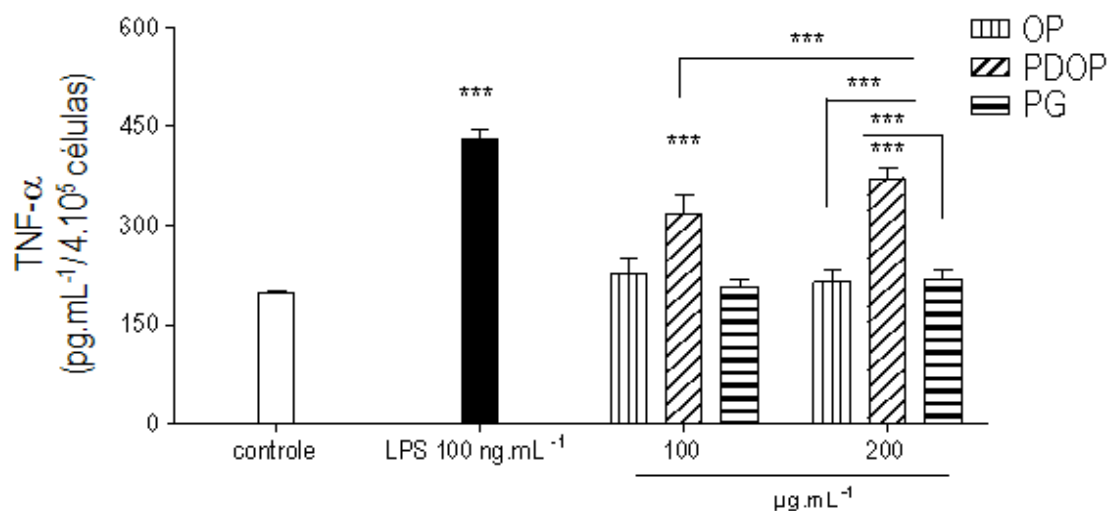


FIGURA 21. QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE TNF-ALFA POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM OP, PDOP E PG POR 6 HORAS

FONTE: o autor (2012)

Nota. Resultados obtidos para produção de TNF-alfa por macrófagos peritoneais de camundongos sobre efeito dos polímeros OP, PDOP e PG nas concentrações de 100 e 200 µg. mL⁻¹. Após 6 horas de tratamento com os polímeros a 37 °C sob 5% de CO₂, uma alíquota de 100 µL do meio de reação foi retirada para quantificação de TNF-alfa por ELISA, segundo especificações do fabricante. Como controle positivo de ativação da via de produção de TNF-alfa utilizou-se LPS (100 ng.mL⁻¹). Os resultados estão expressos como média ± DP (n = 3, sendo cada experimento em duplicata), para normalização dos mesmos utilizou-se os coeficientes da solução padrão da citocina TNF-alfa. ANOVA de significância *** P < 0,001 em relação ao controle (células tratadas apenas com meio de cultura) e entre grupos.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que a produção da citocina TNF-alfa por macrófagos, estimulados pelas pectinas, assim como para as outras citocinas avaliadas parece estar relacionada com características estruturais de cada polímero. Isso pode ser evidenciado tendo-se em vista que a remoção parcial dos grupamentos acetil do polímero nativo (OP), originando o polímero PDOP, proporcionou aumento de aproximadamente 80% na produção de TNF-alfa na maior concentração testada (200 µg. mL⁻¹). Os polissacarídeos OP e PG, nas mesmas condições, não foram capazes de estimular a produção desta citocina, em relação ao controle não tratado.

6. DISCUSSÃO FINAL

Polissacarídeos vem recebendo atenção na aplicação terapêutica, principalmente por agirem como imunomoduladores (TZIANABOS, 2000; LEUNG *et al.*, 2006; SCHEPETKIN; QUINN, 2006). Neste contexto, esse trabalho foi motivado pela relevância em se estudar o efeito imunomodulador das pectinas da casca dos frutos do cacau, utilizando as forma nativas e parcialmente desacetilada, e do polímero poligalacturonato em macrófagos e, ainda, correlacionar os efeitos observados com parâmetros estruturais destes polímeros. O resumo dos resultados está representado na tabela 4, para melhor visualização.

TABELA 4. RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS NOS EXPERIMENTOS DE MODULAÇÃO DAS ATIVIDADES EM MACRÓFAGOS PELAS PECTINAS OP, PDOP E PG

Perfil em porcentagem (%) em relação ao controle								
polímero	Concentração	Ativação celular	fagocitose	O ₂ ^{•-}	NO [•]	IL-10	IL-12	TNF- α
OP	100 μ g.mL ⁻¹	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	200 μ g.mL ⁻¹	ns	ns	ns	ns	↑10%**	ns	ns
PDOP	100 μ g.mL ⁻¹	↑77%***	ns	ns	↑250%***	↑140%***	↑70%***	↑60%***
	200 μ g.mL ⁻¹	↑77%***	ns	ns	↑250%***	↑165%***	↑95%***	↑87%***
PG	100 μ g.mL ⁻¹	ns	ns	ns	ns	ns	↑30%**	ns
	200 μ g.mL ⁻¹	↑40%**	ns	↑60%**	ns	↑12%***	↑30%**	ns

FONTE: o autor (2012)

Nota. ANOVA de significância ** <0,01 e *** <0,001 em relação ao controle (células tratadas somente com meio de cultura ou com solução de citocromo c - nos experimentos de dosagem de ânion superóxido).

O polímero OP, pectina naturalmente acetilada, não promoveu alterações morfológicas expressivas nas células, as quais permaneceram com perfil de células residentes (figuras 11 e 12). Essa característica foi acompanhada por um aumento significativo da produção de IL-10 (figura 19). Esses resultados são condizentes uma vez que essa citocina é uma desativadora das funções de macrófagos e, portanto, de suas características morfológicas de célula ativada (BOGDAN, VODOVOTZ; NATHAN, 1991; DOBROVOLSKAIA; VOGEL, 2002).

Tendo em vista que o polímero OP não estimulou nenhuma das outras vias avaliadas (figuras 13-18, 20 e 21), sugere-se que o mesmo pode atuar como uma potencial molécula para futuras aplicações como veículo de medicamentos, ainda mais relevante quando a supressão de respostas inflamatórias é desejada. Contudo, ressalta-se a necessidade de ampliação de estudos para caracterizar este polissacarídeo como possível agente imunoregulador de funções de macrófagos, como ensaios *in vivo*.

Estudo com pectinas comerciais de citrus, com diferentes graus de esterificação (DE), realizado por Salman e colaboradores (2008), observou que o aumento de DE dos polímeros está diretamente relacionado ao aumento proporcional do estímulo de mediadores anti-inflamatórios como IL-1 α e IL-10 em monócitos (SALMAN *et al.*, 2008). De maneira semelhante estudos com pectinas também de citrus com diferentes graus de esterificação descrevem a ação anti-inflamatória desses polímeros através da inibição da expressão de iNOS e COX-2 em macrófagos ativados com LPS (CHEN *et al.*, 2006).

No presente estudo a molécula PDOP promoveu alterações morfológicas expressivas em macrófagos, onde as células passaram a ter características de células no estado ativado (figuras 11 e 12). Essas alterações estão em concordância com o intenso aumento na produção dos mediadores óxido nítrico, IL-10, IL-12 e TNF- α (tabela 4). A intensidade dos efeitos estimulados por PDOP foi superior aos observados pelos polímeros OP e PG, e semelhante aos desencadeados pela molécula LPS, representados nas figuras 17-21.

A via do “burst” respiratório sofreu estímulo significativo (60%) apenas com o tratamento com o polímero PG (figuras 15 e 16). Observa-se que a intensidade de efeito exibido pelo polímero PG, em relação a ativação celular, produção de IL-10 e IL-12, foi respectivamente de aproximadamente 2, 14 e 3 vezes menor comparado ao efeito estimulado pelo polímero PDOP, nas mesmas condições (tabela 4).

A propriedade de estimular mediadores pró e anti-inflamatórios não é comum entre os polissacarídeos de plantas, porém Schepetkin e colaboradores (2005), trabalhando com frações de arabinogalactanas isoladas de *Juniperus scopolorum*, verificaram aumento nos níveis de TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-12 (citocinas pró-inflamatórias) e da citocina anti-inflamatória interleucina-10 em macrófagos J774. A1 (SCHEPETKIN *et al.*, 2005).

Efeito imunomodulador em pectina com estrutura composta por homogalacturonanas, inserção de ramnogalacturonanas I e, ainda, apresentando-se com elevado grau de acetilação foi observado em polímero isolado de *Centella asiatica*. Neste trabalho, os autores, observaram estímulo da proliferação de células B e T com a estrutura nativa do polímero e, após desacetilação parcial da estrutura do mesmo, observaram proliferação ainda mais expressiva de células B (WANG; LUI; FANG, 2005). Outra pectina naturalmente acetilada, isolada de *Dendrobium nobile*, exibiu comportamento semelhante ao anteriormente descrito. Após a remoção parcial de grupamentos acetil o polímero tornou-se mais potente ativador da proliferação de linfócitos B quando comparado à molécula nativa (WANG; LUO; ZHA, 2010). Em ambos os trabalhos os autores sugerem que o conteúdo de grupamentos acetil é

essencial para os efeitos observados (WANG; LUI; FANG, 2005; WANG; LUO; ZHA, 2010). Os resultados observados no presente estudo reforçam estas proposições, uma vez que o polímero OP, contendo alto grau de acetilação, foi menos eficaz na estimulação de certas vias de macrófagos quando comparado com seu respectivo polímero parcialmente desacetilado (PDOP).

Outra via de significativa importância para as funções de macrófagos, também avaliada neste estudo, foi a atividade fagocítica. Os três polímeros (OP, PDOP e PG) não interferiam na capacidade fagocítica de macrófagos em relação a partículas de leveduras, nas condições avaliadas (figuras 13 e 14). Tem sido proposto que alguns receptores de fagocitose possuam dupla função (incorporação de partículas e estímulo de adesão), portanto, a atividade fagocítica pode ser inibida pela ativação da função de adesão. Por exemplo, a ativação do receptor de fibronectina para adesão ao substrato pode inativar a função de receptores do complemento, como os C3, de aumentarem o estímulo de incorporação de partículas (ADEREM; UNDERHILL, 1999).

Para estudos posteriores sugere-se a revelância em se explorar os mecanismos moleculares relacionados à produção dos mediadores avaliados neste estudo. Especular o estímulo da expressão de receptores de membrana (como receptores de manose e TLRs), avaliar a ativação de proteínas quinase [proteína quinase c (PKC) e proteínas quinases ativadoras de mitógeno (MAPKs)], e ativação de fatores de transcrição (como NF- κ Bs e STATs), os quais têm sua atividade modulada por diversos polissacarídeos (JEON *et al.*, 2001; ANDO *et al.*, 2002; HSU *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2004; SHAO *et al.*, 2004)

Em conjunto os resultados do presente estudo demonstram que a pectina isolada da casca dos frutos do cacau, sua forma parcialmente desacetilada e o polímero poligalacturonato, são capazes de ativar macrófagos através do estímulo da secreção de alguns mediadores. A diferença entre os perfis de estímulo proporcionados pelos polímeros sugere que diferentes vias estão envolvidas no mecanismo de ação de cada molécula. Com isso confirma-se que polímeros com padrão de repetição de estrutura principal semelhante, porém com diferenças na presença de outra família de polímeros (inserções de RGI) e a presença de grupamentos substituintes (grupamentos acetil) são capazes de estimular macrófagos peritoneais de camundongos através de mecanismos particulares. Os presentes dados confirmam proposições anteriores que atribuem a proporção de grupamentos acetil e cadeias laterais de galactanas, a capacidade de gerar diferentes respostas biológicas (WANG; LIU; FANG, 2005; WANG; LUO; ZHA, 2010).

7. CONCLUSÃO

Os efeitos das pectinas observados sobre os macrófagos peritoneais permitem elaborar as seguintes conclusões:

Os tratamentos com os polímeros PDOP e PG, em altas concentrações (400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), diminuíram significativamente a viabilidade celular de macrófagos em relação ao controle. No entanto o tratamento com a pectina OP, nas mesmas condições, não demonstrou diminuir a viabilidade em nenhuma concentração testada.

Os polímeros PDOP e PG foram caracterizados por estimular a ativação celular e produção da citocina IL-12 em relação às células não tratadas, perfil esse não observado com o tratamento com o polímero OP.

Após o tratamento das células com os polímeros, pelo período de 48 horas, não foi observado qualquer estímulo na fagocitose de partículas de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, em relação ao grupo controle.

Em relação ao estímulo da produção de ânion superóxido o polímero PG, pectina com menor massa molecular pela ausência de ramificações, mostrou-se capaz de estimular essa via com intensidade superior a observada no grupo controle. Ainda foi observado que o melhor tempo de quantificação para produção de $\text{O}_2^{\cdot-}$, nesse sistema experimental, foi de duas horas. As pectinas do cacau, tanto na forma naturalmente acetilada quanto parcialmente desacetilada, não foram capazes de estimular o aumento dessa função de macrófagos nas condições testadas.

Apenas o polissacarídeo PDOP mostrou-se capaz de modular a produção de óxido nítrico, com tempo mais adequado de quantificação de 48 horas de tratamento, e da citocina TNF-alfa em relação a macrófagos não tratados. Vias que não foram estimuladas pelo tratamento com os polímeros OP e PG.

A única via estimulada pelas três pectinas foi a de produção da citocina IL-10, onde se destaca o maior estímulo por parte do polímero PDOP, o qual também foi o responsável por biomodular com maior intensidade outros mediadores avaliados, NO^{\cdot} , IL-12 e TNF-alfa.

Os polímeros da casca dos frutos do cacau, assim como o polímero poligalacturonato, demonstraram ser potenciais ativadores de algumas funções de macrófagos, podendo ser classificados como biomoduladores. Esses resultados contribuem para o esclarecimento do papel de grupamentos acetil e de estruturas de pectinas no estímulo das atividades abordadas neste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, D.O. Macrophages. *Methods. Enzymol.*, v. 58, p. 494-506, 1979.
- ADAMS, D. O.; HAMILTON, T. A. The cell biology of macrophage activation. *Annu. Rev. Immunol.*, v.2, p.283–318, 1984.
- ADEREM, A.; UNDERHILL, D. M. Mechanisms of phagocytosis in macrophage. *Annu. Rev. Immunol.*, v.17, p.593–623, 1999.
- ADOMAKO, D. Cocoa pod husk pectin. *Phytochemistry*, v.11, p.1145–1148, 1972.
- AKTAN, F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Science*, v.75, p.639–653, 2004.
- ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.*, v. 357, p. 593-615, 2001.
- AMARAL, A. E. Avaliação dos efeitos de complexos polissacarídeos oxovanádio (IV/V) sobre macrófagos peritoneais de camundongos e *Leishmania in vitro*. Trabalho de Dissertação de Mestrado em Ciências (Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.
- ANDO, I.; TSUKUMO, Y.; WAKABAYASHI, T.; AKASHI, S.; MIYAKE, K.; KATAOKA, T.; NAGAI, K. Safflower polysaccharides activate the transcription factor NF- κ B via toll-like receptor 4 and induce cytokine production by macrophages. *Int. Immunopharm.*, v.211, p. 55– 62, 2002.
- ARLÓRIO, M.; COISSON, J.D.; TRAVAGLIA, F.; VARSALDI, F.; MIGLIO, G.; LOMBARDI, G.; MARTELLI, A. Antioxidant and biological activity of phenolic pigments from *Theobroma cacao* hulls extracted with supercritical CO₂. *Food Res. Inter.*, v.38, p.1009–1014, 2005.
- BAUGH, J. A.; BUCALA R. Mechanisms for modulating TNF-alpha in immune and inflammatory disease. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.*, v.4, p.635–650, 2001.
- BELARDELLI, F.; FERRANTINI, M. Cytokines as a link between innate and adaptive antitumor immunity. *TRENDS in Immunol.*, v.23, p.201-208, 2002.
- BELSKA, N. V.; GURIEV, A. M.; DANILETS, M. G.; TROPHIMOVA, E. S.; UCHASOVA, E. G.; LIGATCHEVA, A. A.; BELOUSOV, M. V.; AGAPHONOV, V. I.; GOLOVCHENKO, V. G.; YUSUBOV, M. S.; BELSKY, Y. P. Water-soluble polysaccharide obtained from *Acorus calamus* L. classically activates macrophages and stimulates Th1 response. *Int. Immunopharm.*, v.10, p.933–942, 2010.
- BEUTLER, B. Innate Immunity: an overview. *Mol. Immunol.*, v. 40, p.845–859, 2004.
- BILITEWSKI, U. Determination of immunomodulatory effects: focus on functional analysis of phagocytes as representatives of the innate immune system. *Anal. Bioanal. Chem.*, v. 391, p.1545- 1554, 2008.

BLEICHER, P.; MACKIN, W.; BETAFECTIN, P. G. G. β -glucan: a novel carbohydrate immunomodulator with anti-infective properties. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, v.37, p.143– 166, 1995.

BOGDAN, C.; VODOVOTZ, Y.; NATHAN, C. Macrophage deactivation by interleukin 10. *J. Exp. Med.*, v.174, p.1549– 1555, 1991.

BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol. Rev.*, v.173 p.17–26, 2000.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. *Nat. Immunol.*, v. 2, p. 907-916, 2001.

BOHN, J. A.; BeMILLER, J. N. (1 \rightarrow 3) β -d-glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydr. Pol.*, v. 28, p. 3–14, 1995.

BURKE, B.; LEWIS, C. E. *The Macrophage*. 2 ed. New York: Oxford University Press, 2002.

CAMINERO, A.; COMABELLA, M.; MONTALBAN, X. Tumor necrosis factor alpha (TNF- α), anti-TNF- α and demyelination revisited: an ongoing story., *J. Neuroimmunol.*, v.234, p. 1–6 2011.

CASBON, A.; ALLEN, L. H.; DUNN, K. W.; DINAUER, M. C. Macrophage NADPH oxidase flavocytochrome b localizes to the plasma membrane and Rab-11 positive recycling endosomes. *J. Immunol.*, v. 182, p. 2325-2339, 2009.

CHEN, C. H.; SHEU, M. T.; CHEN, T. F.; WANG, Y. C.; HOU, W. C.; LIU, D. Z.; CHUNG, T. C.; LIANG, Y. C. Suppression of endotoxin-induced proinflammatory responses by citrus pectin through blocking LPS signaling pathways. *Biochem. Pharmacol.*, v.72, p.1001–1009, 2006.

CHENG, A.; WAN, F.; WANG, J.; JIN, Z.; XU, X. Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Glycyrrhiza uralensis* fish. *Int. Immunopharm.*, v.8, p.43–50, 2008.

CHENG, X. Q.; YUE, H.; LI, X. L.; XIE, J. Y.; ZHANG, Y. Y.; DI, H. Y.; CHEN, D. F. Macrophage immunomodulatory activity of the polysaccharides from the root of *Bupleurum smithii* var. *parvifolium*. *J. Ethnophar.*, v.130, p.363–368, 2010.

CHIBA, K.; KAWAKAMI, K.; TOHYAMA, K. Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. *Toxicology in Vitro*, v.12, p.251- 258,1998.

COLOMBO, M. P.; TRINCHIERI, G. Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine & Growth Factor Rev.*, v.13, p.155–168, 2002.

COMMINS, P.; BORISH, L.; STEINKE, J. W. Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines. *J. Immunol.*, v. 125, p. 53-72, 2010.

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

CROSS, A. R.; SEGAL, A. W. The NADPH oxidase of professional phagocytes-prototype of the NOX electron transport chain systems. *Bioch. Bioph. Acta.*, v. 1657, p. 1-22, 2004.

DOBROVOLSKAIA, M. A.; VOGEL, S. N. Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. *Microbes and Infection.*, v.4, p.903–914, 2002.

DONG, Q.; LIU, X.; YAO, J.; DONG, X.; MA, C.; XU, Y.; FANG, J.; DING, K. Structural characterization of a pectic polysaccharide from *Nerium indicum* flowers. *Phytochemistry*, v.71, p.1430–1437, 2010.

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

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

FALCH, B. H.; ESPEVIK, T.; RYAN, L.; STOKKE, B. T. The cytokine stimulating activity of (1 →3)-β-D-glucans is dependent on the triple helix conformation. *Carbohydr. Res.*, v.329, p.587–596, 2000.

FIGUEIRA, A.; JANICK, J.; BeMILLER, J.N. New products from *Theobroma cacao*: seed pulp and pod gum. *News crops*, v. 2, p.1-5, 1993.

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

GAO, H.; WANG, F.; LIEN, E. J.; TROUSDALE, M. D. Immunostimulating polysaccharides from *Panax notoginseng*. *Pharm Res.*, v.13, p.1196 – 1200, 1996.

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

GEISSMANN, F.; MANZ, M. G.; JUNG, S.; SIEWEKE, M. H.; MERAD, M.; LEY, K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*, v. 327, p.656 - 660, 2010.

GORDON, S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell*, v.111, p. 927–30, 2002.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immun.*, v. 3, p. 23-35, 2003.

GORDON, S.; TAYLOR, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immun.*, v. 5, p. 953-964, 2005.

HALLIWELL, B. Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide? *Trends Biochem. Sci.*, v. 3, p.509-515, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. *Free Radicals Biol. & Med.*, 4 ed. New York: Oxford, 2007.

HAMILTON, J.A.; ANDERSON, G. P. GM-CSF biology. *Growth Factors*, v.22, p.225–31, 2004.

HAN, S.B.; YOON, Y.D.; AHN, H.J.; LEE, H.S.; LEE, C.W.; YOON, W.K. PARKA, S.K.; KIM, H. M. Toll-like receptor-mediated activation of B cells and macrophages by polysaccharide isolated from cell culture of *Acanthopanax senticosus*. *Int. Immunopharm.*, v. 3, p.1301– 12, 2003.

HANKS, J.H.; WALLACE, R.E. Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*,v.71, p.196, 1949.

HSU, H.Y.; HUA, K.F.; LIN, C.C.; LIN, C.H.; HSU, J.; WONG, C.H. Extract of reishi polysaccharides induces cytokine expression via TLR4-modulated protein kinase signaling pathways. *J. Immunol.*, v.173, p.5989–5999, 2004.

IACOMINI, M. ; SERRATO, R. V.; SASSAK, G. L.; LOPES, L.; BUCHI, D. F.; GORIN, P. A. J. Isolation and partial characterization of a pectic polysaccharide from the fruit pulp of *Spondias cytherea* and its effect on peritoneal macrophage activation. *Fitoterapia*, v. 76, p.676–683, 2005.

INNGJERDINGEN, K. T.; DEBES, S. D.; INNGJERDINGEN, M.; HOKPUTSA, S.; HARDING, S. E.; ROLSTAD, B.; MICHAELSEN, T. E.; D, DRISSA DIALLO, D.; PAULSEN, B. S. Bioactive pectic polysaccharides from *Glinus oppositifolius* (L.) Aug. DC., a Malian medicinal plant, isolation and partial characterization. *J. Ethnophar.*, v.101, p.204–214, 2005.

JABBAR, S. A. B.; TWENTYMAN, P. R.; WATSON, J. V. The MTT assay underestimates the growth inhibitory effects of interferons. *British J. Cancer*, v.60, p.523 – 528, 1989.

JANEWAY, C. A. J. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol. Today.*, v.13, p. 11–16, 1992.

JENNY, M.; SANTER, E.; KLEIN, A.; LEDOCHOWSKI, M.; SCHENNACH, H.; UEBERALL, F.; FUCHSA, D. Cacao extracts suppress tryptophan degradation of mitogen-stimulated peripheral blood mononuclear cells. *J. Ethnophar.*, v.122, p.261–267, 2009.

JEON, Y. J.; HAN, S. B.; AHN, K. S.; KIM, H. M. Activation of NF- κ B/Rel in angelan-stimulated macrophages. *Immunophar.*, v.43, p.1– 9, 1999.

JEON, Y. J.; HAN, S. B.; LEE, S. H.; KIMA, H. C.; AHN, K. S.; KIMA, H. M. Activation of mitogen-activated protein kinase pathways by angelan in murine macrophages. *Int. Immunopharm.* v.1, p.237–245, 2001.

JOHNSTON, R.B.; GODZIK, C.A.; COHN, Z.A. Increase superoxide anion production by immunologically activated and chemically elicited macrophages. *J. Exp. Med.*, v. 48, p. 115-127, 1978.

JUNG, K.; HA, Y.; HA, S. K.; HAN, D.U.; KIM, D. W.; MOON, W. K.; CHAE, C. Antiviral effect of *Saccharomyces cerevisiae* β -glucan to swine influenza virus by increased production of interferon-gamma and nitric oxide. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public. Health.*, v. 51, p. 72-76, 2004.

KANGUSSU MARCOLINO, M. M. Avaliação de atividade leishmanicida IN VITRO de heteropolissacarídeos ácidos: não sulfatados e naturalmente sulfatados. Trabalho de Dissertação de Mestrado em Ciências (Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

KARPUZOGLU, E.; AHMED, S. A. Estrogen regulation of nitric oxide and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in immune cells: implications for immunity, autoimmune diseases and apoptosis. *Nitric Oxide*, v.15, p.177 – 186, 2006.

KELLER, R.; KEIST, R.; WECHSLER, A.; LEIST, T.P.; VAN DER MEIDE, P.H. Mechanisms of macrophage-mediated tumor cell killing: a comparative analysis of the roles of reactive nitrogen intermediates and tumor necrosis factor. *Int. J. Cancer*, v.46, p.682-686,1990.

KERRINGAN, A. M.; BROWN, G. D. C-type lectins and phagocytosis. *Immunobiology*, v. 214, p. 562-575, 2009.

KLEINBOGARD, P.; HEUSCH, G.; SCHULZ, R. TNF- α in atherosclerosis, myocardial ischemia/reperfusion and heart failure. *Pharmacol. & Therapeut.*, v. 127, p. 295-314, 2010.

KIM, K. I.; SHIN, K. S.; JUN, W. J.; HONG, B. S.; SHIN, D. H.; CHO, H. Y.; CHANG, H. I.; YOO, S. M.; YANG H. C. Effects of polysaccharides from rhizomes of *Curcuma zedoaria* on macrophage functions. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, v.65, p. 2369-2377, 2001.

KLEINERT, H.; SCHWARZ, P.M.; FORSTERMANN, U. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biol. Chem.*, 384, 1343– 1364, 2003.

KLEINERT, H.; PAUTZ, A.; LINKER, K.; SCHWARZ P. M. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 500, p.255–266, 2004.

KLIMP, A. H.; de VRIES, E. G. E.; SCHERPHOF, G. L.; DAEMEN, T. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. *Oncol. Hemat.*, v. 44, p. 143 –161, 2002.

KOIDE, M.; SUGIYAMA, T.; MU, M. M.; MORI, I.; I.; YOSHIDA, T.; HAMANO, T.; YOKOCHI, T. Gamma interferon-induced nitric oxide production in mouse CD5⁺ B1-like cell line and its association with apoptotic cell death. *Microbiol. Immunol.*, v. 47, p.669–679, 2006.

LAMBETH, J. D. Nox enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat. Rev. Immunol.*, v.4, p.181-189, 2004.

LECHNER, M.; LIRK, P.; RIEDER, J. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: the two sides of the same coin. *Sem. Cancer Biol.*, v. 15, p.277-289, 2005.

LECUMBERRI, E.; MATEOS, R.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; RUPÉREZ, P.; GOYA, L.; BRAVO, L. Dietary fibre composition, antioxidant capacity and physico-chemical properties of a fibre-rich product from cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Food Chem.*, v.104, p.948–954, 2007.

LEE, K.Y.; YOU, H.J.; JEONG, H.G.; KANG, J.S.; KIM, H.M.; RHEE, S.D. Polysaccharide isolated from *Poría cocos* sclerotium induces NF- κ B/Rel activation and iNOS expression through the activation of p38 kinase in murine macrophages. *Int. Immunopharm.*, v. 4, p. 1029–1038, 2004.

LEUNG, M.Y.K.; LIU, C.; ZHU, L.F.; HUI, Y.Z.; YU, B.; FUNG, K.P. Chemical and biological characterization of a polysaccharide biological response modifier from *Aloe vera* L. var. *chinensis* (Haw.) Berg. *Glycobiology*, v. 14, p. 501-510, 2004.

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

LOWENSTEIN, C.J.; ALLEY, E.W.; RAVAL, P.; SNOWMAN, A.M.; SNYDER, S.H.; RUSSELL, S.W.; MURPHY, W.J. Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 90, p.9730–9734, 1993.

MACMICKING, J.; XIE, Q.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.*, v. 15, p. 323–350, 1997.

MATSUURA, M.; SAITO, S.; HIRAI, Y.; OKAMURA, H. A pathway through interferon-gamma is the main pathway for induction of nitric oxide upon stimulation with bacterial lipopolysaccharide in mouse peritoneal cells. *Eur. J. Biochem.*, v. 270, p. 4016–4025, 2003.

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.*, v. 68, p. 1479-1483, 2005.

MINAKAMI, R.; SUMIMOTO, H. Phagocytosis-coupled activation of the superoxide-producing phagocyte oxidase, a member of NADPH oxidase (NOX) family. *Int. J. Hematol.*, v.86, p.193-198, 2006.

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

MORGAN, S. J., DARLING, D. C. *Animal cell culture*. 3 ed. Oxford: BIOS Scientific Publ., 1993.

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

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

MOSMANN, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Meth.* v.65, p. 55-63,1983.

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

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.*, v.8, p.958-970, 2008.

MÜLLER, A.; RICE, P.J.; ENSLEY, H.E.; COOGAN, P.S.; KALBFEISCH, J.H.; KELLEY, J.L.; LOVE, E.J.; PORTERA, C.A.; HÅ, T.; BROWDER, I.W.; WILLIAMS, D.L. Receptor binding and internalization of a water-soluble (1→3)-β-D-glucan biological response modifier in two monocyte/macrophages cell lines. *J. Immunol.*, v. 156, p. 3418-3425, 1996.

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

NATHAN, C. Mechanisms and modulation of macrophage activation. *Behring Inst. Mitt.*, v.29, 200–207, 1991.

NERGARD, C. S.; MATSUMOTO, T.; INNGJERDINGEN, M.; INNGJERDINGEN, K.; HOKPUTSA, S.; HARDING, S. E.; MICHAELSEN, T. E.; DIALLO, D.; KIYOHARA, H.; PAULSEN, B. S.; YAMADA, H. Structural and immunological studies of a pectin and a pectic arabinogalactan from *Vernonia kotschyana* Sch. Bip. ex Walp. (Asteraceae). *Carbohydr. Res.*, v.340, p.115–130, 2005.

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

OHLSSON, K.; BERGENFELDT, M.; BJORK, P. Functional studies of human secretory leukocyte protease inhibitor. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v.240, p.123–131, 1988.

OKAZAKI, M.; ADACHI, Y.; OHNO, N.; YADOMAE, T. Structure-activity relationship of (1 →3)-β-D-glucans in the induction of cytokine production from macrophages *in vitro*. *Biol. Pharm. Bull.*, v .18, p.1320–1327, 1995.

OSMAN , H.; NASARUDIN, R.; LEE, S. L. Extracts of cocoa (*Theobroma cacao* L.) leaves and their antioxidation potential. *Food Chem.*, v.86, p. 41–46, 2004.

OVODOVA, R. G.; GOLOVCHENKO, V. V.; POPOV, S. V.; POPOVA, G. Y.; PADERIN, N. M.; SHASHKOV, A. S.; OVODOV, Y. S. Chemical composition and anti-inflammatory activity of pectic polysaccharide isolated from celery stalks. *Food Chem.*, v.114, p.610–615, 2009.

OUYANG, W.; RUTZ, S.; CRELLIN, N. K.; VALDEZ, P. A.; HYMOWITZ, S G. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu. Rev. Immunol.*, v.29, p.71–109, 2011.

PAULSEN, B. S. Plant polysaccharides with immunostimulatory activities. *Curr. Org. Chem.*, v. 5, p. 939–50, 2001.

PÉREZ, S; MAZEAU, K.; du PENHOAT, C. H. The three-dimensional structures of the pectic polysaccharides. *Plant. Physiol. and Bioch.*, v. 38, p. 37-55, 2000.

PHILIPS, H. J. Dye exclusion test for viability. In: Kruse Jr. PF, Patterson Jr. MH, editors. *Tissue culture: methods and application*. New York: Academic Press; p. 406–408, 1973.

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

POPOV, S. V.; OVODOVA, R. G.; GOLOVCHENKO, V. V.; POPOVA, G. Y.; VIATYASEV, F. V.; SHASHKOV, A. S.; OVODOV, Y. S. Chemical composition and anti-inflammatory activity of a pectic polysaccharide isolated from sweet pepper using a simulated gastric medium. *Food Chem.*, v.124, p. 309-315, 2011.

POUTSIAKA, D. D.; MENGOZZI, M.; VANNIER, E.; SINHA, B.; DINARELLO, C. A. Cross-linking of the beta-glucan receptor on human monocytes results in interleukin-1 receptor antagonist but not interleukin-1 production. *Blood*, v.82, p.3695-36700, 1993

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

PUGH, N.; ROSS S.A.; ELSOHLY, H. N.; ELSOHLY, M. A.; PASCO, D.S. Isolation of three high molecular weight polysaccharide preparations with potent immunostimulatory activity from *Spirulina platensis*, *Aphanizomenon flos-aquae* and *Chlorella pyrenoidosa*. *Planta Med.*, v. 67, p.737- 742, 2001.

RAPHAEL, S.S., Lynch: Técnicas de laboratório. 4° ed., Manole, p. 988-994, 1986.

RAYBIOTECH. Disponível em <<http://www.raybiotech.com/index.asp?m=1>. Acesso em 21 de outubro de 2011.

REEVES, E. P.; LU, H.; JACOBS, H. L.; MESSINA, C. G. M.; BOLSOVER, S.; GABELLAK, G.; POTMA, E. O.; WARLEY, A.; ROES, J.; SEGAL, A. W. Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux. *Nature*, v.416, p. 291-297, 2002.

RICE, P. J.; KELLEY, J. L.; KOGAN, G.; ENSLEY, H. E.; KALBFLEISCH, J. H.; BROWDER, I. W. Human monocyte scavenger receptors are pattern recognition receptors for (1→3)-β-d-glucans. *J. Leukoc. Biol.*,v.72, p.140-146, 2002.

RIDLEY, B. L.; O'NEILL, M. A.; MOHNEM, D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, v. 57, p. 929-967, 2001.

ROOS, D.; WINTERBOURN, C. C. Lethal weapons. *Science*, v.296, p.669-671, 2002.

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

ROSÁRIO, M. M. T.; KANGUSSU MARCOLINO, M. M.; AMARAL, A. E.; NOLETO, G. R.; PETKOWICZ, C. L. O. Storage xyloglucans: potent macrophages activators. *Chemico-Biol. Interact.*, v.189, p.127-133, 2011.

RUIZ-BRAVO, A.; JIMENEZ-VALERA, M.; MORENO, E.; GUERRA, V.; RAMOS-CORMENZANA, A. Biological response modifier activity of an exopolysaccharide from *Paenibacillus jamilae* CP-7. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, v. 8, p. 706-710, 2001.

SABAT, R.; GRÜTZ, G.; WARSZAWSKA, K.; KIRSCH, S.; WITTE, E.; WOLK, K.; GEGINAT J. Biology of interleukin-10. *Cytokine & Growth Fac. Rev.*, v.21, p.331-344, 2010.

SAKAGAMI, H.; SATOH, K.; FUKAMACHI, H.; IKARASHI, T.; SHIMIZU, A.; YANO, K.; KANAMOTO, T.; TERAOKUBO, S.; NAKASHIMA, H.; HASEGAWA, H.; NOMURA, A.; UTSUMI, K.; YAMAMOTO, M.; MAEDA, Y.; OSAWA K. Anti-HIV and vitamin c-synergized radical scavenging activity of cacao husk lignin fractions. *In vivo*, v.22, p.327-332, 2008.

SALMAN, H.; BERGMAN, M.; DJALDETT, M.; ORLIN, J.; BESSLER, H. Citrus pectin affects cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells. *Biomed. & Pharmacotherapy*, v. 62, p. 579-582, 2008.

SAMUELSEN, A. B., PAULSEN, B. S., WOLD, J. K., OTSUKA, H., KIYOHARA, H., YAMADA, H., & KNUTSEN, S. H. Characterization of a biologically active pectin from *Plantago major* L. *Carbohydr. Pol.*, v.30, p.37- 44, 1996.

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. *Carbohydr. Pol.*, v. 87, 2730-2734, 2012.

SASAKI, H.; KOBAYASHI, M.; POLLARD, R. B.; SUZUKI, F. Effects of Z-100, a *Mycobacterium-tuberculosis*-derived arabinomanan on the LP-BM5 murine leukemia virus infection in mice. *Pathobiology*, v. 69, p. 96-103, 2001.

SCHEPETKIN I. A.; FAULKNER C.L.; NELSON-OVERTON L.K.; WILEY J.A.; QUINN M. T. Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Juniperus scopolorum*. *Int. Immunopharm.*, v. 5, p.1783-1799, 2005.

SCHEPETKIN, A. I.; QUINN, M. T. Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *Int. Immunopharm.*, v.6, p.317-333, 2006.

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

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

SCHINELLA, G.; MOSCA, S.; CIENFUEGOS-JOVELLANOS, E.; PASAMAR, M. A.; MUGUERZA, B.; RAMÓN, D.; RÍOS, J. L. Antioxidant properties of polyphenol-rich cocoa products industrially processed. *Food Research. Inter.*, v.43, p.1614-1623, 2010.

SHAO, B. M.; XU, W.; DAÍ, H.; TU, P.; LI, Z.; GAO, X. M. A study on the immune receptors for polysaccharides from the roots of *Astragalus membranaceus*, a chinese medicinal herb. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.320, p.1103–1111, 2004.

SHIN, K. S.; KIYOHARA, H.; MATSUMOTO, T.; YAMADA, H. Rhamnogalacturonan II from the leaves of *Panax ginseng* C.A. Meyer as a macrophage Fc receptor expression-enhancing polysaccharide. *Carbohydr Res.*, v.300, p.239 – 249, 1997.

SHIN, J. Y.; SONG, J. Y.; YUN, Y. S.; YANG, H. O.; RHEE, D. K.; PYO, S. Immunostimulating effects of acidic polysaccharides extract of *Panax ginseng* on macrophage function. *Immunophar. Immunotox.*, v.24, p. 469–482, 2002.

SILVEIRA, J. da C. Avaliação dos efeitos imunomoduladores e citotóxicos de polissarídeos de *Chorisia speciosa* e *Hymenaea courbaril*. Trabalho de Dissertação de Mestrado em Ciências (Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

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

STUEHR, D. J.; SANTOLINI, J.; WANG, Z.; WEI, C.; ADAK, S. Update on mechanism and catalytic regulation in the NO synthases. *J. Biol. Chem.*, v. 279, n. 35, p. 36167–36170, 2004.

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

TACKE, F.; RANDOLPH, G. J. Migratory fate differentiation of blood monocyte subsets. *Immunobiology*, v. 211, p 609 – 618, 2006.

TANNIN-SPITZ, T.; BERGMAN, M.; VAN-MOPPES, D.; GROSSMAN, S.; MALIS ARAD, S. Antioxidant activity of the polysaccharide of the red microalga *Porphyridium* sp. *J. Appl. Phycol.*, v. 17, p. 215-222, 2005.

TARPEY, M. M.; WINK, D. A.; GRISHAM, M. B. Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, v.286, p.431–444, 2004.

TAYLOR, P. R.; BROWN, G. D.; REID, D. M.; WILLMENT, J. A.; MARTINEZ-POMARES, L.; GORDON, S. The β -glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *J. Immunol.*, v.169, p.3876 –3882, 2002.

TAYLOR, P. R.; MARTINEZ-POMAREZ, L.; STACEY, M.; LIN, H. H.; BROWN, G.D.; GORDON, S. Macrophage receptors and immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.*, v. 23, p. 901-944, 2005.

THORNTON, B. P.; VETVICKA, V.; PITMAN, M.; GOLDMAN, R. C.; ROSS, G. D. Analysis of the sugar specificity and molecular location of the β -glucan-binding lectin site of complement receptor type 3 (CD11b/CD18). *J. Immunol.*, v.156, p.1235– 1246, 1996.

TOGOLA, A.; INNGJERDINGEN, M.; DIALLO, D.; BARSETT, H.; ROLSTAD, B.; MICHAELSEN T. E.; PAULSEN B. S. Polysaccharides with complement fixing and macrophage stimulation activity from *Opilia celtidifolia*, isolation and partial characterization. *J. Ethnoph.*, v. 115, p. 423–431, 2008.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol.*, v.13, p.251-276, 1995.

TRINCHIERI, G. Proinflammatory and immunoregulatory functions of interleukin-12. *Int. Rev. Immunobiology*, v.16, p.365-396, 1998.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, v. 3, p.133-146, 2003.

TSE, H. M.; MILTON, M. J.; PIGANELLI, J. D. Mechanistic analysis of the immunomodulatory effects of a catalytic antioxidant on antigen – presenting cells: implication for their use in targeting oxidation – reduction reactions in innate immunity. *Free Radical Biol. & Med.*, v. 36, p. 233 – 247, 2004.

TZIANABOS, A. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function. *Clinical Microb. Rev.*, v.13, p. 523–533, 2000.

TZIANABOS, A.; WANG, J. Y.; KASPER, D. L. Biological chemistry of immunomodulation by zwitterionic polysaccharides. *Carbohydr. Res.*, v. 338, p.2531-2538,2003.

VIGNAIS, P. V. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cel. Mol. Life Sci.*, v. 59, p. 1428–59, 2002.

VINAY, D. S.; KWON, B. S. TNF superfamily: costimulation and clinical applications. *Cel. Biol. Internat.*, v. 33, p. 453-465. 2009.

VISTICA, D.; SKEHAN, P.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; PITTMAN, A.; BOYD, R. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Research*, v.51, p. 2515 – 2520, 1991.

VRIESMANN, L. C.; TEÓFILO, R. F.; PETKOWICZ, C. L. O. Optimization of nitric acid-mediated extraction of pectin from cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.) using response surface methodology. *Carbohydr. Pol.*,v.84, p.1230 – 1236, 2011.

VRIESMANN, L. C.; AMBONI, R. D. M. C.; PETKOWICZ, C. L. O. Cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.): composition and hot-water-soluble pectins. *Ind. Crops & Prod.*, v.84 p.1230–1236, 2011.

XIE, G.; SCHEPETKIN, I. A.; QUINN, M. T. Immunomodulatory activity of acidic polysaccharides isolated from *Tanacetum vulgare* L. *Int. Immunopharm.*, v. 7, p. 1639–1650, 2007.

WANG, X. S.; LIU, L.; FANG, J. N. Immunological activities and structure of pectin from *Centella asiatica*. *Carbohydr. Pol.*, v. 60, p. 95–101, 2005.

- WANG, J. H.; LUO, J. P.; ZHA, X. Q. Structural features of a pectic polysaccharide from the stems of *Dendrobium nobile* Lindl. *Carbohydr. Pol.*, v. 81, p.1–7, 2010.
- WATTS, T. H. TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. *Annu. Rev. Immunol.*, V.23, P.23–68, 2005.
- WHISTLER, R. L.; MASAK JR., E.; PLUNKETT, R. A. Cacao Polysaccharides. *J. Am. Chem. Soc.*, v.78, p. 2851-2853, 1956.
- WILLATS, W. G. T.; KNOX, J. P.; MIKKELSEN, J. D. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Sci. & Technol.*, v. 17, p. 97- 104, 2006.
- WINTERBOURN, C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat. Chem. Biology*, v. 4, 278-286, 2008.
- WOLK, K.; KUNZ, S.; ASADULLAH, K.; SABAT, R. Cutting edge: immune cells as sources and targets of the IL-10 family members? *J. Immunol.*, v.168, p.5397-5402, 2002.
- YAPO, B. M. Pectic substances: from simple pectic polysaccharides to complex pectins-A new hypothetical model. *Carbohydr. Pol.*, v. 86, p. 373-385, 2011.
- YANG, X.; ZHAO, Y.; YANG, Y.; RUAN Y. Isolation and characterization of immunostimulatory polysaccharide from an herb tea, *Gynostemma pentaphyllum* Makino. *J. Agric. & Food Chem.*, v. 56, p. 6905–6909, 2008.
- YALIN, W.; ISHURD, O.; CUIRONG, S.; YUANJIANG, P. Structure analysis and antitumor activity of (1→3)- β -D-glucans (cordyglucans) from the mycelia of *Cordyceps sinensis*. *Planta Med.*, v. 71, p. 381-4, 2005.
- YU, K. W.; KIYOHARA, H.; MATSUMATO, T.; YANG, H. C.; YAMADA, H. Intestinal immune system modulating polysaccharides from rhizomes of *Atractylodes lancea* DC. *Planta Med.*, v. 64, p. 714–719, 1998.
- YU, K. W.; KIYOHARA, H.; MATSUMATO, T.; YANG, H. C.; YAMADA, H. Structural characterization of intestinal immune system modulating new arabino-3, 6-galactan from rhizomes of *Atractylodes lancea* DC. *Carbohydr. Pol.*, v. 46, p. 147–156, 2001.
- ZHANG, X.; GONÇALVES, R.; MOSSER, D. M. The isolation and characterization of murine macrophages. *Curr. Prot. Immun.*, v.14.1.1-14.1.14, 2008.
- ZHU, L.; GUNN, C.; BECKMAN, J. Bactericidal activity of peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.298, p.452–457, 1992.

Anexo - Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal



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



Nº 494

CERTIFICADO

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

CERTIFICATION

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


PROCESSO: 23075.053201/2010-11

APROVADO: 14/12/2010 – R.O. 11/2010

TÍTULO: Efeitos biomoduladores de pectina da casca de cacau (*Theobroma cacao* L.) sob macrófagos peritoneais de camundongos

AUTORES: Guilhermina Rodrigues Noletto, Juliana Carolina Amorim, Alex Evangelista do Amaral

DEPARTAMENTO: Bioquímica


Prof. Dr. Aleksander Roberto Zamprônio
Coordenador do CEEA