

MARIANA PIEMONTE MORETÃO

PROPRIEDADES BIOMODULADORAS DA ARABINOGALACTANA (ARAGAL) DE  
*Anadenanthera colubrina* (Angico branco)

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Benigna Martinelli de Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. Marcello Iacomini.

CURITIBA

2004

**A DEUS, por me permitir viver tantas  
alegrias.**

**Ao meu filho Guilherme, por ser a realização do meu maior sonho.**

**Ao meu grande amor André.**

**A minha mãe Nilde, por você ser assim... ...simplesmente maravilhosa.**

**Ao meu pai Mariano, esteja onde estiver, obrigada. Não foram muitos anos, porém intensos e cheios de amor.**

## AGRADECIMENTOS

Ao André, pelo amor, respeito, amizade, confiança, companheirismo, paciência, e por estar sempre comigo.

A minha mãe, Nilde pelo grande amor que nos une, por fazer parte da minha vida de forma intensa, e por cuidar do nosso Gui com tanto amor, carinho e dedicação.

Ao meu irmão Fábio, pelo amor e carinho.

À Ednéia, pela amizade e carinho, e por fazer parte da vida da minha família, sempre com extrema dedicação e amor.

À professora Dr<sup>a</sup> Maria Benigna Martinelli de Oliveira, pela confiança em me aceitar em seu laboratório, pelos valiosos ensinamentos e conselhos profissionais, e por seu exemplo “único” de orientadora e professora.

Ao professor Dr. Marcello Iacomini, pela cessão da arabinogalactana utilizada neste trabalho.

Ao professor Philip A. J. Gorin, pelas sugestões e correções na redação dos trabalhos científicos.

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

A professora Dr<sup>a</sup> Dorly de Freitas Buchi, pela colaboração nas análises de microscopia óptica.

Ao professor Dr. Aleksander Zampronio, pela grande colaboração na realização dos experimentos com TNF- $\alpha$ .

À professora Edith Fanta, pela permissão do uso do fotomicroscópio Olympus BHS, para realização das micrografias.

Às professoras do Laboratório de Oxidações Biológicas e Cultivo Celular, Dr<sup>as</sup> Eva Gunilla Skare Carnieri, Maria Eliane Merlin e Sílvia Maria S. C. Cadena pelo carinho e amizade.

Aos colegas do Laboratório de Oxidações Biológicas e Cultivo Celular, Wellington Luciano Braguini, André Mariano, Andréa Senff Ribeiro, Sílvia Prado, Guilhermina Rodrigues Noletto e Priscila Dabagui, pela amizade.

À minha amiga Ana Paula Negrelo Newton, pela amizade, pelas conversas e bons momentos de convivência e pela ajuda no manuseio dos animais.

À Silvana Doin Lima Bueno, técnica do Laboratório de Oxidações Biológicas e Cultivo Celular, pelo suporte técnico.

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

À Sra. Marilza Lamour, secretária do Curso Pós-graduação em Bioquímica pelo auxílio sempre prestado.

Às bibliotecárias Telma e Izabella, pela colaboração e atenção.

Aos funcionários do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, pelo trabalho prestado. Em especial ao Júlio, por colaborar sempre que necessário.

Ao PRONEX/Carboidratos e CNPq pelo suporte financeiro

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	XI
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	XIII
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	XIV
<b>RESUMO</b> .....	XVI
<b>ABSTRACT</b> .....	XVII
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	3
2.1. MACRÓFAGOS.....	3
2.2. RECONHECIMENTO DE CÉLULAS TUMORAIS POR MACRÓFAGOS.....	6
2.3. “BURST” RESPIRATÓRIO.....	8
2.4. PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO.....	10
2.5. FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA (TNF- $\alpha$ ).....	13
2.6. ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE POLISSACARÍDEOS.....	15
2.6.1. Arabinogalactanas.....	21
2.6.2. <i>Anadenanthera colubrina</i> (Angico Branco).....	23
2.7. JUSTIFICATIVA DOS OBJETIVOS.....	26
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	28
<b>4. ESTRATÉGIA GERAL</b> .....	29
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	30
5.1. MATERIAIS E REAGENTES.....	30
5.2. MÉTODOS.....	31
5.2.1. Procedimento de esterilização de material de vidro e acessórios.....	31
5.2.2. Solução do polissacarídeo ARAGAL.....	31
5.2.3. Soluções e Meios de Cultura utilizados nos Procedimentos de Cultivo Celular.....	31
5.2.3.1. Solução salina tamponada (PBS) .....	31
5.2.3.2. Solução balanceada de Hanks (HBSS) .....	32
5.2.3.3. Meio de cultura.....	32

5.2.3.4.	Solução de tripsina- EDTA.....	33
5.3.	MÉTODOS GERAIS.....	34
5.3.1.	Dosagem de Proteínas.....	34
5.3.2.	Dosagem de Carboidratos.....	34
5.4.	ANIMAIS.....	35
5.5.	CÉLULAS.....	36
5.5.1.	Obtenção de Macrófagos.....	36
5.5.2.	Células do Sarcoma-180 (S-180) .....	37
5.5.3.	Células de melanoma B16-F10.....	38
5.5.4.	Células HeLa.....	38
5.6.	DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR.....	39
5.6.1.	Método do Azul de Trypan.....	39
5.6.2.	Método do MTT.....	40
5.7.	MICROSCOPIA DE LUZ.....	41
5.8.	EXPERIMENTOS COM MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS.....	43
5.8.1.	Efeito <i>in vitro</i> de ARAGAL na viabilidade celular .....	43
5.8.2.	Efeito de ARAGAL na atividade elicitora de células.....	43
5.8.3.	Efeito de ARAGAL na ativação: ensaios <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....	44
5.8.3.1.	Ensaio <i>in vitro</i> .....	44
5.8.3.2.	Ensaio <i>in vivo</i> .....	44
5.8.4.	Efeito de ARAGAL na capacidade fagocítica.....	45
5.8.5.	Produção de ânion superóxido por macrófagos peritoneais de camundongos tratado com ARAGAL.....	46
5.8.6.	Produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais de camundongos tratados com ARAGAL.....	47
5.8.7.	Produção de TNF- $\alpha$ por macrófagos peritoneais de camundongos tratados com ARAGAL.....	48
5.9.	EXPERIMENTOS COM CÉLULAS DO SARCOMA 180 (S- 180).....	49
5.9.1.	Efeito <i>in vitro</i> de ARAGAL na viabilidade de células do S-180..	49

5.9.2.	Efeito de ARAGAL na interação <i>in vitro</i> entre macrófagos e células do S-180.....	50
5.9.3.	Atividade antitumoral de ARAGAL frente o S-180.....	51
5.9.3.1.	S-180 ascítico.....	51
5.9.3.2.	Tumor sólido S-180.....	52
5.10.	EXPERIMENTOS COM CÉLULAS DO MELANOMA B16-F10.	52
5.10.1.	Efeito <i>in vitro</i> de ARAGAL na viabilidade de células B16-F10...	52
5.10.2.	Efeito <i>in vitro</i> de ARAGAL na proliferação de células B16-F10.	53
5.10.3.	Efeito <i>in vitro</i> de ARAGAL na morfologia células B16-F10.....	53
5.10.4.	Avaliação da atividade antitumoral de ARAGAL frente ao melanoma B16-F10.....	54
5.10.5.	Determinação da sobrevivência de animais portadores de melanoma B16-F10 subcutâneo tratados com ARAGAL.....	55
5.11.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	55
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>56</b>
6.1.	EFEITOS DE ARAGAL SOBRE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS.....	56
6.1.1.	Produção de ânion superóxido por macrófagos peritoneais de camundongos tratados com ARAGAL.....	73
6.1.2.	Produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais de camundongos tratados com ARAGAL.....	77
6.1.3.	Produção de TNF- $\alpha$ por macrófagos peritoneais de camundongos tratados com ARAGAL.....	80
6.2.	EXPERIMENTOS COM CÉLULAS DO SARCOMA 180 (S-180).....	83
6.2.1.	Efeito de ARAGAL sobre células do S-180 <i>in vitro</i> .....	83
6.2.2.	Efeito de ARAGAL sobre células do S-180 <i>in vivo</i> .....	87
6.3.	EXPERIMENTOS COM OUTRAS LINHAGENS CELULARES.	89
6.3.1.	Viabilidade e proliferação das células de melanoma B16-F10 tratadas <i>in vitro</i> com ARAGAL.....	92
6.3.2.	Morfologia células de melanoma B16-F10 e células HeLa tratadas <i>in vitro</i> com ARAGAL.....	93



6.3.3.	Atividade antitumoral de ARAGAL frente ao melanoma B16-F10 <i>in vivo</i> .....	103
7.	<b>DISCUSSÃO FINAL</b> .....	111
8.	<b>CONCLUSÃO</b> .....	117
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	119
	<b>ANEXO</b> .....	145

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	ESTRUTURA DA ARABINOGALACTANA DE <i>Anadenanthera colubrina</i> (ARAGAL).....	25
FIGURA 2	ESTRATÉGIA GERAL .....	29
FIGURA 3	EFEITO <i>IN VITRO</i> DE ARAGAL SOBRE A VIABILIDADE DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS.....	59
FIGURA 4	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE MACRÓFAGOS TRATADOS <i>IN VITRO</i> COM ARAGAL.....	60
FIGURA 5	EFEITO DE ARAGAL NA ATIVAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE MACRÓFAGOS.....	61
FIGURA 6	ATIVIDADE ELICITORA DE ARAGAL .....	63
FIGURA 7	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE MACRÓFAGOS DE ANIMAIS TRATADOS COM ARAGAL.....	66
FIGURA 8	EFEITO DE ARAGAL NA ATIVAÇÃO <i>IN VIVO</i> DE MACRÓFAGOS.....	67
FIGURA 9	EFEITO DE ARAGAL NA CAPACIDADE FAGOCÍTICA DE MACRÓFAGOS TRATADOS <i>IN VITRO</i> COM ARAGAL.....	70
FIGURA 10	PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM ARAGAL.....	75
FIGURA 11	PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM ARAGAL – TEMPO DE 60 MINUTOS.....	76
FIGURA 12	PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM ARAGAL.....	79
FIGURA 13	PRODUÇÃO DE FATOR DE NECROSE TUMORAL- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS TRATADOS.....	82
FIGURA 14	EFEITO <i>IN VITRO</i> DE ARAGAL SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE CÉLULAS DO SARCOMA-180 (S-180).....	86

FIGURA 15	INTERAÇÃO ENTRE MACRÓFAGOS PRÉ-EXPOSTOS <i>IN VITRO</i> À ARAGAL E CÉLULAS DO S-180.....	87
FIGURA 16	EFEITO DE ARAGAL SOBRE O CRESCIMENTO DO SARCOMA 180 (S-180) ASCÍTICO EM CAMUNDONGOS.....	91
FIGURA 17	EFEITO DE ARAGAL SOBRE A MASSA TUMORAL DE SARCOMA 180 (S-180).....	92
FIGURA 18	EFEITO <i>IN VITRO</i> DE ARAGAL SOBRE VIABILIDADE DE CÉLULAS B16-F10.....	95
FIGURA 19	EFEITO DE ARAGAL SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS B16-F10 <i>IN VITRO</i> .....	96
FIGURA 20	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE CÉLULAS B16-F10.....	97
FIGURA 21	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE CÉLULAS B16-F10 – MELANOSSOMOS.....	100
FIGURA 22	EFEITO <i>IN VITRO</i> DE ARAGAL NA MORFOLOGIA DE CÉLULAS B16-F10.....	101
FIGURA 23	EFEITO <i>IN VITRO</i> DE ARAGAL NA MORFOLOGIA DE CÉLULAS HeLa.....	102
FIGURA 24	EFEITO DE ARAGAL SOBRE A MASSA MÉDIA DOS TUMORES SÓLIDOS DE MELANOMA B16-F10.....	104
FIGURA 25	EFEITO DE ARAGAL SOBRE OS ÓRGÃO DE ANIMAIS PORTADORES DE TUMOR INTRAPERITONEAL DE CÉLULAS B16-F10.....	109
FIGURA 26	EFEITO DE ARAGAL SOBRE A SOBREVIDA DE ANIMAIS PORTADORES DETUMOR SÓLIDO DE CÉLULAS B16-F10..	110

**LISTA DE TABELAS**

TABELA 1	ÍNDICE ENDOCÍTICO DE MACRÓFAGOS TRATADOS <i>IN</i> <i>VITRO</i> COM ARAGAL.....	71
----------	--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ap	Alvéolos pulmonares
ARAGAL	Arabinogalactana de <i>Anadenanthera colubrina</i>
B	Baço
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BSA	Soro albumina bovina
c	Capilar
c-AMP	AMP-cíclico
CEP	Células do exudato peritoneal
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etileno diamino tetra acético
ELISA	Enzyme-Liked Immunosorbent Assay (ensaio imuno-enzimático em fase sólida)
HBSS	Solução salina balanceada de Hank
HEPES	N- (2-hidroxietil) piperazina N' (ácido 2-etano sulfônico)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
IE	Índice endocítico
IFN- $\gamma$	Interferon-gama
i.p.	Intraperitoneal
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1
IL	Interleucina
LPS	Lipopolissacarídeo
MEM	Meio essencial mínimo de Eagle
MC	Meio de crescimento
MG	Melanossomos gigante
MP	Melanossomos perinucleares
mpe	Melanossomos periféricos
MR	Receptor de manose
MRB	Modificadores da resposta biológica
MTT	(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide); azul de tetrazólio

MØS	Macrófagos
N	Núcleo
NK	Células “Natural Killer”
NO•	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ânion superóxido
PBS	Solução salina tamponada
PMA	Forbol 12-miristato, 13-acetato
pg	Picograma
R	Rim
ROS	Espécies reativas do oxigênio
SFB	Soro fetal bovino
SOD	Superóxido dismutase
SRE	Sistema retículo endotelial
ta	Tecido adiposo
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral-alfa
TNF-R1	Receptor 1 para fator de necrose tumoral
TNF-R2	Receptor 2 para fator de necrose tumoral

## RESUMO

A flora brasileira é fonte de polissacarídeos interessantes os quais, em seus estados nativos ou submetidos a modificações estruturais, podem ter potenciais aplicações como modificadores da resposta biológica (MRB). Um heteropolissacarídeo ácido, contendo principalmente galactose e arabinose (ARAGAL), isolado da goma da árvore leguminosa nativa *Anadenanthera colubrina* (Angico Branco), foi estudado quanto aos seus efeitos imunomoduladores e antitumorais. Com este objetivo, foram avaliadas em células do exudato peritoneal (PEC), a capacidade de elicitar macrófagos para a cavidade peritoneal, a produção de ânion superóxido, óxido nítrico e TNF- $\alpha$ , a atividade fagocítica, as alterações morfológicas, a percentagem de macrófagos ativados e os efeitos antitumorais contra o Sarcoma-180. A ativação de macrófagos mostrando citoplasma aumentado, núcleos grandes e claros, várias projeções citoplasmáticas, habilidade de espalhamento, foi detectada *in vitro*, em células exposta à ARAGAL, e *in vivo* em células obtidas de animais tratados. A exposição *in vitro* à ARAGAL aumentou a ocorrência de macrófagos ativados de forma tempo- e dose-dependentes, uma vez que ~82% das células estavam ativadas em presença de 300  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de ARAGAL após 24 h de incubação e ~91% após 48h. Após tratamento i.p. com 100, 250 e 500  $\text{mg.kg}^{-1}$  de ARAGAL os macrófagos também foram ativados, mostrando a preparação ~60, ~75 e ~75% de células ativadas respectivamente. A atividade elicitora de células foi observada pelo tratamento dos animais com 50, 100 ou 200  $\text{mg.kg}^{-1}$  de ARAGAL, que aumentou o número de PEC em ~18%, ~44% e ~88%, respectivamente. O ensaio para fagocitose mostrou que 25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de ARAGAL foram suficientes para desencadear a capacidade fagocítica máxima. A produção de  $\text{O}_2^-$  por macrófagos de animais tratados com ARAGAL foi 70% maior que a de macrófagos de animais não tratados. Além disso, células de animais tratados responderam ao PMA, o efeito se tornou 25% maior que o controle utilizando animais não tratados. Porém, não se observou aumento na produção de óxido nítrico nas condições experimentais analisadas. ARAGAL também aumentou em 26 vezes a produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos peritoneais. Macrófagos tratados *in vitro* por 18 h com ARAGAL, foram capazes de matar células do Sarcoma-180, como observado pelas estruturas destas células dentro de citoplasma dos macrófagos. ARAGAL promoveu um efeito antitumoral contra o Sarcoma-180 sólido; uma inibição do crescimento de ~39% foi detectada quando os animais foram tratados com 100  $\text{mg.kg}^{-1}$  do polímero, e uma inibição do crescimento de 66% foi detectada nos animais portadores de tumor ascítico do S-180 tratados com a mesma dose de ARAGAL. O aumento da produção de TNF- $\alpha$  pode ser responsável pela atividade antitumoral de ARAGAL. Os resultados sugerem que o polissacarídeo ARAGAL isolado de *A. colubrina* é um MRB.

## ABSTRACT

Brazilian flora are a source of interesting polysaccharides which, either in their native state or when submitted to structural modifications, might have potential applications as biological response modifiers (BRM). A complex acidic heteropolysaccharide, containing mainly galactose and arabinose (ARAGAL), isolated from the gum of the native leguminous tree *Anadenanthera colubrina* (Angico Branco), was studied for its immunomodulatory and antitumoral effects. In order to obtain insights on the biological effects of ARAGAL, its immunological properties on peritoneal exudate cells, namely their capacity of eliciting peritoneal macrophages, superoxide anion, nitric oxide and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) production, phagocytic activity, morphological alterations, percentage content of activated macrophages and antitumoral effect against Sarcoma 180, were evaluated. Activation of macrophages showing increased cytoplasm, bright and large nuclei, various cytoplasmatic projections, and spreading ability, was detected following *in vitro* cell exposure to ARAGAL or in cells obtained from treated animals. *In vitro* exposure to ARAGAL increased the occurrence of activated macrophages in a time-, and a dose-dependent pattern, since  $\sim 82\%$  of the cells were activated in the presence of  $300\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  of ARAGAL after 24 h of incubation and  $\sim 91\%$  after 48 h. The occurrence of activated macrophages was also evident in cell preparations from ARAGAL-treated mice, their percentage showing a dose-dependent pattern. There were  $\sim 60\%$ ,  $\sim 75\%$  and  $\sim 75\%$  following treatment with 100, 250 and  $500\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  of ARAGAL respectively. Cell eliciting activity was observed in ARAGAL-treated animals, in a dose dependent manner. Treatment of animals with 50, 100 or  $200\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  of ARAGAL increased peritoneal exudate cell (PEC) numbers by  $\sim 18$ , 44 and 88% respectively. A phagocytic assay showed that  $25\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ARAGAL was sufficient to impose a maximum phagocytic ability, although this effect was dose-dependent.  $\text{O}_2^-$  production by macrophages from ARAGAL-treated mice was 70% higher than that of cells from untreated mice. Moreover, cells from treated mice responded to PMA, the effect being 25% higher than that of the control using untreated mice. However, cells from treated mice not increased the nitric oxide production. ARAGAL also increased 26 fold TNF- $\alpha$  production by peritoneal macrophages. Macrophages, treated *in vitro* for 18 h with ARAGAL, were able to kill Sarcoma 180 cells, as observed by their structures inside the macrophage cytoplasm. ARAGAL promoted an antitumoral effect against solid S-180, a growth inhibition of  $\sim 39\%$  was detected when the animals were treated with  $100\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  of polymer and, with it the same dose, a growth inhibition of  $\sim 66\%$  was observed to S-180 ascitic form. The increase of TNF- $\alpha$  production could be responsible with the antitumor activity of ARAGAL. These results thus suggest a possible role of ARAGAL from *A. colubrina* as a BRM.



## 1. INTRODUÇÃO

Polissacarídeos de diferentes origens e com características estruturais variadas vêm sendo estudados quanto as suas potenciais aplicações biológicas. Estes estudos descrevem a atividade desses polímeros relacionada a ativação de células do sistema imune, como os macrófagos, e quanto a atividade antitumoral frente a diferentes modelos (ROSENBERG, 1993; BOHN & BeMILLER, 1995). Além destas, as atividades anti-viral e anti-coagulante colocam estas moléculas como agentes farmacologicamente ativos (BOHN & BeMILLER, 1995). Dentre as atividades biológicas, aqueles polissacarídeos que apresentam habilidade de aumentar a resposta imunológica têm sido classificados como imunomoduladores ou como modificadores da resposta biológica (BRM) (ROSENBERG, 1993; BOHN & BeMILLER, 1995). O Laboratório de Cultivo Celular do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR vem estudando a atividade biológica de polissacarídeos de diferentes origens. Foram estudadas a atividade antitumoral da  $\alpha$ -D-glucana (CARNEIRO-LEÃO et al., 1997, STUELP-CAMPELO et al., 2002) e os efeitos na ativação de macrófagos da galactomanana isolada do líquen *Ramalina celastri* (NOLETO et al., 2002). Polissacarídeos sulfatados isolados de algas marinhas foram também estudados, avaliando-se a atividade dessas moléculas em diferentes linhagens celulares (STEVAN et al., 2001). Dando continuidade a estes estudos, neste trabalho serão avaliadas as atividades biológicas da arabinogalactana (ARAGAL) de *Anadenanthera colubrina* como biomodulador. Dentre as atividades aqui descritas, aquelas relacionadas aos efeitos sobre macrófagos peritoneais de camundongos tiveram destaque, sendo avaliados a

ativação de macrófagos pelo tratamento *in vivo* e *in vitro*, a capacidade fagocítica pelo tratamento *in vitro*, a atividade elicitadora de células pelo tratamento *in vivo*, a produção de ânion superóxido, óxido nítrico e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) após tratamento *in vivo* e a citotoxicidade destas células tratadas *in vitro* frente a células do Sarcoma-180. A atividade citotóxica *in vitro* e a atividade antitumoral *in vivo* em camundongos portadores de tumor ascítico e tumor sólido também foram avaliadas no presente trabalho e, com finalidade comparativa, células B16-F10 de melanoma murino foram também utilizadas como modelo. Os efeitos *in vitro* de ARAGAL na proliferação e morfologia destas células foram também determinados.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. MACRÓFAGOS

Os macrófagos são células do grupo dos fagócitos mononucleares, chamados de monócitos no sangue e macrófagos nos tecidos. Amplamente distribuídos pelo corpo, os macrófagos são responsáveis por numerosos processos homeostáticos, imunológicos e inflamatórios e constituem uma defesa imediata contra elementos estranhos ao organismo. Algumas localizações particulares destas células incluem órgãos como baço, fígado (células de Kupffer), pulmão e nódulos linfóides. Na pele são chamadas células de Langerhans, possuindo características funcionais específicas em cada local (ADAMS, 1979; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Essas células podem ser classificadas em 3 grupos que refletem os estados funcionais dos macrófagos: (1) macrófagos residentes, que são derivados da cavidade peritoneal sem nenhum estímulo; (2) macrófagos elicitados, que são recrutados para a cavidade peritoneal por um agente inflamatório não-específico, como o tioglicolato de sódio; e (3) macrófagos ativados, recrutados para a cavidade por uma infecção por *Bacillus Calmette Guerin* (BGC), o qual produz um exudato rico em citocinas (COHN, 1978; CRAWFORD et al., 1987). Cada um destes estágios é acompanhado pela expressão específica de proteínas de membrana e produtos de secreção (MACKAY & RUSSELL, 1986).

Os macrófagos ativados estão presentes em vários exudatos, e podem ser caracterizados por parâmetros morfológicos além de vários marcadores específicos (GORDON, 1996). O termo “macrófago ativado” geralmente refere-se a macrófagos

cujas características funcionais, bioquímicas e morfológicas refletem um aumento da atividade celular. Quando comparados com macrófagos residentes, os macrófagos ativados são maiores e mais aderentes às superfícies. As células ativadas demonstram aumento da expressão e secreção de enzimas lisossomais e de fatores de crescimento (KAMINSKI et al., 1985). Os macrófagos estão intimamente envolvidos na resposta imune. As principais funções destas células estão relacionadas ao processo inflamatório, ao processamento e apresentação de antígenos, à co-ativação de linfócitos T e B, à capacidade fagocítica, à angiogênese, ao processo de hematopoiese e de reparo tecidual, além da atividade citotóxica contra células tumorais e microorganismos (WING & REMINGTON, 1980; CAVAILLON, 1994; POPOV, et al., 1999; VADIVELLO et al., 2000; COOK et al., 2001). Quando a fagocitose ocorre, os macrófagos englobam grandes partículas como bactérias, leveduras, células tumorais e células senescentes e, para eliminar essas partículas ingeridas, eles produzem espécies derivadas do oxigênio (“burst respiratório”) e nitrogênio (KARNOVSKI & LAZDINS, 1978; NATHAN, 1985; FADOK et al., 1993; MARCINKIEWICZ, 1997; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Uma vez que os fagócitos agem como células regulatórias e efectoras no sistema imune, o aumento da função fagocítica pode ser aplicado como terapia contra infecções bacterianas e câncer (POPOV et al., 1999).

Um dos receptores relacionados à fagocitose é o receptor para D-manose (MR), o qual reconhece especificamente unidades de carboidratos, às quais se ligam, permitindo assim a internalização de glicoproteínas terminadas em manose, L-fucose e N-acetilglucosamina (SHEPHERD et al., 1981). Este receptor possui duas regiões distintas de reconhecimento de carboidratos: a região amino terminal, a qual

possui um domínio rico em cisteína, cujo papel é crítico na ligação de glicoproteínas sulfatadas, e outra que é constituída por domínio tipo lectina C. Estas regiões são organizadas sequencialmente facilitando a internalização de microrganismos infecciosos. Essa dupla especificidade para a ligação de carboidratos possibilita que o receptor de manose se ligue com as cadeias polissacarídicas sulfatadas e não sulfatadas (LIU et al., 2001). O receptor para manose não é expresso em monócitos circulantes. Em macrófagos a sua expressão é regulada, os glicocorticóides aumentam sua expressão, enquanto que o interferon gama (IFN- $\gamma$ ) diminui (STAHL et al., 1984). Outro receptor descrito para carboidratos em macrófagos é o receptor para  $\beta$ -glucanas (GOLDMAN, 1988), que será abordado posteriormente nesta revisão bibliográfica.

Além das funções descritas, os macrófagos secretam moléculas sinalizadoras chamadas citocinas e quimiocinas, as quais dirigem a resposta imune (ABBAS et al., 2000). A capacidade dos macrófagos em produzir citocinas depende do grau de maturação, ativação e localização destas células (CAVAILLON, 1994). As citocinas, proteínas de baixa massa molecular, são importantes porque permitem a comunicação entre células do sistema imune via receptores específicos presentes nas superfícies celulares. Vários componentes solúveis de bactérias, como endotoxinas, exotoxinas, enterotoxinas e peptidoglicanas, são capazes de induzir a produção de citocinas por macrófagos. Por exemplo, o lipopolissacarídeo (LPS) uma endotoxina de bactérias Gram-negativas, que tem sido estudado pela sua conhecida habilidade em induzir a liberação de algumas citocinas por macrófagos e monócitos. Baixas concentrações de LPS são suficientes para sinalizar a síntese de várias citocinas, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$  e IL-6. O TNF- $\alpha$  é produzido em resposta à

ativação do fator de transcrição nuclear NF- $\kappa$ B (KOPP & GHOSH, 1995), sendo que sua produção é importante atividade efetora exercida pelos macrófagos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

A interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e a interleucina-6 (IL-6) são citocinas pró-inflamatórias, isto é, são produzidas em resposta a infecções ou danos teciduais. A interleucina-10 (IL-10) e a interleucina-12 (IL-12) são citocinas imunoreguladoras que exibem uma ampla variedade de efeitos sobre diferentes tipos de células, dentre elas os macrófagos (ABBAS et al., 2000). Enquanto macrófagos e monócitos influenciados por agentes ativadores podem produzir citocinas, outros fatores e sinais podem inibir sua produção, tais como proteínas de choque térmico (FOUQUERAY et al., 1992) e glicocorticóides (LEW et al., 1988; WAAGE & BAKKE, 1988) produzidos durante condições de estresse (CAVAILLON, 1994).

Além da produção de citocinas, os macrófagos ativados desencadeiam o “burst” respiratório, ou seja a síntese de espécies reativas do oxigênio, e a produção de óxido nítrico (NO) respostas bioquímicas de duas vias oxidativas diferentes, através das quais os macrófagos ativados matam microrganismos e células tumorais (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; BILLIAR et al., 1992). A geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) serão abordadas posteriormente nesta revisão bibliográfica.

## **2.2. RECONHECIMENTO DE CÉLULAS TUMORAIS POR MACRÓFAGOS**

Macrófagos ativados são capazes de reconhecer, ligar e subsequentemente eliminar células tumorais. A distinção entre células tumorigênicas e células não-tumorigênicas pelos macrófagos indica que as diferenças na composição da

membrana celular podem ser responsáveis por tal reconhecimento específico (KLIMP et al., 2002). Neste aspecto, estudos têm demonstrado que a diferença na quantidade de fosfatidilserina na membrana externa de células tumorais e células normais é um dos fatores responsáveis por esta especificidade (UTSUGI et al., 1991; ELNEMR et al., 2000). Além disso estudos indicam que a glicosilação alterada de moléculas da superfície celular de células tumorais pode ser um outro mecanismo de reconhecimento destas células por macrófagos (TAKANO et al., 1990; SAKAMAKI et al., 1990; WESTENFELDER et al., 1993; PUTZ & MANNEL et al., 1995; ICHII et al., 2000). Estas estruturas de carboidratos se ligam a receptores semelhantes a lectinas presentes nos macrófagos (SAKAMAKI et al., 1990).

Em uma extensa revisão bibliográfica, KLIMP et al. (2002) cita uma série de estudos clínicos que objetivaram a ativação e o recrutamento de monócitos e macrófagos como forma de eliminar células tumorais. Nesta série de estudos, duas estratégias podem ser distingüidas: (1) a ativação *in vivo* de macrófagos utilizando modificadores da resposta biológica e (2) imunoterapia celular adaptativa, na qual células efectoras são isoladas do corpo e re-inoculadas vários dias depois da ativação *in vitro* destas células com modificadores da resposta biológica.

A destruição de células tumorais onde os macrófagos estão diretamente envolvidos ocorre por dois mecanismos distintos: (1) citotoxicidade mediada por macrófagos, um processo relativamente lento e dependente de contato célula-célula e (2) citotoxicidade celular dependente de anticorpo; processo pelo qual tanto os macrófagos como os monócitos são capazes de lisar células tumorais, através do reconhecimento e ligação das células alvo cobertas por anticorpo via receptor Fc nas células efectoras (SHAW et al., 1978; KAWASE et al., 1985; KLIMP et al., 2002). O

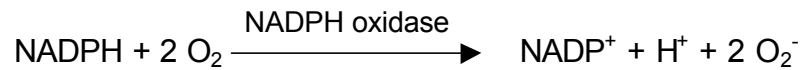
primeiro requer 1 a 3 dias para ocorrer, sendo que a susceptibilidade à citotoxicidade mediada por macrófagos é variável e dependente do tipo de célula tumoral; além disso, este processo apresenta como principal característica o aumento da expressão de ICAM-1, que é induzida por citocinas (DAEMEN et al., 1989; KLIMP et al., 2002). O segundo processo depende do estado de ativação do macrófago e pode ser completado rapidamente, dentro de poucas horas, ou lentamente, onde são necessários 1 a 2 dias (KLIMP et al., 2002). O mecanismo pelo qual ocorre o reconhecimento e lise das células alvo durante este processo provavelmente envolve a geração de espécies reativas de oxigênio, incluindo o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio (JOHNSON et al., 1986; KLASSEN & SAGONE, 1980), liberação de TNF- $\alpha$  e IL-1 (PULLYBLANK et al., 1995), proteases e componentes do complemento (LEU et al., 1991). A importância relativa dos mediadores envolvidos na morte de células tumorais depende da susceptibilidade intrínseca das diferentes células tumorais e das condições de ativação das células efectoras (KLIMP et al., 2002).

### **2.3. “BURST” RESPIRATÓRIO**

A interação de uma variedade de compostos nos receptores da superfície celular de fagócitos pode induzir a formação de metabólitos reativos de oxigênio no processo conhecido como “burst” respiratório. Este caracteriza-se por um acentuado aumento no consumo de oxigênio, resultante da ativação de uma via que reduz o oxigênio a ânion superóxido ( $O_2^-$ ). A formação do  $O_2^-$ , um processo essencial para a defesa do hospedeiro contra microrganismos invasores, é catalisada pelo complexo NADPH oxidase, como representado na equação abaixo. Em seguida o  $O_2^-$  é



convertido a peróxido de hidrogênio pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD) (KLEBANOFF, 1992; ROTROSEN, 1992).



A NADPH oxidase é constituída por componentes citosólicos e por uma flavoproteína ligada à membrana de vesículas secretoras que, sob estímulo, se fundem à membrana plasmática. Nos fagócitos a NADPH oxidase encontra-se normalmente inativa, porém, quando estas células são estimuladas com agentes apropriados, como por exemplo as cadeias peptídicas de microorganismos como o N-formilmetionilleucilfenilalanina (fMLP<sup>2</sup>), ou o éster de forbol 12-meristato 13-acetato (PMA), ocorre a translocação de proteínas fosforiladas para a membrana, onde se associam com o citocromo b<sub>558</sub>, formando a NADPH oxidase ativa (YAMAGUCHI & KANEDA, 1988; JOHANSSON et al., 1995; PARK et al., 1992; PARK & BABIOR, 1992; BABIOR, 1992; SEGAL & ABO, 1993). Os produtos do “burst” respiratório, O<sub>2</sub><sup>-</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, destroem os patógenos fagocitados ou presentes no meio extracelular.

A intensidade do “burst” respiratório em macrófagos depende de onde e como eles são obtidos. Macrófagos residentes, que não entraram em contato com nenhum tipo de estímulo, são pouco ativos. Porém, macrófagos com grande capacidade oxidativa podem ser obtidos de animais que entraram em contato com o *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Células obtidas de

animais tratados com o tioglicolato ou expostas ao éster de forbol (PMA) consomem três vezes mais oxigênio durante o processo de fagocitose, quando comparadas a células obtidas de animais não tratados (COHEN et al., 1981). O PMA, como estímulo não-particulado, pode produzir o “burst” respiratório em macrófagos, com produção de espécies reativas de oxigênio (JUN et al., 1993). Os ésteres de forbol, *in vitro*, alojam-se na membrana dos macrófagos e ativam a proteína quinase C (PKC), enzima que inclui uma grande família com múltiplas isoformas, apresentando domínios regulatórios e catalíticos distribuídos em carboxi e amino terminais (RYVES et al., 1991).

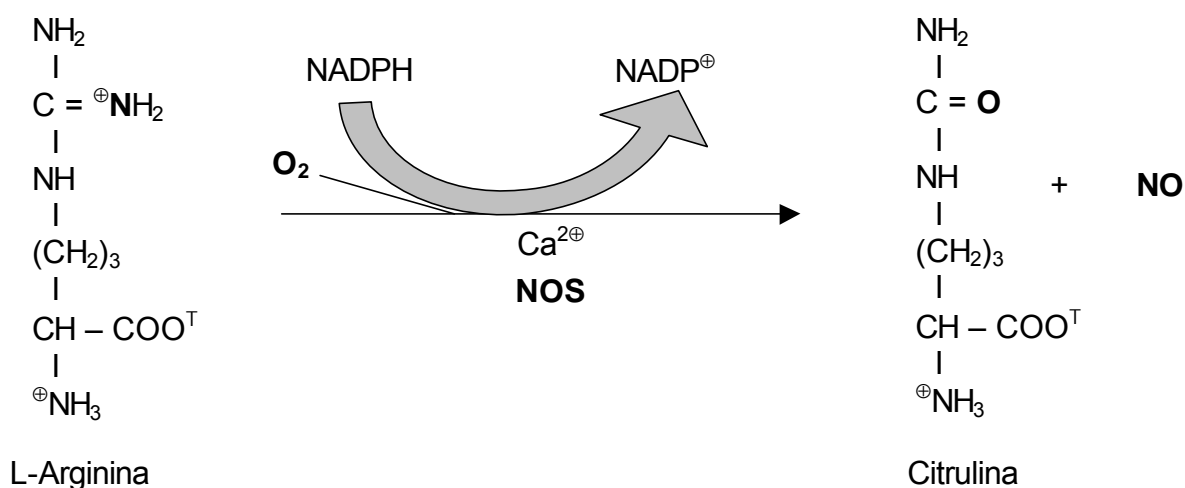
Outros agentes indutores da produção de ROS incluem interferon gama (IFN- $\gamma$ ), o lipopolissacarídeo (LPS) e o muramil dipeptídio da parede celular bacteriana, os quais também potencializam a resposta destas células ao estímulo do qual originou o “burst” respiratório (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

#### **2.4. PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO**

O óxido nítrico, um gás radical livre e permeável a membranas, é produzido por diferentes tipos celulares, tais como células endoteliais vasculares, neurônios, células epiteliais do trato respiratório, fibroblastos, hepatócitos e macrófagos (STUEHR & MARLETA; BILLIAR et al., 1992; NUSSLER & BILLIAR, 1993; SONG et al., 2002). Como um radical livre, ele reage rapidamente com vários compostos, principalmente espécies contendo elétrons desemparelhados, como o oxigênio molecular e metais (MAYER & HEMMENS, 1997). O óxido nítrico produzido por macrófagos desenvolve um papel importante em processos patológicos, como a

defesa anti-microbiana, inflamação e angiogênese (MACMICKING et al., 1997; LCANCY et al., 1998).

O NO é sintetizado a partir do átomo de nitrogênio do grupo guanidino do aminoácido L-arginina em uma reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), um homodímero contendo FAD e FMN como grupos prostéticos e ainda requerendo tetrahydrobiopterina, NADPH e O<sub>2</sub> para sua atividade (XIA & ZWEIER, 1997). A reação de produção de NO está representada abaixo:



A óxido nítrico sintase foi caracterizada em diferentes isoformas, as quais representam produtos de genes distintos (LOWENSTEIN & SNYDER, 1992; NATHAN & XIE, 1994; NUSSLER & BILLIAR, 1993). Em células endoteliais e neurônios, a forma constitutiva (cNOS) é dependente de Ca<sup>2+</sup> para a sua atividade e produz pequenas quantidades de NO por curtos períodos de tempo (BREDT & SYNDER, 1990). A óxido nítrico sintase induzível (iNOS), que é encontrada nos macrófagos, contém uma molécula de calmodulina fortemente ligada, que a mantém em uma conformação ativa. O aumento na transcrição do gene para esta forma da enzima é observado em resposta a diferentes estímulos, como citocinas (por

exemplo: IL-1, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ), bactérias (por exemplo: BCG) ou produtos bacterianos (por exemplo, LPS) (MONCADA et al., 1994; JAMES, 1995), além de cAMP e prostaglandina E<sub>2</sub> (IMAI et al., 1994). A iNOS tem sido considerada como molécula central na regulação da resposta imune contra tumores (SONG et al., 2002). Existem evidências que mostraram a necessidade de duas moléculas sinais para a indução da atividade efetora desta via bioquímica, seja por LPS + IFN- $\gamma$  (GREEN et al., 1990; Van der VEEN et al., 2000), ou por IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$  (LIEW et al., 1990). A inibição das formas de NOS pode ocorrer por análogos da arginina Nsubstituídos, como a N<sup>G</sup>-monometil-L-arginina (NMMA), aminoguanidina ou N-nitroarginina-metil-éster (JAMES, 1995).

O NO é lábil e altamente reativo; difunde-se através da membrana, e apresenta um pequeno tempo de meia vida, somente alguns segundos (Van der VEEN, et al., 2000). Por esta razão, este efector atua somente nas células próximas do seu local de produção. Em soluções aquosas, o NO é rapidamente transformado em nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) e nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Entre as ações do NO produzido pelo endotélio vascular estão o relaxamento da musculatura lisa vascular, redução da adesão e agregação plaquetária. O NO produzido por macrófagos está envolvido na ação citotóxica exercida por estas células, para certos microorganismos e células tumorais (PRINCE & GUNSON, 1993; COTRAN et al., 1994; MONCADA et al., 1994; MAYER & HEMMENS, 1997). Outras ações descritas para o NO incluem ainda a proteção contra os danos sistêmicos induzidos por citocinas, assim como a inibição da adesão e migração de leucócitos através do endotélio vascular da camada celular endotelial (KUBES et al., 1994). Porém, a produção descontrolada de NO pode levar a uma

resposta maciça tóxica, implicada em uma série de doenças inflamatórias (COTRAN et al., 1994; ZHUANG & WOGAN, 1997).

## **2.5. FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA (TNF- $\alpha$ )**

O fator de necrose tumoral (TNF) foi descoberto em 1975 por CARSWELL e colaboradores no soro de camundongos infectados com o *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG). Estes autores identificaram o TNF como uma proteína do soro derivada de macrófagos estimulados por endotoxina, e capaz de causar lise de células tumorais *in vivo* (SOUBA, 1994). O TNF é produzido primariamente por macrófagos (MANNEL et al., 1980), porém outros tipos celulares, como linfócitos, células natural killer e células de Kupffer, têm sido identificados como capazes de produzir esta citocina (SOUBA, 1994). Algumas viroses, tripanossomos, plasmódios e alguns organismos gram-positivos podem também estimular a produção de TNF, que também é detectada em outros estados fisiopatológicos, como injúrias e processos malignos (STOVROFF et al., 1989; BALKWUL et al., 1987; SOUBA, 1994). Porém conforme observado experimentalmente, o lipopolissacarídeo (LPS) é o mais importante estimulador da liberação de TNF por macrófagos, sendo este considerado como mediador primário dos efeitos sistêmicos da endotoxina. O TNF é conhecido como uma proteína solúvel (17 kDa) mas também como uma molécula precursora associada a membrana (26 kDa) (JEONG & JUE, 1997). Após a clivagem da molécula precursora, a forma solúvel do TNF é secretada como uma proteína homotrimérica. Ambas a molécula associada a membrana e a molécula solúvel são efetivas em destruir a célula alvo (MONASTRA et al., 1996; DECKER et al., 1987; MARR et al., 1997). O mecanismo pelo qual o TNF é capaz de destruir as células

alvo envolve sua ligação a receptores específicos. Dois receptores para TNF, o receptor do tipo 1 (TNF-R1) e o do tipo 2 (TNF-R2), têm sido descritos, sendo que ambos estão presentes na maioria dos tipos de células e tecidos (BROCKHAUS et al., 1990; HOHMANN et al., 1990; TARTAGLIA & GOEDEL, 1992; CURTIN et al., 2002). A ocupação de 5 a 10% dos receptores para TNF já é suficiente para a indução da maioria dos efeitos biológicos do TNF (TSUJIMOTO & VILCEK, 1986; COFFMAN et al., 1988). Quando o TNF se liga ao TNF-R1 ocorre a indução à toxicidade, à atividade antiviral, à proliferação de fibroblastos e indução do NF- $\kappa$ B, eventos que normalmente resultam na ativação das caspases e apoptose (CURTIN et al., 2002). A ligação do TNF- $\alpha$  ao TNF-R2 induz à proliferação de linfócitos T citotóxicos e timócitos (TARTAGLIA & GOEDEL, 1992; TARTAGLIA et al., 1993).

Reconhecido também como uma importante molécula de defesa do organismo que age sobre células tumorais (MIZUNO et al., 2000; ARINAGA et al., 1992), o TNF- $\alpha$  é capaz de induzir a necrose em certos tumores experimentais (CARSWELL et al., 1975) e exercer efeitos citotóxicos ou citostáticos em várias linhagens tumorais *in vitro* (WATANABE et al., 1985; HARANAKA & SATOMI, 1981). Dessa forma, a modulação do sistema imune para produzir TNF endógeno de forma controlada para eliminar ou suprimir o crescimento células tumorais vem sendo considerada como uma alternativa no tratamento do câncer. Neste aspecto, vários polissacarídeos e outras moléculas, para as quais a ação antitumoral foi demonstrada, vêm sendo utilizados como indutores da produção de TNF endógeno (WONG et al., 1994). Entretanto, a injeção de TNF recombinante em pacientes humanos causou vários efeitos colaterais incluindo febre e caquexia (SPRIGGS et al., 1987).

Além dos efeitos já citados, o TNF participa também do aumento da citotoxicidade mediada por monócitos (SMITH et al., 1990) e da atividade citolítica de células “natural killer” (NK) (OSTENSEN et al., 1987). O mecanismo pelo qual ocorre a indução antitumoral seletiva do TNF pode ser explicado pelo acúmulo de macrófagos e leucócitos polimorfonucleares próximos ao tumor, os quais tem capacidade de produzir TNF e citocinas inflamatórias com atividade de retroalimentar esta produção (ARINAGA et al., 1992). Quando produzido em pequenas quantidades, o TNF exerce um grande número de atividades biológicas pleiotrópicas que estão relacionadas ao controle da proliferação e diferenciação celular, regulação da interação das citocinas, interação com outros mediadores da resposta ao estresse, incluindo as prostaglandinas e corticosteróides, e mediação da resposta aguda a injúria tecidual (SOUBA, 1994). Esses efeitos levam a mecanismos de remodelação tecidual, inflamação e citotoxicidade quando os níveis teciduais de TNF são baixos, e quando os níveis de TNF são elevados, levam à progressão para a caquexia, injúria tecidual, choque irreversível e morte.

## **2.6. ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE POLISSACARÍDEOS**

Dentre os estudos visando avaliar as atividades biológicas de polissacarídeos, destacam-se aqueles que relacionam estes polímeros à ativação de células do sistema imune, como os macrófagos, e aqueles que avaliam a possível atividade antitumoral dos polissacarídeos frente a diferentes modelos tumorais (ROSENBERG, 1993; BOHN & BeMILLER, 1995). Atualmente, alguns polissacarídeos são considerados moléculas farmacologicamente ativas por apresentarem atividade anti-viral, anti-coagulante e anti-tumoral (BOHN &

BeMILLER, 1995). Polissacarídeos que apresentam habilidade de aumentar a resposta imunológica tem sido classificados como imunomoduladores. Farmacologicamente, essas moléculas têm sido classificadas como modificadores da resposta biológica (MRB) (ROSENBERG, 1993; BOHN & BeMILLER, 1995).

Um agente pode ser classificado como um MRB se atuar pelo menos por um dos seguintes mecanismos: **A.** Aumento direto da resposta anti-tumoral do hospedeiro, promovendo o aumento de número ou atividade das células efetoras, ou da produção de mediadores solúveis, como as citocinas; **B.** Redução dos mecanismos supressores, promovendo, desta forma, o aumento indireto da resposta imune do hospedeiro ao tumor; **C.** Aumento das defesas do hospedeiro através de seu efeito como mediador natural ou sintético das respostas imunes; e, **D.** Modificação das características de membrana das células tumorais, de forma a aumentar sua imunogenicidade, alterar seus padrões de disseminação metastática, ou torná-las mais susceptíveis à destruição por mecanismos imunológicos ou por agentes citotóxicos (MITCHELL, 1988). Entre os novos agentes que vêm sendo estudados, destacam-se certos tipos de polissacarídeos de diferentes origens como algas, fungos, líquens e vegetais.

Vários autores têm tentado estabelecer uma correlação entre a estrutura química de carboidratos e a atividade anti-tumoral. Esta é uma relação difícil de ser estabelecida porque existem muitas possibilidades de interação entre os carboidratos, de forma que mesmo os homopolímeros podem apresentar estruturas complexas. Estruturas secundárias podem ser formadas, dependendo das conformações das unidades monossacarídicas, da massa molar, e das interações por ligações de hidrogênio inter e intra-cadeia (WHISTLER et al., 1976). Entre os



fatores que podem influenciar a atividade anti-tumoral, podem ser citados: **A.** Estrutura da cadeia principal; **B.** Grau de ramificação; **C.** Presença de grupos substituintes; **D.** Massa molar; e, **E.** Conformação (BOHN & BeMILLER, 1995).

Vários autores têm relatado efeitos de polissacarídeos sobre diferentes aspectos da ativação de macrófagos (ARINAGA et al., 1992; YOSHIZAWA et al., 1996; Di LUZIO, 1999; WANG et al., 1996; MÜLLER et al., 1996; KERÉKGYÁRTÓ et al., 1996; CHEN et al., 1997a; LEUNG, et al., 1997; CHINTALWAR et al., 1999; POPOV et al., 1999; KITAZAWA et al., 2000; MIZUNO et al., 2000; HAN et al. 2001; COOK et al., 2001; RAMESH et al., 2002; UM et al., 2002; SONG, et al., 2002; STUELP-CAMPELO et al., 2002; NOLETO et al., 2002, 2004; NISHIMURA-UEMURA, et al., 2003). Entre os polissacarídeos mais estudados estão as  $\beta$ -glucanas (STONE & CLARKE, 1992; BOHN & BeMILLER, 1995), tanto particuladas quanto aquelas solúveis em água, as quais podem ser obtidas de uma variedade de plantas, fungos e bactérias (WAKSHULL et al., 1999). O grau de ramificação destes polímeros é bastante variado e, via de regra, as estruturas apresentam massas moleculares geralmente maiores que 200.000 Da (KRAUZ & FRANZ, 1991; MISAKI et al., 1993; OKASAKI et al., 1995). Segundo GOLDMAN (1988), macrófagos peritoneais de camundongos possuem receptores para  $\beta$ -glucanas, podendo, desta forma, reconhecer e fagocitar esses polímeros, o que ocasionaria a ativação dessas células, caracterizada principalmente pela secreção de IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , além da produção de NO, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e aumento da atividade fagocítica (ABEL & CZOP, 1992; SAKURAI et al., 1992; ADACHI et al., 1993; OKASAKI et al., 1995; OKASAKI et al., 1996). Uma preparação da parede celular de levedura, constituída de manana e glucana, conhecida por “zymozan”, é amplamente utilizada para induzir o “burst”

respiratório em macrófagos (WILLIAMS et al., 1986; BADWAY & KARNOVSKI, 1980; BERTON & GORDON, 1983). A via do óxido nítrico (NO) também pode ser alvo de efeitos de alguns polissacarídeos, os quais parecem sinalizar para o aumento da transcrição dos genes da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (RAMAMOORTHY et al., 1996; DEUK et al., 1998; KIM, 1998).

Dentre as  $\alpha$ -glucanas, uma glucana isolada do líquen *Ramalina celastri*, cuja estrutura principal é constituída por ligações (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 4) alternadas na proporção 3:1, tem sido estudada. Este polímero apresentou efeitos citotóxicos sobre células HeLa, levando a alterações morfológicas das mesmas como a presença de vacúolos citoplasmáticos contendo material acidófilo, acúmulo de material filamentososo, presença de grânulos eletron-densos dispersos no citoplasma e o aparecimento de expansões globosas (*blebs*), o que sugeriu sofrimento celular. O derivado sulfatado desta molécula causou alterações drásticas sobre as células (CARNEIRO-LEÃO et al., 1997). Quando injetada intraperitonealmente, esta  $\alpha$ -glucana recrutou macrófagos para a cavidade peritoneal de camundongos, sendo que estas células apresentavam algumas características de células ativadas, como o aumento da produção de peróxido de hidrogênio e da capacidade fagocítica (STUELP-CAMPELO et al., 2002). MIZUNO e colaboradores (1998) observaram que a administração de uma  $\alpha$ -glucana com ligações (1 $\rightarrow$ 6),(1 $\rightarrow$ 4), extraída do cogumelo *Agaricus blazei*, aumentou a população de células T citotóxicas e células NK, em camundongos; sendo que este polímero também exibiu uma atividade antitumoral contra o Sarcoma-180 (S-180), efeito provavelmente resultante da ativação do sistema imune do animal. O mesmo grupo estabeleceu uma classificação para a atividade anti-tumoral exercida por polissacarídeos, baseando-se nos valores de

inibição do crescimento, expressos em percentual sendo de 0-25%, sem atividade; entre 26 e 50%, atividade regular; de 51-75%, atividade efetiva; entre 76 -95%, consideravelmente efetiva, e de 96-100%, muito efetiva (MIZUNO et al., 1986).

A lentinana, uma  $\beta$ -glucana com ligações (1 $\rightarrow$ 3) e ramificações em (1 $\rightarrow$ 6), é outro polissacarídeo considerado como um potente imunestimulador. O polímero que é extraído do fungo *Lentinus edodes* apresenta efeitos sobre macrófagos e mostrou atividade antitumoral contra tumores alogênicos e singênicos em camundongos e ratos (CHIHARA et al., 1970; ROSE et al., 1984), além de apresentar atividade antitumoral em pacientes portadores de carcinoma gástrico (ARINAGA et al., 1992). Os autores observaram que os monócitos periféricos apresentaram habilidade em produzir quantidades bastante aumentadas das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$  e TNF- $\alpha$ , após a administração do polissacarídeo lentinana.

Além das  $\alpha$  e  $\beta$ -glucanas, outros polissacarídeos têm mostrado efeitos sobre células do sistema imune e células tumorais. Dentre esses polímeros estão o fosfopolissacarídeo e o polissacarídeo neutro extraídos do *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* OLL 1073R-1, os quais apresentaram efeitos sobre macrófagos, recrutando células para a cavidade peritoneal e estimulando a capacidade fagocítica e a atividade citostática em células tumorais das linhagens Sarcoma-180 e P388 (KITAZAWA et al., 2000).

O polímero tipo-inulina (PG), extraído da raiz de *Platycodon grandiflorum*, também apresentou atividade imunestimuladora. Os autores mostraram que o polímero ativa seletivamente células B e macrófagos, mas não células T, e propuseram que esta seletividade seria resultante da ligação do polímero a receptores específicos presentes nestas células, mas não em células T. Este efeito

de seletividade foi similar ao encontrado para a angelana, um polissacarídeo péctico, isolado da raiz de *Angelica gigas Nakai* (JEON et al., 1999, JEON et al., 2001). É importante citar que embora estes polímeros apresentem efeitos similares, suas composições químicas e estruturais são diferentes; a angelana é constituída por arabinose, galactose e ácido galacturônico e não contém glucose (JEON et al., 1999) enquanto o polissacarídeo PG é caracterizado como uma glucofrutana e constituído por uma cadeia principal de (2→1)-β-D-frutose (HAN et al., 2001). Esses dois polissacarídeos ativaram a produção de NO por macrófagos de forma diversa daquela exercida pelo LPS, pois os receptores utilizados por este lipopolissacarídeo e pelos polímeros em questão não são os mesmos (HAN et al., 2001; JEON et al., 2001).

Mananas e galactomananas também são descritas como interferentes nas funções dos macrófagos (NOLETO et al., 2002, 2004). A galactomanana (GMPOLY) isolada do líquen *Ramalina celastri* e seu complexo com o íon vanadilo (GMPOLY-VO) apresentaram efeitos sobre macrófagos peritoneais de camundongos; essas moléculas foram capazes de diminuir a produção de ânion superóxido estimulada por PMA, sendo que a GMPOLY-VO foi capaz de produzir este efeito em concentração 100 vezes menor do que a GMPOLY. A produção de óxido nítrico por macrófagos tratados com GMPOLY aumentou em 40%, sendo que este efeito foi observado na ausência de IFN-γ e LPS. Além disso, GMPOLY e GMPOLY-VO exibiram efeitos leishmanicidas em formas amastigotas de *Leishmania amazonensis*, sendo que somente a forma complexada ao íon vanadilo exibiu efeitos de inibição sobre o crescimento da forma promastigota (NOLETO et al., 2002). Outra galactomanana extraída de *Trigonella Foenum-graecum* L., uma erva de

leguminosas, foi analisada quanto ao seu potencial em ativar macrófagos e mostrou-se capaz de aumentar sua capacidade fagocítica (RAMESH et al., 2002). Porém, a manana (MPOLY) de levedura e seus complexos com o íon vanadilo (MPOLY-VO, MM-VO) diminuíram a produção de ânion superóxido por macrófagos na presença de PMA; enquanto que, a produção de óxido nítrico mostrou-se aumentada em 55% pela manana (MPOLY), e quando os macrófagos foram incubados com os complexos MPOLY-VO e MM-VO, não houve alteração nesta via (NOLETO et al., 2004 *in press*).

Outro polissacarídeo capaz de alterar algumas funções dos macrófagos, levando-os a um estado de ativação, é uma fucogalactana isolada do cogumelo *Sarcodon aspratus*. Esta fucogalactana levou macrófagos peritoneais de camundongos a liberar quantidades aumentadas de TNF- $\alpha$  e NO *in vitro*; sendo que a produção de TNF- $\alpha$  induzida por 50  $\mu\text{g/ml}$  deste polímero foi significativamente maior que a induzida por 500  $\mu\text{g/ml}$  de lentinana; e seus efeitos sobre a produção de NO se mostraram dose-depente com as concentrações de 5 – 500  $\mu\text{g/ml}$  (MIZUNO et al., 2000).

### 2.6.1. Arabinogalactanas

Arabinogalactanas são uma classe de polissacarídeos, com alto grau de ramificação e de alto peso molecular (HAUER & ANDERER, 1993). Na natureza, as arabinogalactanas são encontradas em muitas plantas (D'ADAMO, 1996), onde podem ocorrer ligadas a proteínas formando as estruturas conhecidas por arabinogalactanas-proteínas, como *Echinacea purpurea*, *Baptisia tinctoria*, *Thuja occidentalis* (EGERT & BEUSCHER, 1992), *Angelica acutiloba* (KIYOHARA et al.,

1989) e *Curcuma longa* (GONDA et al., 1993) e também em microorganismos como em micobactérias onde são complexadas entre peptideoglicanas e ácidos micólicos (McNEIL et al., 1987).

A principal fonte de arabinogalactanas utilizadas comercialmente é a árvore Larch: Western Larch (*Larix occidentalis*) e Mongolian Larch (*Larix dahurica*) (ODONMAZIG et al., 1994). A arabinogalactana originária da árvore Larch é composta por unidades de galactose e arabinose na razão 6:1, com um traço de ácido urônico, o peso molecular das frações principais é de 16000 e 100000. Várias atividades biológicas vêm sendo descritas para as arabinogalactanas (D'ADAMO, 1996). GROMAN et al. (1994) demonstraram que uma arabinogalactana purificada da árvore *Larix occidentalis* pode servir como um carreador para a entrega de drogas no fígado através do receptor de asialoglicoproteínas, visto que, em ratos, esta arabinogalactana se liga tanto *in vivo* como *in vitro* nesse receptor. *In vivo*, esta molécula é internalizada nos hepatócitos por endocitose mediada por receptor, de forma rápida e específica.

Visando analisar quais as regiões imunoreativas de arabinogalactanas-proteínas de algumas plantas medicinais como *Baptisia tinctoria* e *Echinacea purpurea*, experimentos foram realizados para elucidar a especificidade do possível mecanismo de ação de arabinogalactanas de diferentes origens, visto que essas moléculas são capazes de estimular células imunocompetentes como os macrófagos, e esta ativação é ainda acompanhada pela liberação de algumas citocinas. Os autores concluíram que anticorpos produzidos contra arabinogalactanas-proteínas (AGP) de diferentes origens reagem seletivamente com seu antígeno correspondente, ou seja, os antisoros obtidos são altamente

específicos para as AGP de *Baptisia* e *Echinacea*, podendo ser usados para a quantificação desses componentes imunomoduladores (EGERT et al., 1991).

BEUTH et al. (1987) demonstraram com sucesso a utilização de arabinogalactanas como moléculas capazes de bloquear a instalação de células tumorais no fígado de camundongos inoculados com células do Sarcoma L-1, impedindo a formação de metástases. A explicação para este fato é que as lectinas presentes na superfície das células hepáticas funcionam como receptores para os açúcares presentes no glicocálix das células tumorais, facilitando a instalação destas no fígado. Com o uso de injeções prévias e reinjeções regulares de arabinogalactanas ou de D-galactose este processo era impedido, diminuindo drasticamente o aparecimento dos tumores secundários. Curiosamente, a D-galactose exerceu efeitos transitórios de inibição da instalação de células tumorais, isto porque este carboidrato é rapidamente degradado, porém, segundo os autores, a arabinogalactana, por possuir um alto peso molecular e um tempo de meia-vida prolongado na circulação dos animais, proporcionou uma completa inibição do aparecimento de metástases no fígado.

### **2.6.2. *Anadenanthera colubrina* (Angico Branco)**

*Anadenanthera colubrina* é uma espécie da família Leguminosae-Mimosoideae. Apresenta altura de 12-15 m, com tronco de 30-50 cm de diâmetro e ocorre desde o Maranhão até o Paraná e Goiás, na floresta pluvial situada em altitudes superiores a 400 m. A madeira é pesada e útil na construção civil, obras hidráulicas, confecção de dormentes, tabuado, carpintaria, além do seu uso como lenha e carvão. A árvore, por florescer exuberantemente, pode ser aproveitada para

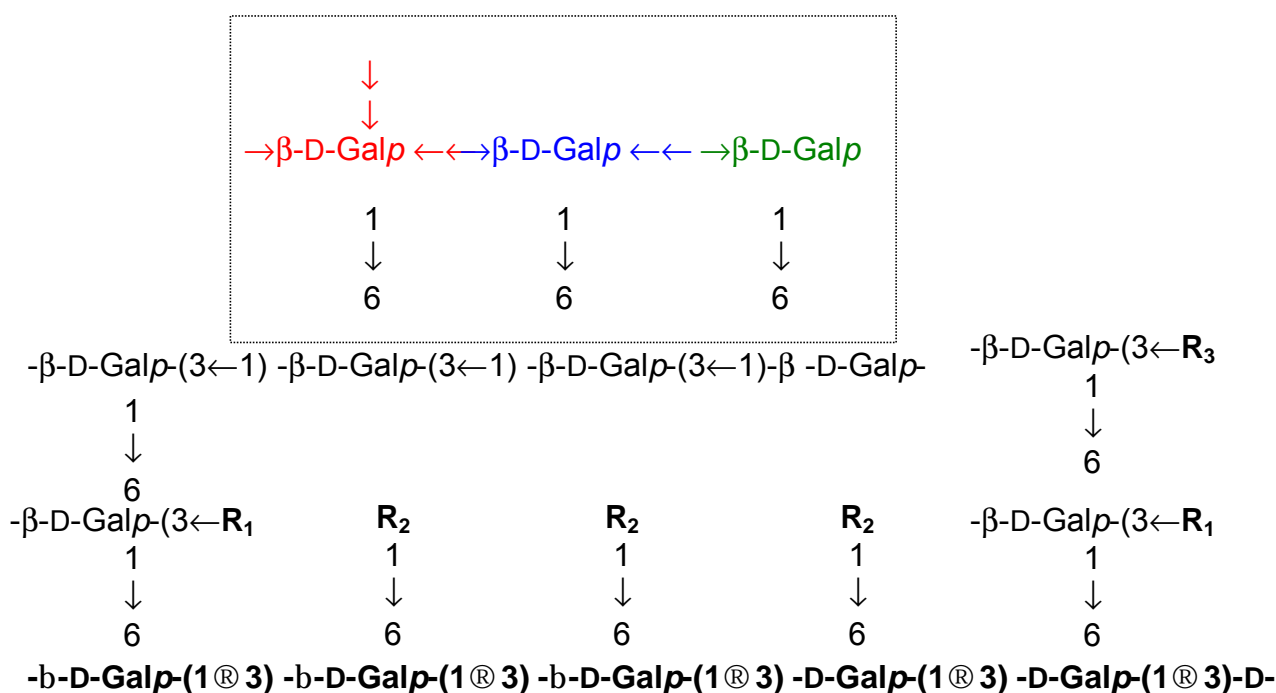
arborização de parques e praças e para o plantio em florestas mistas destinadas a recomposição de áreas degradadas de preservação permanente. Segundo Gert Hatschbach, no Estado do Paraná, aparece em municípios como Rio Branco do Sul, Ponta Grossa, Jaguariaíva, Arapoti, Cianorte, Terra Boa, Santo Antônio da Platina, Cândio de Abreu, Tomazina e outros (DELGOBO, 1999).

A estrutura da arabinogalactana de *A. colubrina* foi determinada por DELGOBO et al. (1998). O polímero é constituído por arabinose, manose, galactose, rhamnose e ácido hexurônico na razão molar de 63:1:20:6:10, e consiste de uma cadeia principal de (1→3)-β-galactopyranose substituída em O-6 por uma variedade de cadeias laterais. A partir do isolamento e caracterização de oligossacarídeos naturais existentes na goma, e de oligossacarídeos caracterizados a partir da hidrólise parcial do polímero, os autores concluíram que a cadeia principal, constituída por β-D-galp (1→3), representa muito pouco do polissacarídeo. A estrutura é altamente ramificada, sendo constituída por muitos ramos de galactobiosídeos 3,6-di-O-substituídos e ramos formados por oligossacarídeos de 3,5 ou 7 unidades, onde α-L-Araf e cadeias de arabinose com diferentes conformações substituem galactose em C-6 ou C-3. A estrutura proposta por DELGOBO et al. (1998) está representada na Figura 1.

Considerando a abundância da árvore angico branco (*A. colubrina*) no Brasil e da arabinogalactana (ARAGAL) desta isolada, um estudo visando avaliar as potenciais atividades biológicas do polímero é relevante. São particularmente importantes aqueles voltados para a modulação de atividade de macrófagos, considerando os efeitos descritos para a arabinogalactana da árvore Larch, a qual ocorre no Canadá.



FIGURA 1: ESTRUTURA DA ARABINOGALACTANA DE *Anadenanthera colubrina* (ARAGAL).



Estrutura da ARAGAL: O heteropolissacarídeo possui uma cadeia principal de  $\beta$ -D-Gal $\rho$  (1 $\rightarrow$ 3) ligada e muitas cadeias laterais diferentes, as quais podem ser compostas por oligossacarídeos de 2, 3, 5 ou 7 unidades ( $\alpha$ -Araf,  $\alpha$ -Rhap e  $\beta$ -Glc $\rho$ A).

$R_1$  são os blocos como o demonstrado dentro do retângulo pontilhado (formados pela combinação de "mini-blocos")

$R_2$  pode ser:

- ( $\alpha$ -L-Araf) $_n$  com n variando de 1 a 3 (substituição em 3);
- $\alpha$ -L-Arap-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Gal $\rho$ - (arabinosil-galactosídeo);
- $\beta$ -L-Ara-(1 $\rightarrow$ 3)-Ara- (oligossacarídeo 5,3);
- Ara-(1 $\rightarrow$ 3)-Ara-(1 $\rightarrow$ 3)-Ara-, em diferentes combinações de anomericidade e forma de anel ( $\rho$  ou  $f$ ); e outro.

$R_3$  pode ser 2 unidades de arabinose (1 $\rightarrow$ 3) ligadas ou 2 "mini-blocos" (1 $\rightarrow$ 3) ligados.

## 2.7. JUSTIFICATIVA DOS OBJETIVOS

Os numerosos estudos mostrando que polissacarídeos de diferentes origens com diferentes estruturas químicas podem atuar como modificadores da resposta biológica (MRB) motivaram o estudo em nosso laboratório da potencial aplicação biológica de polímeros isolados de diferentes fontes, como a  $\alpha$ -D-glucana do líquen *Ramalina celastri*, a qual apresentou atividade citotóxica sobre células HeLa (CARNEIRO LEÃO et al., 1997) e atividade antitumoral sobre células de S-180, e foi capaz de ativar macrófagos peritoneais de camundongos (STUELP-CAMPELO et al., 2002). A isto acrescenta-se também o fato que uma manana isolada de levedura e uma galactomanana também isolada do líquen *Ramalina celastri* foram capazes de ativar macrófagos e induzir à atividade leishmanicida (NOLETO et al, 2002, 2004). Polissacarídeos naturalmente sulfatados ou carboxilados extraídos de algas vermelhas e marrons também apresentaram efeitos citotóxicos sobre células HeLa (STEVAN et al., 2001).

Neste trabalho, em uma triagem realizada previamente, foram testados 11 polissacarídeos diferentes sobre células de melanoma murino B16-F10 respectivamente: Biopolímero de *Anadenanthera colubrina* (angico branco);  $\alpha$ -Biopolímero de *Ramalina usnea* (3/1);  $\alpha$ -Biopolímero-SO<sub>4</sub> de *Ramalina celastri*; Heteropolímero de *Ramalina usnea*;  $\alpha$ -Biopolímero-SO<sub>4</sub> de *Ramalina usnea*;  $\alpha$ -Biopolímero de *Stereocaulon ramulorum*;  $\alpha$ -Biopolímero de *Neuropogon aurantiaroter*;  $\alpha$ -Biopolímero de *Ramalina celastri* (3/1); Biopolímero *Tragacanto*. A opção por um polímero pouco citotóxico nos ensaios *in vitro* era fundamental para a avaliação dos efeitos biomoduladores. Considerando os discretos efeitos *in vitro* causados sobre a linhagem B16-F10, o biopolímero de *Anadenanthera colubrina*

(angico branco) foi selecionado para dar andamento aos estudos de suas propriedades biológicas em macrófagos e outros modelos tumorais. Para isso a estratégia utilizada está representada na figura 2.

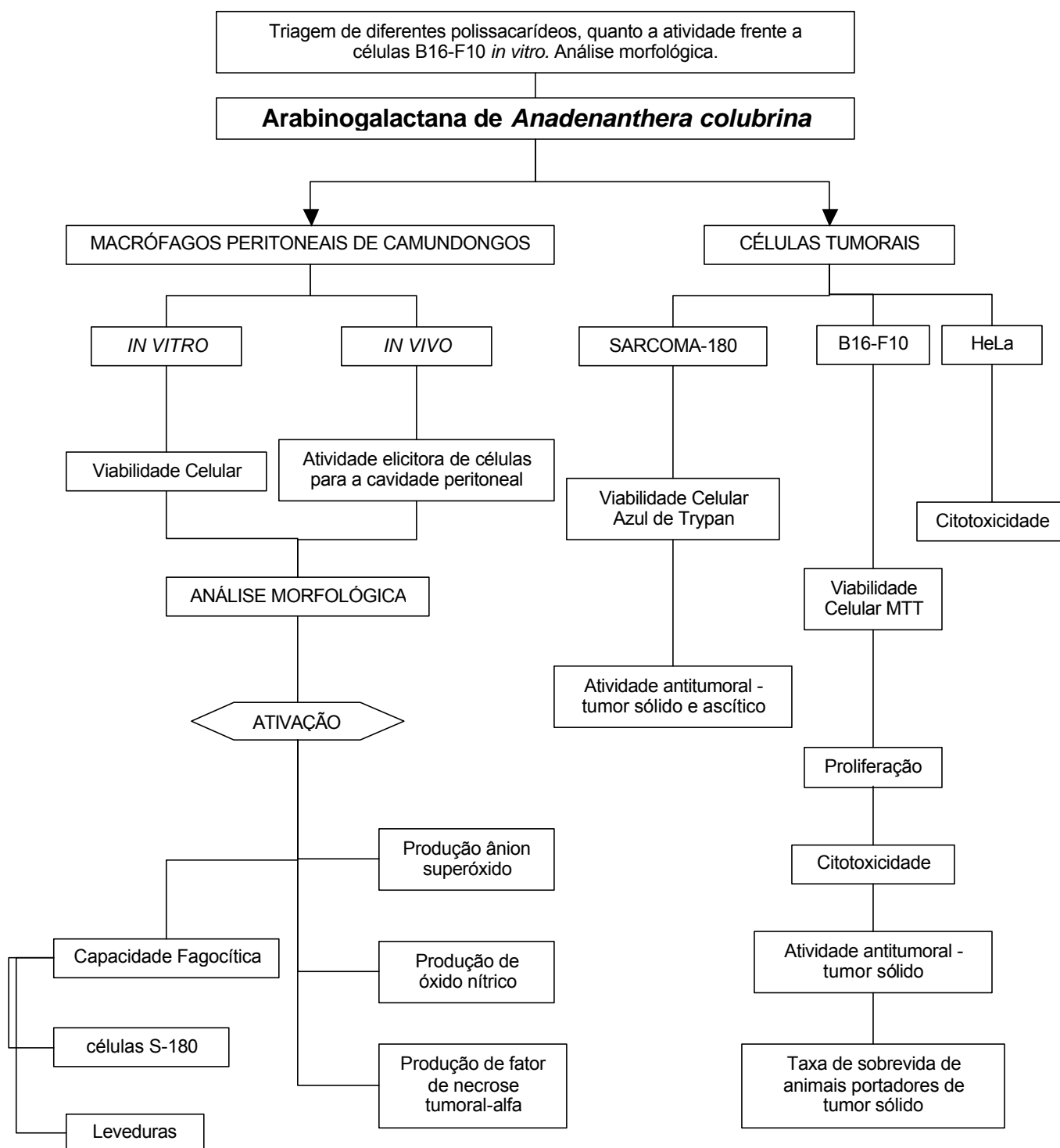
### 3. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo principal avaliar potenciais atividades biológicas da arabinogalactana (ARAGAL) isolada de *Anadenanthera colubrina*, tendo objetivos específicos:

- (a) Avaliar os efeitos *in vitro* de ARAGAL sobre macrófagos peritoneais de camundongos quanto a capacidade de ativação e capacidade fagocítica;
- (b) Avaliar os efeitos *in vivo* de ARAGAL sobre macrófagos peritoneais de camundongos quanto: a atividade elicitora de células, capacidade de ativação quanto a produção de ânion superóxido ( $O_2^-$ ), óxido nítrico (NO) e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ );
- (c) Avaliar os efeitos *in vitro* de ARAGAL sobre os modelos tumorais: Sarcoma-180, melanoma B16-F10 e células HeLa;
- (d) Avaliar os efeitos *in vitro* e *in vivo* de ARAGAL sobre células do Sarcoma-180.

#### 4. ESTRATÉGIA GERAL

**FIGURA 2:** Estratégia geral de trabalho



Representação esquemática da estratégia metodológica utilizada para realização dos objetivos desta tese.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1. MATERIAIS E REAGENTES

- Reagentes obtidos da Merck do Brasil: HCl, NaNO<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, dimetilsulfoxido (DMSO), Entellan, triton X-100, Coomassie Brilliant Blue G-250.
- Reagentes obtidos da Sigma Chemical Co (St Louis, MO): Citocromo c de coração bovino, brometo de (3-metil[4-,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio (MTT), forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), ácido N-2[-4-hidroxietyl piperazina N 2-etano sulfônico (HEPES), superóxido dismutase (SOD), naftiletlenodiamino, p-aminobenzeno sulfonamina, albumina bovina (BSA), lipopolissacarídeo (LPS), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), azul de Trypan.
- Reagentes obtidos da Cultilab (Campinas, SP): penicilina, estreptomicina, gentamicina, meio Eagle medium (MEM), soro fetal bovino (SFB).
- Materiais obtidos da Millipore<sup>®</sup>: filtros Millex descartáveis de 0,45 µm e 0,22 µm de poro, membranas de acetato de celulose de 0,22 µm de poro.
- Materiais obtidos da Inlab: polimixina, papel filtro TP10-INLAB,
- Materiais obtidos da Corning: placas de cultura estéreis de 12, 24 e 96 poços, garrafas de cultura estéreis de 75 e 150 cm<sup>3</sup>.

## **5.2. MÉTODOS**

### **5.2.1. Procedimento de esterilização de material de vidro e acessórios**

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

### **5.2.2. Solução do polissacarídeo ARAGAL**

A arabinogalactana (ARAGAL) de *Anadenanthera colubrina* utilizada no presente trabalho foi isolada, caracterizada e gentilmente cedida por Delgobo et al. (1999).

ARAGAL foi dissolvida em solução de PBS pH 7,4, pré-filtrada em papel filtro TP10-Inlab, em seguida filtrada em membranas descartáveis Millex (Millipore®) de 0,45 µm de poro e esterilizada por filtração em membranas para esterilização (0,22 µm) descartáveis Millex (Millipore®). As soluções estéreis de ARAGAL foram armazenadas em frascos de vidro estéreis a 4°C.

### **5.2.3. Soluções e Meios de Cultura utilizados nos Procedimentos de Cultivo Celular**

#### **5.2.3.1. Solução salina tamponada (PBS)**

A solução salina-fosfato tamponada (PBS) foi preparada como solução estoque cinco vezes concentrada. Esta solução concentrada era constituída por 680

mmol.L<sup>-1</sup> de NaCl, 13,4 mmol.L<sup>-1</sup> de KCl, 40,5 mmol.L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 7,3 mmol.L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e pH ajustado para 7,4. A solução foi esterilizada em autoclave (120 °C, 1 atm, 30 minutos) e armazenada a 4°C. No momento do uso, a solução foi diluída com água bidestilada estéril, recém-preparada em aparelho Corning Glass Work, modelo AG 10a.

### **5.2.3.2. Solução balanceada de Hanks (HBSS)**

A solução balanceada de Hanks (HBSS) é constituída da mistura das soluções A e B, as quais foram preparadas como soluções estoque (concentradas 20X) e armazenadas a 4°C. A solução A é constituída de 2,73 mmol.L<sup>-1</sup> de NaCl, 107 mmol.L<sup>-1</sup> de KCl, 25 mmol.L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub>, 27 mmol.L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O. A solução B é constituída de 8,5 mmol.L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 111 mmol.L<sup>-1</sup> de glicose. As duas soluções foram preparadas em água bidestilada em volume de 50 mL e armazenadas a 4°C. No momento do uso, as soluções A e B foram misturadas (1:1), diluídas com água bidestilada e o pH foi ajustado para 7,4. A solução de Hanks foi esterilizada por filtração em membranas estéreis com poros de 0,22 µm (Millipore®) em câmara de fluxo laminar vertical (VECO).

### **5.2.3.3. Meio de cultura**

O meio de cultura utilizado foi o meio essencial mínimo de Eagle (MEM, Cutilab, Campinas, Brasil), o qual após reconstituição em água MilliQ, foi esterilizado por filtração sob pressão com membrana de acetato de celulose estéril (0,22 µm) (Millipore®) em aparelho Sartorius. Após o procedimento de filtração, alíquotas do meio foram deixadas em estufa a 37°C, para um acompanhamento do



eventual aparecimento de contaminações, por todo o tempo do uso da partida esterilizada. O meio foi mantido congelado ou em geladeira a 4°C. Para os experimentos os meios foram suplementados com quantidade adequada de soro fetal bovino estéril (Laborclin), previamente inativado a 56°C em banho-maria por 30 minutos. O pH do meio foi ajustado com solução de bicarbonato de sódio (7,5%, p/v) esterilizado em autoclave a 120°C e 1 atm por 30 minutos, e para o tamponamento do meio em pH 7,4 foi utilizado HEPES 20 mmol.L<sup>-1</sup> esterilizado por filtração em membrana de acetato-nitrato de celulose com póros de 0,22 µm (Millipore®). Além desses componentes, foram adicionados os seguintes antibióticos, 100 U.mL<sup>-1</sup> de penicilina, 100 µg.mL<sup>-1</sup> de estreptomicina e 50 µg.mL<sup>-1</sup> de gentamicina. Nestas condições esta solução foi denominada meio de crescimento (MC).

#### **5.2.3.4. Solução de tripsina-EDTA**

A solução de tripsina-EDTA foi constituída de 137 mmol.L<sup>-1</sup> de NaCl, 5,4 mmol.L<sup>-1</sup> de KCl, 5 mmol.L<sup>-1</sup> de glucose, 0,42 mmol.L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,44 mmol.L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,3 mmol.L<sup>-1</sup> de NaHCO<sub>3</sub>, 0,53 mmol.L<sup>-1</sup> de EDTA, 50 mg% de tripsina (1:250) e 2 mg% de vermelho de fenol, sendo o pH ajustado para 7,4. A solução foi esterilizada por filtração sob pressão com membrana de acetato de celulose estéril de 0,22 µm de poro (Millipore®) em aparelho Sartorius. Após a retirada de alíquotas para testes de esterilidade, a solução de tripsina foi armazenada em frascos de vidro estéreis e mantida a -20 °C.

### **5.3. MÉTODOS GERAIS**

#### **5.3.1. Dosagem de Proteínas**

O procedimento de dosagem de proteína celular total foi realizado pelo método de BRADFORD (1976), o qual baseia-se na ligação do corante Coomassie Brilliant Blue G-250 com moléculas de proteínas da amostra, formando um complexo de cor azul (COMPTOM e JONES, 1985). A solução estoque do corante foi preparada pela dissolução de 40 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 em 20 mL de etanol absoluto, 40 mL de ácido orto-fosfórico a 85% (v/v) e água bidestilada até o volume de 100 mL.

Para a dosagem de proteína, as monocamadas de células aderidas nas placas de cultura foram lavadas quatro vezes com PBS pré-aquecido a 37°C para remoção do meio residual. Em seguida adicionou-se 100 µL de solução 0,2% (v/v) de triton X-100, seguindo-se a incubação por 40 minutos a 60 °C. A proteína celular total foi então dosada, transferindo-se 10 µL da amostra para tubos de ensaio, adicionando-se então o reativo de Bradford diluído na proporção de 1:4 em água MilliQ. Após 5 minutos, 200 µL da mistura reagente foi transferido para placas de 96 poços, e a absorbância foi determinada em 595 nm em leitor de microplacas BIO-RAD modelo Benchmark, contra um branco contendo a quantidade equivalente da solução de triton X-100.

#### **5.3.2. Dosagem de Carboidratos**

A quantificação das soluções de ARAGAL quanto ao teor de carboidratos foi realizada antes e após os procedimentos de esterilização, com a finalidade de

detectar possíveis perdas durante o processo. O método de DUBOIS e colaboradores (1956), também conhecido como método de fenol-ácido sulfúrico, foi utilizado. Este método consiste na formação dos derivados furfural e hidroximetilfurfural a partir das pentoses e hexoses, respectivamente, na presença de ácido sulfúrico, que reage com o fenol formando um complexo de cor alaranjada. Utilizou-se o protocolo original do método, onde se mistura 0,5 mL da amostra, 0,5 mL da solução aquosa de fenol 5% (v/v) e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Após agitação e resfriamento, foi realizada a leitura espectrofotométrica a 490 nm. Os cálculos de concentração foram feitos através de curva de calibração utilizando-se solução padrão de glucose.

#### **5.4. ANIMAIS**

Camundongos albinos Swiss machos (*Mus musculus*), com aproximadamente 2 meses de idade, pesando de 25-30 g, foram utilizados nos experimentos envolvendo diferentes efeitos biológicos sobre macrófagos peritoneais *in vivo* e *in vitro*, e nos experimentos envolvendo o Sarcoma-180. Camundongos da linhagem C57BL6 (“black”), com aproximadamente 2 meses de idade, pesando de 25-30 g, foram utilizados nos experimentos envolvendo o melanoma B16-F10. Os animais foram mantidos no Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, submetidos a ciclos de 12 horas de luz e 12 horas no escuro, sempre com água e ração Purina® *ad libitum*. Os procedimentos tiveram o parecer formal da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

## 5.5. CÉLULAS

No presente trabalho, foram utilizadas as seguintes células: macrófagos isolados da cavidade peritoneal de camundongos, células do Sarcoma-180, células de melanoma B16-F10 e células HeLa. Com exceção dos macrófagos, que foram utilizados a partir de isolamentos primários, as outras linhagens celulares citadas tiveram as condições de cultivo adaptadas para o Laboratório de Cultivo Celular do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR.

### 5.5.1. Obtenção de Macrófagos

Para obtenção dos macrófagos peritoneais, os animais foram mortos por asfixia em câmara de vidro contendo algodão embebido em éter etílico. Após assepsia com álcool etílico 70% (v/v) e exposição do peritônio, com auxílio de seringa e agulha estéreis, foi inoculado na cavidade peritoneal 10 mL de PBS estéril a 25°C e, após suave massagem da cavidade peritoneal, as células do exsudato peritoneal (PEC) foram aspiradas e acondicionadas em tubos plásticos estéreis, mantidos à 4°C até utilização. A seguir, as células foram centrifugadas (Hitachi CR21E) à 1080 g por 6 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o “pellet” de células foi ressuspenso em PBS estéril. Após contagem do número de células em câmara de Neubauer, o volume da suspensão foi então ajustado de forma a se obter o número de células desejado para cada um dos experimentos. Em seguida, as células foram plaqueadas em placas de cultura estéreis de 12, 24 ou 96 poços, de acordo com a condição experimental desejada, e colocadas para aderir durante 30 minutos à 37°C sob atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>. Após esse tempo, a monocamada de células aderentes foi então lavada por duas vezes com solução de PBS estéril pré-

aquecida a 37°C, para a remoção das células não aderentes. Por este método, acima de 90% das células aderidas são macrófagos, não sendo necessário posterior purificação das preparações (ADAMS, 1979; HAWORTH e GORDON, 1998). Após esta etapa, as condições dos experimentos variaram conforme a necessidade experimental desejada. A monocamada de células foi rotineiramente observada em microscópio invertido (Olympus mod. KW1).

### **5.5.2. Células do Sarcoma-180 (S-180)**

As células do S-180 foram obtidas do Instituto Nacional do Câncer, RJ, e foram propagadas como tumores ascíticos nos camundongos. Para a manutenção da linhagem, foram realizados repiques intraperitoneais semanais como descrito por YAMADA *et al.* (1984), sendo utilizados três animais por repique semanal.

Para realização dos repiques, animais portadores do tumor ascítico desenvolvido por 7 dias foram sacrificados por asfixia em câmara de vidro contendo algodão embebido em éter etílico. Após exposição do peritônio, foram inoculados 5mL de PBS estéril e, após massagem da cavidade peritoneal, o fluido peritoneal contendo as células do S-180 foi aspirado e mantido à 4°C até a utilização. Em seguida, foi realizada a contagem das células viáveis através do método de exclusão do azul de Trypan (PHILLIPS, 1973). O número de células foi então ajustado para  $10^6$  células viáveis do S-180/mL, e então 1 mL desta suspensão era inoculado intraperitonealmente em outros 3 animais saudáveis. Este procedimento foi repetido a cada 7 dias.

### 5.5.3. Células de melanoma B16-F10

Células B16-F10 provenientes da Fundação Ludwig, SP, foram gentilmente repassadas para o Laboratório de Cultivo Celular do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR, pelo Prof. Dr. Sílvio Sanches Veiga, onde foram mantidas congeladas em nitrogênio líquido. Suspensões celulares ( $10^7$ .mL<sup>-1</sup>) foram suspensas em meio de armazenamento composto por meio de cultura, acrescido de soro fetal bovino (SFB) 40% (v/v) e DMSO 10% (v/v), congeladas a -70°C, e a seguir em nitrogênio líquido. Para uso, as células foram descongeladas a 37 °C e semeadas no meio de crescimento (MC). Após adesão das células à superfície da garrafa (~4h), o meio foi trocado, eliminando-se o meio de congelamento contendo o DMSO e eventuais células mortas. As células cresceram em meio de crescimento (MC) suplementado com 7,5% de SFB e antibióticos, como já citado no item 5.5.2. Para os repiques, o MC foi descartado e as monocamadas confluentes foram descoladas das garrafas de cultivo por tratamento com solução de tripsina-EDTA. Quando o início do descolamento das células foi detectado, a solução de tripsina-EDTA foi descartada e as células foram lavadas com MC. Após suspensas nesse meio, as células eram então distribuídas em novas garrafas de cultura estéreis e crescidas em estufa a 37°C. A monocamada de células foi rotineiramente observada em microscópio invertido (Olympus, mod. KW1).

### 5.5.4. Células HeLa

Células HeLa provenientes da ATCC (“American Type Cell Collection”) e obtidas do Instituto Adolfo Lutz, SP, foram mantidas congeladas em nitrogênio líquido, no Laboratório de Cultivo Celular do Departamento de Bioquímica e Biologia

Molecular da UFPR. Suspensões celulares ( $10^7 \cdot \text{mL}^{-1}$ ) em meio de armazenamento composto por meio de cultura, acrescido de soro fetal bovino 40% (v/v) e DMSO 10% (v/v) foram congeladas inicialmente a  $-70^\circ\text{C}$ , e a seguir em nitrogênio líquido. Para uso, as células foram descongeladas a  $37^\circ\text{C}$  e semeadas no meio de crescimento (MC). Após adesão das células à superfície da garrafa ( $\sim 4\text{h}$ ), o meio foi trocado, eliminando-se o meio de congelamento contendo o DMSO e eventuais células mortas. Para os repiques celulares, o MC foi descartado e as monocamadas confluentes foram descoladas das garrafas de cultivo por tratamento com a solução de tripsina-EDTA. Quando o início do descolamento das células foi detectado, a solução de tripsina-EDTA foi descartada e as células foram lavadas e suspensas em novo MC. A suspensão celular era então distribuída em novas garrafas de cultura estéreis novamente cultivadas em estufa a  $37^\circ\text{C}$  (BASTOS et al., 1990). A monocamada de células foi rotineiramente observada em microscópio invertido (Olympus, mod. KW1).

## **5.6. DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR**

### **5.6.1. Método do Azul de Trypan**

A determinação da viabilidade celular por este método foi realizada para análise da viabilidade das células de melanoma B16-F10, como descrito por PHILIPS (1973). Para tanto, suspensões celulares ( $5 \times 10^5$  células/poço) foram plaqueadas em placas de 12 poços e incubadas à  $37^\circ\text{C}$  em MC durante 1 h em estufa com atmosfera de 5%  $\text{CO}_2$  na ausência ou presença de concentrações variadas de ARAGAL (10 - 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Em seguida, este meio foi retirado e

centrifugado a 1080 g por 6 minutos e as células que se desprenderam durante este procedimento foram lavadas duas vezes com PBS. As células que permaneceram aderidas a placa de cultura foram submetidas a descolamento pela incubação com solução de EDTA 2 mmol.L<sup>-1</sup> a 37°C e em estufa com atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>, durante 10 minutos. Após o descolamento, estas foram centrifugadas a 1080 g por 6 minutos e lavadas duas vezes com PBS. Em seguida estes dois grupos de células, as que estavam no sobrenadante e aquelas liberadas da placa de cultivo, foram reunidas em uma mesma suspensão e a viabilidade celular foi então determinada pelo método de Azul de Trypan. Este teste de viabilidade utiliza como princípio a exclusão do corante vital Azul de Trypan (PHILIPS, 1973). Este corante foi preparado na concentração de 0,4% (p/v) em PBS, e utilizado na proporção de 1:10 (corante:amostra), por tempo máximo de 4 minutos. A contagem das células viáveis e não viáveis foi realizada em microscópio invertido (Olympus, mod. KW1) utilizando-se câmara de Neubauer. O percentual de viabilidade foi calculado conforme a equação:

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

Onde: CV = células viáveis, NC = células não coradas, C = células coradas pelo Azul de trypan. A viabilidade dos controles foi normalizada para 100%.

### 5.6.2. Método do MTT

A determinação da viabilidade celular pelo método do MTT (brometo de (3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio) foi realizada de acordo com a metodologia descrita por REILLY et al. (1998). Segundo o princípio do método, as



células viáveis e metabolicamente ativas reduzem o sal tetrazólio, formando cristais de formazan solúveis em DMSO, possuindo cor roxa característica.

Para análise da viabilidade as células foram incubadas por 3 h a 37 °C em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> em 180 µL de HBSS mais 20 µL de solução de MTT a 5 mg.mL<sup>-1</sup>, de modo a obter-se uma concentração final em MTT de 500 µg.mL<sup>-1</sup>. A seguir, o excesso de MTT foi removido e os cristais de formazan formados foram dissolvidos em DMSO. A leitura da absorbância em 550 nm, com filtro de 655 nm com referência, foi realizada em leitor de microplacas BIO-RAD modelo Benchmark, utilizando-se o solvente DMSO como branco (REILLY et al., 1998).

## 5.7. MICROSCOPIA DE LUZ

As monocamadas de células crescidas sobre lamínulas de vidro foram fixadas em Bouin por 5 min. Este fixador é preparado na forma de solução estoque, composta por 300 mL de solução aquosa saturada de ácido pícrico e 100 mL de formol. No momento do uso, para cada 20 mL desta solução estoque, adicionou-se 1 mL de ácido acético. Após a fixação, as lamínulas foram lavadas duas vezes em etanol 70% (v/v) e em seguida coradas em Giemsa por 2 – 3 horas. Para o preparo deste corante foram utilizados 3,8 g do corante Giemsa, diluídos em 250 mL de álcool metílico e 250 mL de glicerina. O excesso de corante foi então retirado e as lamínulas foram lavadas duas vezes com água bidestilada, desidratadas e pré-diafanizadas em soluções de acetona e xilol nas seguintes proporções: mistura a: 2 acetona : 1 xilol, mistura b: 1 acetona : 1 xilol, mistura c: 1 acetona : 2 xilol. Em seguida, as lamínulas foram submetidas a duas lavagens em xilol puro e montadas

em lâminas de vidro com Entelan. As lâminas foram observadas em microscópio óptico Olympus BHS.

Os órgãos (coração, pulmão, fígado, rim e baço), após serem dissecados cuidadosamente dos animais, foram lavados duas vezes em PBS estéril, fixados em ALFAC (85 mL de etanol a 80% (v/v), 10 mL de formol e 5 mL de ácido acético) durante 16 h, desidratados em concentrações crescentes de etanol (etanol 70% por 24 h, etanol 90% por 1 h, etanol 95% por 1 h e etanol 100% por 1 h (4 vezes). Após a desidratação, as peças histológicas foram diafanizadas por 1 hora em uma solução de etanol e xilol, na proporção de 1:1 e posteriormente em 3 banhos de xilol puro, cada um durante 40, 30 e 15 minutos respectivamente. Finalmente, as peças foram submetidas a dois banhos de parafina fundida à 60°C por 2 h cada um, e então, os órgãos foram submetidos a inclusão em parafina fundida à 60 °C, e posterior solidificação em freezer -20°C , por 1 h. Os cortes histológicos foram realizados em micrótomo com a espessura de 4 µm, e montados em lâmina de vidro. Os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol (2 banhos de 10 min.), e lavados em água corrente. O cortes histológicos dos órgãos foram corados em Solução de Prata Amoniacal durante 1 h à 60 °C. Esta solução foi preparada pela dissolução de 2 g de nitrato de prata em 20 mL de água bidestilada, seguindo-se a adição de hidróxido de amônio gota-a-gota até que a solução ficasse transparente, acrescentando-se então mais 20 mL de água bidestilada. Após corados, os cortes foram lavados 4 vezes em água bidestilada, tratados com solução de tiosulfato de sódio à 5% (p/v) por 2 minutos à 25 °C , lavados novamente em água bidestilada (2 vezes) e corados com vermelho neutro por 20 minutos à 25 °C. Após mais 3 lavagens em água bidestilada,

os cortes histológicos foram então desidratados em concentrações crescentes de etanol, diafanizados em xilol e montados em meio Permount com lamínula de vidro.

## **5.8. EXPERIMENTOS COM MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS**

### **5.8.1. Efeito *in vitro* de ARAGAL na viabilidade celular**

Células do exudato peritoneal foram obtidas como já descrito no item 5.5.1. Em placas de 96 poços, macrófagos aderentes foram cultivados na presença de diferentes concentrações de ARAGAL (10 – 300  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), no grupo controle os macrófagos foram cultivados na ausência do polissacarídeo. Após 1, 2, 3, 4, ou 5 horas, o meio foi retirado e a viabilidade da monocamada de macrófagos foi avaliada segundo o método do MTT conforme descrito anteriormente (item 5.6.2).

### **5.8.2. Efeito de ARAGAL na atividade elicitora de células**

Para a determinação da atividade elicitora de ARAGAL, foram utilizados grupos de 4 camundongos albinos Swiss. Os animais do grupo controle receberam intraperitonealmente (i.p.) PBS estéril enquanto que os animais do grupo tratado receberam 50, 100 ou 200  $\text{mg.kg}^{-1}$  de ARAGAL. Após 24 h, os animais foram sacrificados por asfixia com éter etílico e as células do exudato peritoneal foram obtidas como descrito no item 5.5.1. O número de macrófagos no fluido peritoneal de cada um dos animais de ambos os grupos foi contado em câmara de Neubauer em microscópio invertido (Olympus, mod. KW1).

### **5.8.3. Efeito de ARAGAL na ativação: ensaios *in vitro* e *in vivo***

#### **5.8.3.1. Ensaio *in vitro***

Células do exudato peritoneal, obtidas como descrito no item 5.5.1, foram plaqueadas na densidade de  $5 \times 10^5$  células por poço em placas de cultura de 24 poços contendo lamínulas de vidro estéreis. Os macrófagos do grupo tratado com ARAGAL foram cultivados em MC acrescido de diferentes concentrações do polissacarídeo: 10, 25, 50, 100, 200 e  $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , enquanto que os macrófagos do grupo controle foram cultivados apenas em MC. Após 24 ou 48 h em estufa a  $37^\circ\text{C}$  e atmosfera de 5%  $\text{CO}_2$ , o sobrenadante foi descartado, as lamínulas contendo as monocamadas de macrófagos foram lavadas duas vezes em PBS e processadas para microscopia de luz como descrito no item 5.7.

#### **5.8.3.2. Ensaio *in vivo***

Nos experimentos visando avaliar a ativação de macrófagos *in vivo*, foram utilizados grupos de 10 camundongos. Os animais do grupo controle foram inoculados com PBS estéril (i.p.), enquanto que os animais do grupo tratado foram inoculados (i.p.) com 100, 250 ou  $500 \text{mg.kg}^{-1}$  de ARAGAL. Sete dias após a inoculação, os animais de ambos os grupos foram sacrificados e as células do exudato peritoneal foram obtidas como descrito no item 5.5.1 e plaqueadas na densidade de  $5 \times 10^5$  células por poço em placas de cultura de 24 poços contendo lamínulas de vidro estéreis. Os macrófagos de ambos os grupos foram cultivados durante 24 h em MC à  $37^\circ\text{C}$ , em atmosfera de 5 %  $\text{CO}_2$ , em seguida o sobrenadante foi descartado, as lamínulas contendo as monocamadas de macrófagos foram

lavadas 2 X em PBS e processadas para microscopia de luz como descrito no item 5.7.

#### **5.8.4. Efeito de ARAGAL na capacidade fagocítica**

A capacidade fagocítica foi avaliada de acordo com a metodologia descrita por RAMESH *et al.* (2002) e BUCHI *et al.* (1993), utilizando leveduras como partículas fagocíticas. As leveduras, obtidas a partir de fermento biológico, foram preparadas por 3 lavagens consecutivas em PBS estéril, pH 7,4 e mantidas a 4 °C até utilização. Para o ensaio de fagocitose, as células do exudato peritoneal foram obtidas como já descrito (item 5.5.1) e plaqueadas na densidade de  $5 \times 10^5$  células por poço em placas de cultura de 24 poços contendo lamínulas de vidro estéreis. Os macrófagos do grupo tratado com ARAGAL foram cultivadas em MC acrescido de diferentes concentrações do polissacarídeo: 25, 50 e 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , enquanto que os macrófagos do grupo controle foram cultivados em MC na ausência do polissacarídeo. Após 24 h, o sobrenadante foi descartado e as lamínulas contendo as monocamadas de macrófagos foram lavadas duas vezes em meio MEM com antibióticos e sem SFB. Em seguida, as lamínulas foram incubadas com leveduras na proporção de 10 leveduras para cada macrófago. Após 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos as lamínulas foram lavadas três vezes com PBS, para retirada das leveduras que não foram fagocitadas, e processadas para microscopia de luz conforme descrito no item 5.7.1. Utilizando objetiva de 1000 vezes de aumento, foram contados o número total de macrófagos, o número de macrófagos que fagocitaram leveduras e o número de leveduras fagocitadas. Os resultados foram

expressos como índice endocítico (IE) que foi determinado de acordo com BUCHI et al. (1993) e RAMESH et al. (2002) com a seguinte fórmula:

$$IE = \frac{L_f}{\frac{M\emptyset S_f \cdot M\emptyset S_f}{M\emptyset S_T}}$$

Onde: IE = índice endocítico,  $L_f$  = número de leveduras fagocitadas,  $M\emptyset S_f$  = número de macrófagos que fagocitaram,  $M\emptyset S_T$  = número de macrófagos totais.

#### **5.8.5. Produção de ânion superóxido por macrófagos peritoneais de camundongos tratados com ARAGAL**

Foram utilizados grupos de 10 camundongos albinos Swiss. Os animais do grupo controle foram inoculados com PBS estéril (i.p.), enquanto que os animais do grupo tratado foram inoculados (i.p.) com 100 ou 200 mg.kg<sup>-1</sup> de ARAGAL. Sete dias após a inoculação, os animais de ambos os grupos foram sacrificados e as células do exudato peritoneal foram obtidas como já descrito e plaqueadas na densidade de  $5 \times 10^5$  células por poço em placas de cultura de 96 poços. Após o período de 30 minutos, necessário para aderência dos macrófagos, as monocamadas dos grupos tratados com ARAGAL e do grupo controle foram incubadas com o meio de reação constituído de HBSS e ferricitocromo c ( $80 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) (SASADA et al., 1983). Em cada um dos grupos, a metade dos poços contendo macrófagos foram incubados na presença  $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de PMA no meio de reação, a outra metade na ausência de PMA. Após a incubação por 15, 30, 45 ou 60 minutos, 150  $\mu\text{L}$  do meio de reação dos diferentes grupos foi transferido para outra placa e a absorbância em 550 nm foi medida em leitor de microplacas Bio-RAD modelo Benchmark. A concentração de

citocromo c reduzido, que corresponde a concentração de ânion superóxido produzido pelos macrófagos, foi determinada utilizando o Coeficiente de Extinção Molar para a mistura citocromo  $C_{\text{oxid.red.}} \Delta \epsilon = 2,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (JOHNSTON et al., 1978).

#### **5.8.6. Produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais de camundongos tratados com ARAGAL**

Para avaliação da produção de NO por macrófagos de animais tratados com ARAGAL, foram utilizados grupos de 10 camundongos albinos Swiss. Os animais do grupo controle foram inoculados com PBS estéril (i.p.), enquanto que os animais do grupo tratado foram inoculados (i.p.) com  $200 \text{ mg.kg}^{-1}$  de ARAGAL. Sete dias após o tratamento, os animais de ambos os grupos foram sacrificados e as células do exudato peritoneal, obtidas como descrito no item 5.5.1, foram plaqueadas na densidade de  $5 \times 10^5$  células por poço em placas de cultura de 96 poços. Após o período de 30 minutos, as monocamadas do grupo tratado com ARAGAL e do grupo controle foram incubadas em MC na presença ou ausência de  $50 \text{ ng.mL}^{-1}$  de LPS +  $26 \text{ U.mL}^{-1}$  de IFN- $\gamma$ . Após 24 horas em estufa a  $37^\circ\text{C}$  e atmosfera de 5 %  $\text{CO}_2$ ,  $100 \mu\text{L}$  do sobrenadante foi transferido para outra placa, procedendo-se a dosagem de NO com uso do reagente de Griess (GREEN et al., 1982). Este é constituído pela mistura de duas soluções A e B na proporção 1:1, imediatamente antes do uso. A solução A é constituída por: naftiletlenodiamino 0,1% (p/v) em ácido orto-fosfórico 5% (v/v), e a solução B por sulfonamina *p*-aminobenzeno 1% (p/v) em ácido fosfórico 5% (v/v).

Aos 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  do reagente de Griess seguindo-se incubação por 10 minutos. A absorbância em 550 nm foi medida em leitor de microplacas Bio-RAD modelo Benchmark. A concentração de nitrito foi determinada utilizando uma curva padrão de  $\text{NaNO}_2$ . Alternativamente, ARAGAL foi previamente tratada com polimixina B ( $50 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ) por 40 minutos antes do uso.

#### **5.8.7. Produção de TNF- $\alpha$ por macrófagos peritoneais de camundongos tratados com ARAGAL**

Na avaliação da produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos peritoneais de camundongos, foram utilizados grupos de 10 camundongos (Swiss). Os animais do grupo controle foram inoculados com PBS estéril (i.p.), enquanto que os animais do grupo tratado foram inoculados (i.p.) com  $100 \text{ mg}.\text{kg}^{-1}$  de ARAGAL. Um terceiro grupo de animais foi inoculado com  $50 \mu\text{g}.\text{kg}^{-1}$  de LPS, servindo como controle positivo. Uma ou 24 h após a inoculação, os animais foram sacrificados por asfixia com éter etílico e o fluido peritoneal foi coletado com 2 mL de PBS estéril e mantido a  $4^\circ\text{C}$ . Em seguida o fluido peritoneal foi centrifugado a 1080 g por 6 minutos, o “pellet” de células foi descartado e o sobrenadante foi congelado à  $-70^\circ\text{C}$  até o uso.

Os níveis de TNF- $\alpha$  no fluido peritoneal foram medidos por “enzyme-linked immunosorbent assay” (ELISA) (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA), segundo as especificações dos fabricantes. Nestas determinações, placas de 96 poços foram cobertas com 100  $\mu\text{L}$  de anticorpo anti-TNF- $\alpha$  de camundongo ( $1 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ) e incubadas 12 h a  $25^\circ\text{C}$ . Após esse tempo, TNF- $\alpha$  recombinante murino ( $31,2 - 2000 \text{ pg}.\text{mL}^{-1}$ ) e as amostras coletadas dos animais (diluídas 1:2) foram adicionadas aos poços e as placas foram novamente incubadas por mais 12 h a  $25^\circ\text{C}$ . Após, a



solução de PBS contendo 1% de soro albumina bovina (p/v) (BSA), 5% (p/v) sacarose and 0.05% (p/v)  $\text{NaN}_3$  foi adicionada a cada um dos poços e incubada por 1 h. Após 3 lavagens com o tampão de lavagem, composto por PBS e Tween 20 a 0,05% (v/v), 100  $\mu\text{L}$  de anticorpo anti-TNF- $\alpha$  de camundongo biotililado ( $50 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) foi adicionado em cada poço da placa. A placa foi então incubada por 2 h à temperatura ambiente. Após a remoção do anticorpo biotililado em excesso e 3 lavagens em tampão de lavagem, 100  $\mu\text{L}$  de solução de estreptoavidina HRP foi adicionado em cada poço e a placa foi levada à  $25^\circ\text{C}$  por 20 minutos. Em seguida 100  $\mu\text{L}$  de solução de substrato contendo peróxido de hidrogênio e tetrametilbenzidina foi adicionado aos poços e incubado por 25 minutos para o desenvolvimento da reação de cor, em seguida foi adicionado 50  $\mu\text{L}$  de solução de ácido sulfúrico  $1 \text{ mol.L}^{-1}$ . A densidade óptica foi determinada em 450 nm usando um leitor de microplacas (Sunrise Touchscreen, TECAN, Crailsheim, Germany).

## **5.9. EXPERIMENTOS COM CÉLULAS DO SARCOMA-180 (S-180)**

### **5.9.1. Efeito *in vitro* de ARAGAL na viabilidade de células do S-180**

Células do S-180, obtidas de camundongos portadores de tumor ascítico no sétimo dia de desenvolvimento, foram plaqueadas na densidade de  $5 \times 10^5$  células por poço em placas de 12 poços. Estas células foram incubadas em MC na presença de diferentes concentrações de ARAGAL: 10, 25, 50, 100, 200 e 300  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . As células do grupo controle foram incubadas na ausência do polissacarídeo. Após 1 h em estufa  $37^\circ\text{C}$  e atmosfera de 5%  $\text{CO}_2$ , as células não-aderentes foram coletadas por centrifugação a 1080 g por 6 minutos, o

sobrenadante descartado, e o “pellet” de células obtido após a centrifugação foi ressuspenso em PBS e mantido a 4°C. As células que estavam aderidas a placa de cultura foram incubadas por aproximadamente 2 minutos em solução de EDTA 2 mmol.L<sup>-1</sup> em estufa 37°C e atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> para descolamento. Em seguida, os poços foram lavados com PBS para retirada de todas as células restantes em cada um dos poços. A suspensão contendo as células que estavam aderidas à placa foi centrifugada como anteriormente e o “pellet” de células obtido foi ressuspenso em PBS. Os dois “pellets” de células, o resultantes das células que estavam no sobrenadante e o resultante das células aderidas foram reunidos em uma suspensão única e a viabilidade foi avaliada pelo método do azul de trypan como descrito no item 5.6.1.

### **5.9.2. Efeito de ARAGAL na interação *in vitro* entre macrófagos e células do S-180**

Células do exudato peritoneal foram obtidas como descrito no item 5.5.1 e plaqueadas na densidade de  $5 \times 10^5$  células por poço em placas de cultura de 24 poços contendo lamínulas de vidro estéreis. Os macrófagos do grupo tratado com ARAGAL foram cultivados em estufa a 37°C e atmosfera de 5 % CO<sub>2</sub>, em MC acrescido de diferentes concentrações do polissacarídeo: 10, 25, 50, 100 e 200 µg.mL<sup>-1</sup>, enquanto que os macrófagos do grupo controle foram cultivados apenas em MC. Após 24 h o sobrenadante foi descartado; as lamínulas contendo as monocamadas de macrófagos foram lavadas duas vezes em PBS estéril e incubadas em MC em presença de 10<sup>4</sup> células do S-180 por poço. Após 18 h de co-incubação em estufa a 37°C e atmosfera de 5 % CO<sub>2</sub>, as lamínulas foram lavadas

duas vezes com PBS e processadas para microscopia de luz conforme descrito no item 5.7.

### **5.9.3. Avaliação da atividade antitumoral de ARAGAL frente o S-180**

#### **5.9.3.1. S-180 ascítico**

A atividade de ARAGAL frente as células de S-180 na forma ascítica foi avaliada de acordo com a metodologia proposta por SAIMA *et al.* (2000) e MIZUNO *et al.* (1986). Células do S-180 obtidas de camundongos portadores de tumor ascítico no sétimo dia de desenvolvimento foram inoculadas (i.p.) na densidade de  $10^5$  por animal em camundongos albinos Swiss machos (dia zero). Estes animais foram divididos em três grupos de 10 animais cada, grupo controle e dois grupos tratados com diferentes doses de ARAGAL. Nos dias subsequentes (dia 1 ao 3), ou seja, 24, 48 e 72 horas após inoculação das células, os animais do grupo controle foram inoculados (i.p.) com PBS estéril, enquanto que os animais dos grupos tratados com ARAGAL foram inoculados (i.p.) com 50 ou  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$  do polissacarídeo. No dia 4, ou seja, 96 horas após a inoculação das células, os animais foram sacrificados por asfixia com éter etílico e as células do S-180 da cavidade peritoneal, de cada um dos animais, foram coletadas separadamente com 10 mL de PBS estéril. Após centrifugação a  $1080 \text{ g}$  por 6 minutos, as células foram ressuspensas em PBS estéril e o número de células viáveis obtidas de cada animal foi avaliado pelo método do azul de Trypan. A inibição do crescimento do tumor ascítico do S-180 foi calculada com a seguinte fórmula:

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

Onde; A = número de células do S-180 do grupo controle e, B = número de células do S-180 do grupo tratado (SAIMA et al., 2000).

### 5.9.3.2. Tumor sólido S-180

Para avaliação do efeito da ARAGAL na forma sólida do S-180, os animais foram inoculados subcutaneamente na região interescapular com  $5 \times 10^5$  células do S-180 contidas em 200  $\mu\text{L}$ . Os animais foram então divididos em grupos de 21 animais. Após 24 h da implantação das células tumorais, os animais do grupo controle foram inoculados (i.p.) com PBS estéril, e os animais do grupo tratado com ARAGAL foram inoculados (i.p.) com  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$  de ARAGAL. No 21º dia após a implantação das células, os animais foram sacrificados por asfixia em éter etílico e os tumores foram dissecados e pesados para avaliação da taxa de inibição de crescimento tumoral, utilizando a seguinte fórmula:

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

Onde; A = massa tumoral média do grupo controle, e B = massa tumoral média do grupo tratado (MIZUNO et al., 1986; KOJIMA et al., 1986; BLASCHEK et al., 1992; REN et al., 1995).

## 5.10. EXPERIMENTOS COM CÉLULAS DE MELANOMA B16-F10.

### 5.10.1. Efeito *in vitro* de ARAGAL na viabilidade células de melanoma B16-F10

Células de melanoma B16-F10 foram plaqueadas na densidade de  $5 \times 10^5$  células por poço em placas de 96 poços em MC na ausência (controle) ou presença

de concentrações variadas de ARAGAL: 10, 25, 50, 100, 200 e 300  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Após 1, 2 ou 3 horas em estufa a 37°C e atmosfera de 5 %  $\text{CO}_2$ , o sobrenadante foi descartado e a viabilidade da monocamada de células foi avaliada segundo o método do MTT como descrito anteriormente (item 5.6.2).

### **5.10.2. Efeito *in vitro* de ARAGAL na proliferação de células B16-F10**

Células de melanoma B16-F10 foram plaqueadas na densidade de  $5 \times 10^5$  células por poço em placas de 96 poços em MC e incubadas em estufa a 37 °C e atmosfera de 5%  $\text{CO}_2$  durante 16 horas para que aderissem à placa. O meio foi, então, substituído por outro sem adição de SFB para que todas as células estacionassem na fase  $G_0$  do ciclo celular. Após 24 h, o meio sem SFB foi trocado por meio de crescimento (MC) e as células mantidas por mais 24, 48 ou 72 h na ausência (grupo controle) ou presença de diferentes concentrações de ARAGAL: 10, 25, 50, 100, 200 e 300  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Após cada um dos tempos citados, o sobrenadante foi descartado e a proliferação das células foi quantificada pelo método do MTT como já descrito. Os resultados foram expressos em número de células padronizado por uma curva de calibração de acordo com o número de células viáveis e a quantidade de formazan gerado. A absorbância foi diretamente proporcional ao número de células e a linearidade se estendeu por toda a faixa avaliada, de  $2 \times 10^3$  a  $24 \times 10^3$  células /poço.

### **5.10.3. Efeito *in vitro* de ARAGAL na morfologia de células B16-F10**

Células de melanoma B16-F10 foram plaqueadas na densidade de  $5 \times 10^5$  células/poço em placas de cultura de 24 poços contendo lamínulas de vidro estéreis.

As células dos grupos tratados com ARAGAL foram cultivadas em MC acrescido de diferentes concentrações do polissacarídeo: 10, 25, 50, 100, 200 e 300  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , enquanto que as células do grupo controle foram cultivados apenas em MC. Após 24, 48 e 72 h em estufa a 37°C e atmosfera de 5%  $\text{CO}_2$ , o sobrenadante foi descartado, as lamínulas contendo as monocamadas de células B16-F10 foram lavadas duas vezes em PBS e processadas para microscopia de luz, como descrito anteriormente.

#### **5.10.4. Avaliação da atividade antitumoral de ARAGAL frente ao melanoma B16-F10**

Suspensões de células do melanoma B16-F10 obtidas como já descrito (item 5.5.3) foram ajustadas para  $5 \times 10^5$  células em cada 100  $\mu\text{L}$ , que foram inoculados subcutaneamente na região interescapular de camundongos machos C57-BL6. Os animais foram divididos em dois grupos: grupo controle e grupo tratado com ARAGAL, sendo que cada um dos grupos era composto por 15 animais. Após 24 h da implantação das células tumorais, os animais do grupo controle foram inoculados (i.p.) com PBS estéril, e os animais do grupo tratado com ARAGAL foram inoculados (i.p.) com 100  $\text{mg.kg}^{-1}$  de ARAGAL. No 17º dia após a implantação das células, os animais foram sacrificados por asfixia em éter etílico e os tumores foram dissecados e pesados e avaliação da taxa de inibição de crescimento tumoral foi realizada como descrito para o S-180 (item 5.9.3.2).

Para avaliar um possível efeito antimetastático,  $5 \times 10^5$  células B16-F10 foram inoculadas i.p. em camundongos C57BL6. Após 24 h, os animais foram tratados i.p. com 100  $\text{mg.kg}^{-1}$  de ARAGAL. 21 dias após a inoculação das células, os animais

foram sacrificados e os órgãos (pulmões, fígado, rim e baço) da cavidade peritoneal foram processados para microscopia óptica como descrito no item 5.7.

#### **5.10.5. Determinação da sobrevida de animais portadores de melanoma B16-F10 subcutâneo tratados com ARAGAL.**

Para avaliação do efeito de ARAGAL no tempo de sobrevida de animais portadores de tumor sólido do melanoma B16-F10, os animais foram submetidos aos mesmos procedimentos descritos no item anterior, porém após a inoculação com  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$  de ARAGAL ou PBS estéril (grupo controle). O número de animais vivos foi acompanhado até que o último dos animais viesse a morrer.

#### **5.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Todos os resultados foram submetidos a análise estatística, sendo analisadas as repetições e as formas de tratamento. Os resultados dos ensaios com macrófagos (produção de ânion superóxido, óxido nítrico e fator de necrose tumoral-alfa, capacidade fagocítica, percentual de ativação e interação com células do S-180), a viabilidade das duas linhagens tumorais e a proliferação das células B16-F10 foram submetidos à análise de variância ANOVA. Para avaliar as diferenças entre os tratamentos e controle foi utilizado o teste de Tukey, que permite estabelecer a diferença mínima significativa entre duas médias. Os ensaios *in vivo* de atividade antitumoral frente aos tumores sólidos foram avaliados estatisticamente através de análise de variância para duas amostras (Teste F), e aplicação do teste T. A análise da sobrevida dos animais portadores de tumor sólido do melanoma B16F10 foi realizada pelo teste Z e representada pela chance cumulativa de sobreviver (CCS).

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (média  $\pm$  dp) de no mínimo três experimentos realizados em quadruplicadas, com exceção da análise da atividade antitumoral, onde os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão (média  $\pm$  ep). Foram considerados estatisticamente significativos os valores comparados ao nível de significância de  $p \leq 0,05$ .

## **6. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **6.1. EFEITOS DE ARAGAL SOBRE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS**

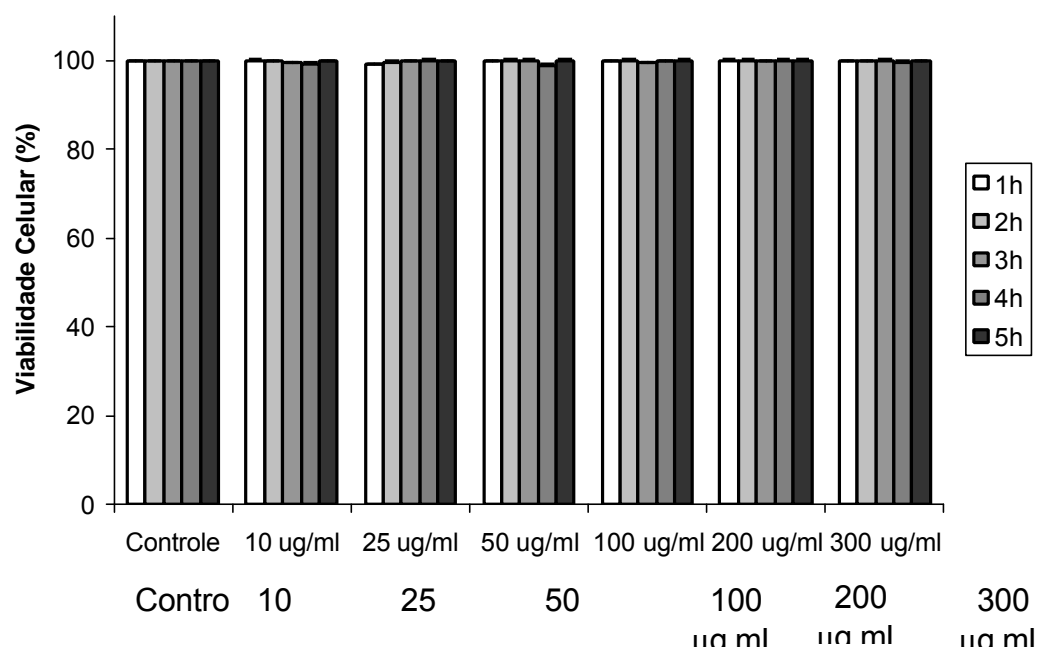
Os experimentos realizados neste trabalho tiveram por finalidade avaliar se a arabinogalactana de *Anadenanthera colubrina* (ARAGAL) poderia exercer efeitos como um potencial biomodulador, interferindo em várias funções de macrófagos. Para a determinação deste efeito, o estabelecimento de concentrações ideais para a incubação deste polímero com estas células se fez necessária, de forma a evitar que doses excessivas causassem danos a viabilidade celular. A figura 3 mostra os resultados obtidos em que monocamadas de macrófagos isolados do exudato peritoneal de camundongos foram expostos a ARAGAL nas concentrações de 10 a 300  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  durante 1 a 5 horas. Nestas condições experimentais o polímero não causou efeitos citotóxicos para estas células, visto que a viabilidade celular esteve sempre próxima a 100%, independente da concentração utilizada de ARAGAL. Dessa maneira, o estudo de ARAGAL como um provável biomodulador tornou-se possível e vários parâmetros morfológicos e funcionais, desencadeados pelo processo de ativação dessas células, foram avaliados.



Para isso, macrófagos do exudato peritoneal de camundongos foram isolados e plaqueados em placas contendo lamínulas de vidro. Após a aderência, essas células foram incubadas com ARAGAL nas mesmas concentrações utilizadas na análise de viabilidade celular, isto é de 10 – 300  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  durante 24 ou 48 horas em estufa a 37°C e atmosfera de 5%  $\text{CO}_2$ . O resultado de tais experimentos está mostrado na figura 4, que mostra imagens representativas de macrófagos residentes e ativados no grupo controle (4a e 4c) e no grupo tratado (4b e 4d) com ARAGAL. Macrófagos residentes possuem núcleo pequeno e escuro, poucas projeções citoplasmáticas e pouco espalhados sobre a lamínula de vidro. Macrófagos ativados possuem citoplasma aumentado, núcleo grande e claro, várias projeções citoplasmáticas e grande capacidade de espalhamento (BURGALETA et al., 1978; CLEARY & KELLY, 1999). Nas figuras 4a e 4b é possível observar a distribuição geral dessas células em cada um dos grupos; e nas figuras 4c e 4d são mostrados detalhes da morfologia de macrófagos residentes e ativados. No grupo controle a maioria das células são macrófagos residentes (setas abertas) e os macrófagos ativados (setas fechadas) são encontrados em menor quantidade. Já nos grupos tratados com ARAGAL, em todas as concentrações testadas, os macrófagos ativados (setas fechadas) são encontrados em maior número.

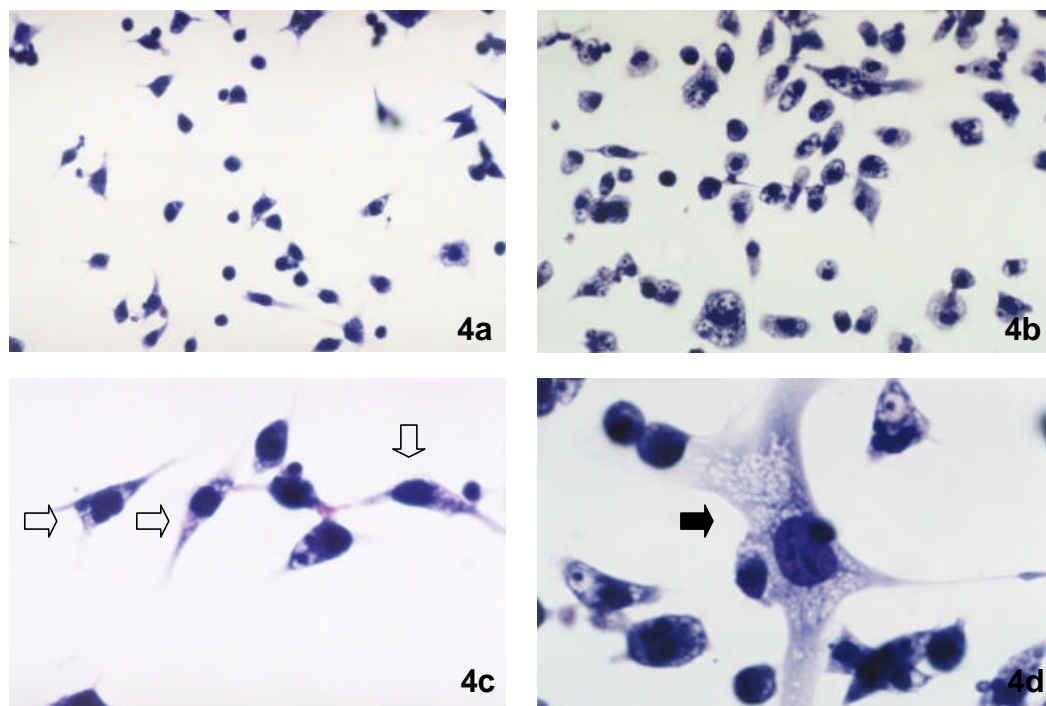
A figura 5 mostra os dados quantitativos da distribuição geral de macrófagos residentes e ativados na ausência e presença das diferentes concentrações de ARAGAL testadas nos tempos de 24 (figura 5a) e 48 horas (figura 5b). Em cada um dos grupos – controle e diferentes concentrações de ARAGAL (10 - 300  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), nos tempos de 24 e 48 horas, foram contados 3.000 macrófagos totais e os dados numéricos obtidos após a contagem foram submetidos a análise estatística como

FIGURA 3: EFEITO *IN VITRO* DE ARAGAL SOBRE A VIABILIDADE DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS



Sistema: Macrófagos aderentes foram incubados por 1 a 5 horas na presença de ARAGAL nas concentrações indicadas. Após a incubação o meio foi removido e o reagente MTT foi adicionado, seguindo-se de incubação por mais 3 horas. O excesso de MTT foi removido e adicionado DMSO. A absorbância foi medida em 550 nm com filtro de 655 nm como referência. Os valores representam a média  $\pm$  DP (n=3). 100% de viabilidade corresponde à viabilidade celular determinada para as células cultivadas em meio de crescimento (MC). \* Diferença significativa do controle;  $p \leq 0,05$ .

FIGURA 4: CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE MACRÓFAGOS TRATADOS *IN VITRO* COM ARAGAL.



Sistema: Macrófagos aderentes foram incubados por 24 ou 48 horas na ausência ou presença de diferentes concentrações de ARAGAL, em placas contendo lamínulas de vidro, as quais foram processadas para microscopia óptica. Coloração: Giemsa. As micrografias desta Figura são representativas.

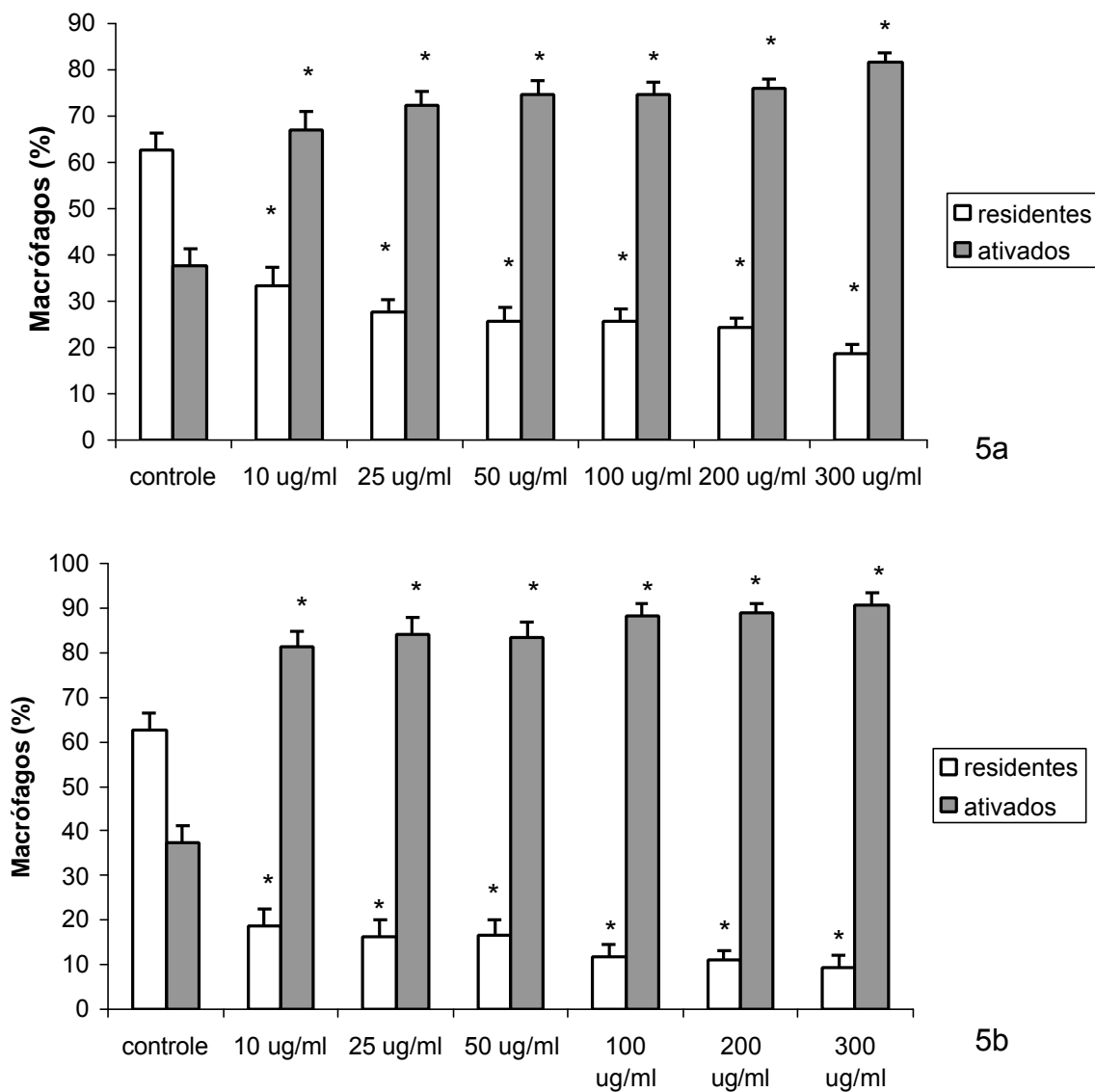
4a) distribuição geral de macrófagos do grupo controle, cultivados na ausência de ARAGAL durante 48 horas. (400X).

4b) distribuição geral de macrófagos do grupo tratado com 300 µg.mL<sup>-1</sup> de ARAGAL durante 48 horas. (400X).

4c) macrófagos residentes (setas abertas) do grupo controle, cultivados na ausência de ARAGAL durante 48 horas. (1000X).

4d) macrófago ativado (seta fechada) do grupo tratado com 300 µg.mL<sup>-1</sup> de ARAGAL durante 48 horas. (1000X).

FIGURA 5: EFEITO DE ARAGAL NA ATIVAÇÃO *IN VITRO* DE MACRÓFAGOS.

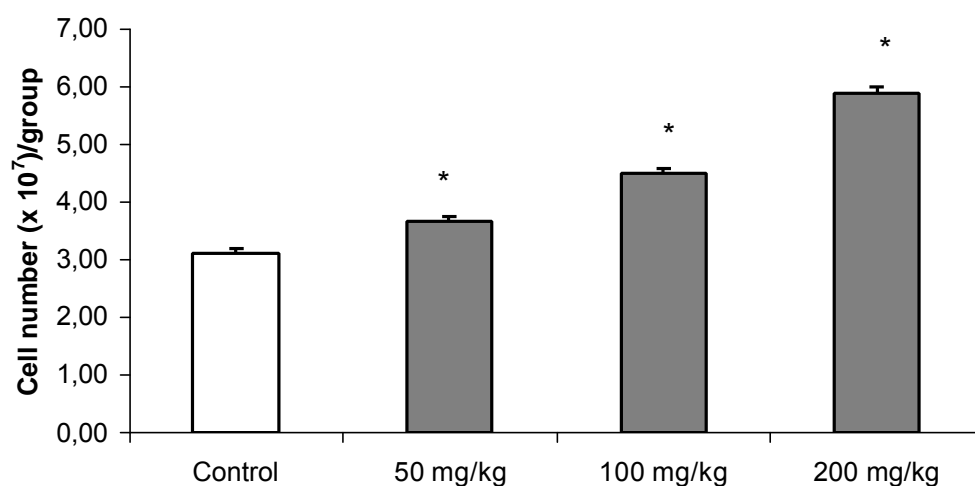


Sistema: Macrófagos aderentes foram incubados por 24 (5a) ou 48 (5b) horas na ausência (controle) ou presença das concentrações indicadas de ARAGAL. Após a incubação o meio foi removido e as lamínulas contendo as monocamadas de macrófagos foram processadas para microscopia óptica. O número de macrófagos residentes e ativados foram contados. Os valores representam a média  $\pm$  DP. \* Diferença significativa do controle;  $p \leq 0,05$ .

descrito no item 5.11. Nos dois tempos analisados, 24 e 48h, existe diferença estatisticamente significativa entre o número de macrófagos residentes e ativados no grupo controle quando comparado a qualquer um dos grupos tratados com ARAGAL. Em ambos os tempos no grupo controle ~37% dos macrófagos estavam em estado de ativação, apresentando as características morfológicas de células ativadas citadas anteriormente. Nos grupos tratados, ARAGAL aumentou a percentagem de células ativadas de forma tempo e dose-dependente, visto que ~87% dos macrófagos estavam ativados após 24 h em presença de 300  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de ARAGAL e ~91% após 48 h de incubação com a mesma concentração do polissacarídeo.

Considerando que ARAGAL, além de não alterar a viabilidade de macrófagos peritoneais de camundongos, promove a ativação *in vitro* da grande maioria dessas células, a análise dos efeitos deste polímero *in vivo* tornou-se importante. Para isso, inicialmente avaliou-se a capacidade de ARAGAL em elicitar células para a cavidade peritoneal de camundongos quando inoculada intraperitonealmente. Nesta série de experimentos foram utilizados grupos de 4 animais. O número total de PEC foi determinado por contagem do lavado peritoneal realizada 24 h após a injeção i.p. de PBS estéril nos animais do grupo controle e de 50, 100 ou 200  $\text{mg.kg}^{-1}$  de ARAGAL nos animais dos grupos tratados. A figura 6 mostra que o polissacarídeo ARAGAL foi eficiente em elicitar macrófagos para a cavidade peritoneal dos animais tratados, sendo que o efeito foi dose-dependente. A percentagem de células recrutadas nos grupos tratados foi ~18, 44 e 88% maior que no grupo controle após a administração de 50, 100 e 200  $\text{mg.kg}^{-1}$  de ARAGAL respectivamente. Os efeitos de ARAGAL quanto a atividade elicitora de células para a cavidade peritoneal são comparáveis

FIGURA 6: ATIVIDADE ELICITORA DE ARAGAL



Sistema: Camundongos (n=4, para cada grupo) foram inoculados intraperitonealmente com ARAGAL nas concentrações indicadas, os animais do grupo controle foram inoculados com PBS estéril. Após 24 h, as células do exudato peritoneal (PEC) de cada um dos grupos foram coletadas e contadas em câmara de Neubauer. Os valores representam a média  $\pm$  DP. \* Diferença significativa do controle;  $p \leq 0,05$ .

ao do polissacarídeo ácido, constituído por 82,5% de ácido D-galacturônico, 8,2% de L-ramnose, 4,7% de D-glactose, 5,4% de L-arabinose, e traços de glucose e xilose, denominado FL-1a-I isolado do fruto de *Feronia limonia* (Linn.), o qual levou a um aumento de ~56% de células recrutadas para a cavidade peritoneal, 24 h após a inoculação de 100 mg.kg<sup>-1</sup> (SAIMA et al., 2000). Vale a pena destacar que uma  $\alpha$ -D-glucana (1→3) (1→4) do líquen *Ramalina celastri*, sete dias após a inoculação i.p. de 200 mg.kg<sup>-1</sup>, elicitou 130% mais macrófagos para a cavidade peritoneal quando comparada ao grupo controle, inoculado com PBS estéril (STUELP et al., 2002). Além desta, uma  $\beta$ -glucana com ligações do tipo (1 →3), isolada do fungo *Lentinus edodes*, também apresentou atividade elicitora, recrutando 75% mais macrófagos para a cavidade peritoneal 3 dias após sua inoculação (10mg.kg<sup>-1</sup>). Além disso, esse polissacarídeo aumentou a capacidade de espalhamento em cultura dessas células, característica também considerada como um sinal de ativação (LADÁNYI et al., 1993). Este parâmetro foi também observado para ARAGAL quando incubada *in vitro* com macrófagos, como citado anteriormente. Outra  $\beta$ -glucana, extraída de *Sclerotinia sclerotiorum*, mostrou-se capaz de elicitar células para a cavidade peritoneal até 12 dias após sua inoculação i.p., apresentando um aumento de 140% em relação ao grupo controle (SAKURAI et al., 1992). A fração polissacarídeo de *Gracilaria verrucosa* promoveu um aumento de 100% no número de células 5 dias após inoculação (YOSHIZAWA et al., 1996).

O aumento no número de CEP em animais inoculados com ARAGAL sugere que este polímero promove uma ação irritativa semelhante aquela observada para o tioglicolato e ainda, considerando que polímeros com características estruturais tão distintas exibam similar comportamento no recrutamento de células para a cavidade

peritoneal, parece sugerir que tal propriedade seja resultante mais da massa molar do que de um grupo químico estrutural comum.

As características morfológicas de células ativadas, observadas na preparação celular após a exposição *in vitro* à ARAGAL, motivaram a realização de experimentos *in vivo*. Os experimentos apresentados na figura 7 tiveram portanto a finalidade de verificar se as células recrutadas para a cavidade peritoneal de animais inoculados com ARAGAL também apresentavam as características de células ativadas. Nestes experimentos, grupos de 10 animais foram utilizados, sendo que, no grupo controle, os animais foram inoculados i.p. com PBS estéril, enquanto que, nos grupos tratados, os animais foram inoculados i.p. com 100, 250 ou 500 mg.kg<sup>-1</sup> de ARAGAL. Após sete dias, as células do exudato peritoneal foram coletadas, plaqueadas em placas contendo lamínulas e após 24 horas à 37°C e 5 % CO<sub>2</sub>, as lamínulas convenientemente processadas para microscopia de luz foram observadas e microfotografadas.

A figura 7 mostra imagens representativas de macrófagos residentes e ativados tanto no grupo controle (7a – 7c) como nos grupos tratados i.p. (7d – 7l) com ARAGAL. Nas figuras 7a, 7d, 7g e 7j é possível observar a distribuição geral dessas células em cada um dos grupos, onde no grupo controle (7a) a maioria das células são macrófagos residentes (setas abertas) e os macrófagos ativados (setas fechadas) são encontrados em menor quantidade. Nos grupos tratados com ARAGAL (7d, 7g, 7j), os macrófagos ativados (setas fechadas) são encontrados em maior número; sendo estes resultados similares àqueles mostrados nas figuras 4 e 5, referentes a ativação *in vitro* dessas células na presença de ARAGAL. Nas figuras 7b - c, 7e - f, 7h – i e 7k – l são mostrados detalhes da morfologia de macrófagos

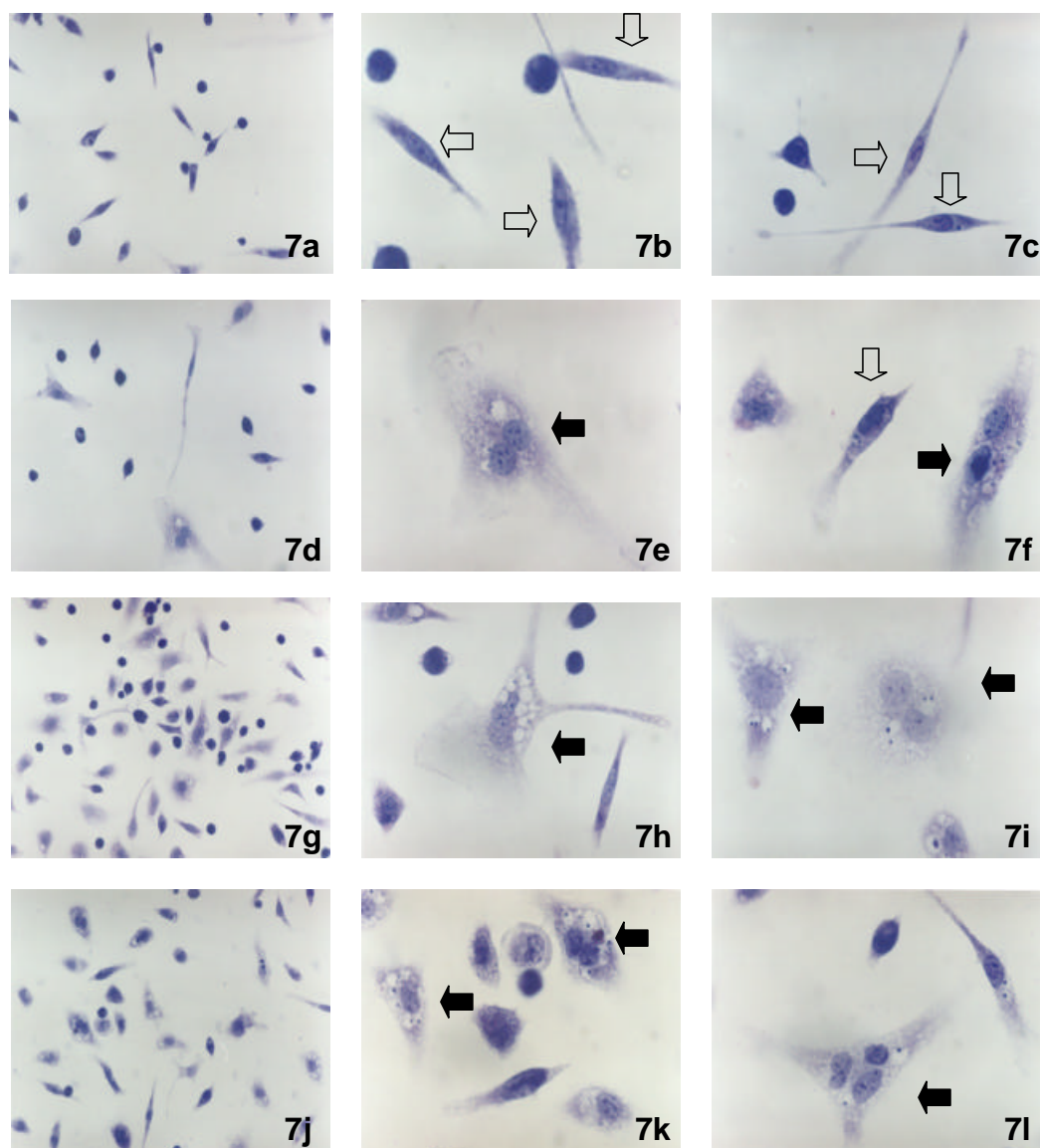


residentes e ativados, nos grupos: controle, ARAGAL 100 mg.kg<sup>-1</sup>, ARAGAL 250 mg.kg<sup>-1</sup> e ARAGAL 500 mg.kg<sup>-1</sup>.

A figura 8 mostra os dados quantitativos da distribuição geral de macrófagos residentes e ativados nos grupos inoculados i.p. com ARAGAL (100, 250 e 500 mg.kg<sup>-1</sup>) e no grupo controle, inoculados com PBS estéril, em cada um dos grupos foram contados 3.700 macrófagos. Existe diferença estatisticamente significativa entre o número de macrófagos residentes e ativados do grupo controle em relação aos grupos tratados. No grupo controle ~34% dos macrófagos eram células ativadas, já nos grupos tratados com 100, 250 e 500 mg.kg<sup>-1</sup> de ARAGAL, foram encontrados ~60, 75 e 75% de macrófagos ativados, respectivamente.

Macrófagos apresentando características morfológicas de ativação também foram encontrados por COOK et al. (2001) quando essas células foram incubadas com uma preparação comercial de  $\beta$ -glucana denominada EcoActiva™; os macrófagos apresentavam-se hipertrofiados, vacuolizados, com aumento da adesão e do número de projeções citoplasmáticas. Características de ativação foram também observadas em macrófagos da linhagem J774.1 incubados por 12 h com os polissacarídeos neutro (NPS) e ácido (APS), produzidos por *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* OLL1073R-1, sendo que o grau de espalhamento dos macrófagos incubados com APS foi maior que os incubados com NPS, assim como a forma e tamanho das células (NISHIMURA-UEMURA et al., 2003). Destaca-se que os animais tratados com ARAGAL apresentaram características de animais saudáveis, não aparecendo nenhum tipo de toxicidade, uma vez que nenhum animal morreu durante o experimento. Baixa toxicidade foi também demonstrada com outra arabinogalactana extraída de *Larix occidentalis*, a qual, quando utilizada nas

FIGURA 7: CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM ARAGAL.



Sistema: Camundongos ( $n=10$ , para cada grupo) foram inoculados intraperitonealmente com ARAGAL ( $100 - 500 \text{ mg.kg}^{-1}$ ), ou com PBS estéril (controle). Após 7 dias, PEC de cada um dos grupos foram coletadas e cultivadas durante 24 horas em meio de crescimento (MC), em placas contendo lamínulas de vidro, as quais foram processadas para microscopia óptica. Coloração: Giemsa. Macrófagos residentes: setas abertas. Macrófagos ativados: setas fechadas. As micrografias desta figura são representativas.

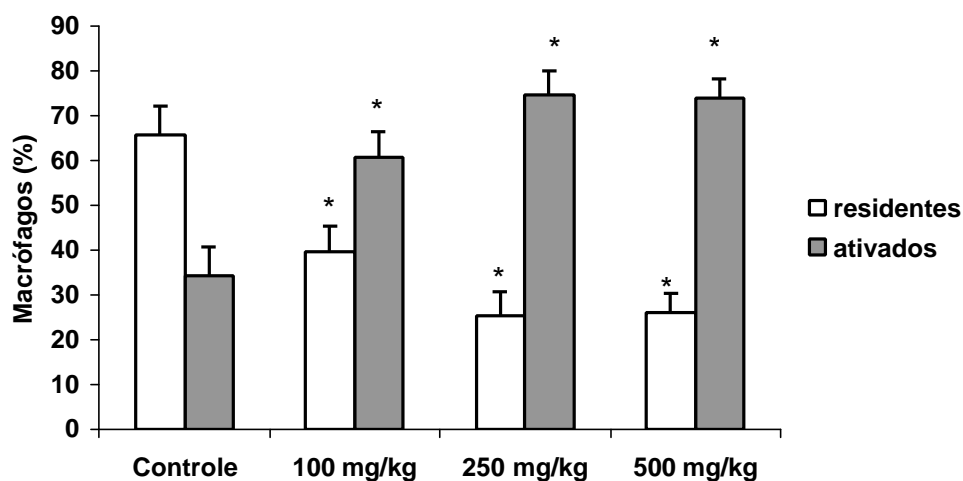
7 a - c) Grupo controle. (a) 400X; (b,c) 1000X.

7 d - f) Grupo tratado com  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$  de ARAGAL. (d) 400X; (e,f) 1000X.

7 g - i) Grupo tratado com  $250 \text{ mg.kg}^{-1}$  de ARAGAL. (g) 400X; (h,i) 1000X.

7 j - l) Grupo tratado com  $500 \text{ mg.kg}^{-1}$  de ARAGAL. (j) 400X; (k,l) 1000X.

FIGURA 8: EFEITO DE ARAGAL NA ATIVAÇÃO *IN VIVO* DE MACRÓFAGOS.



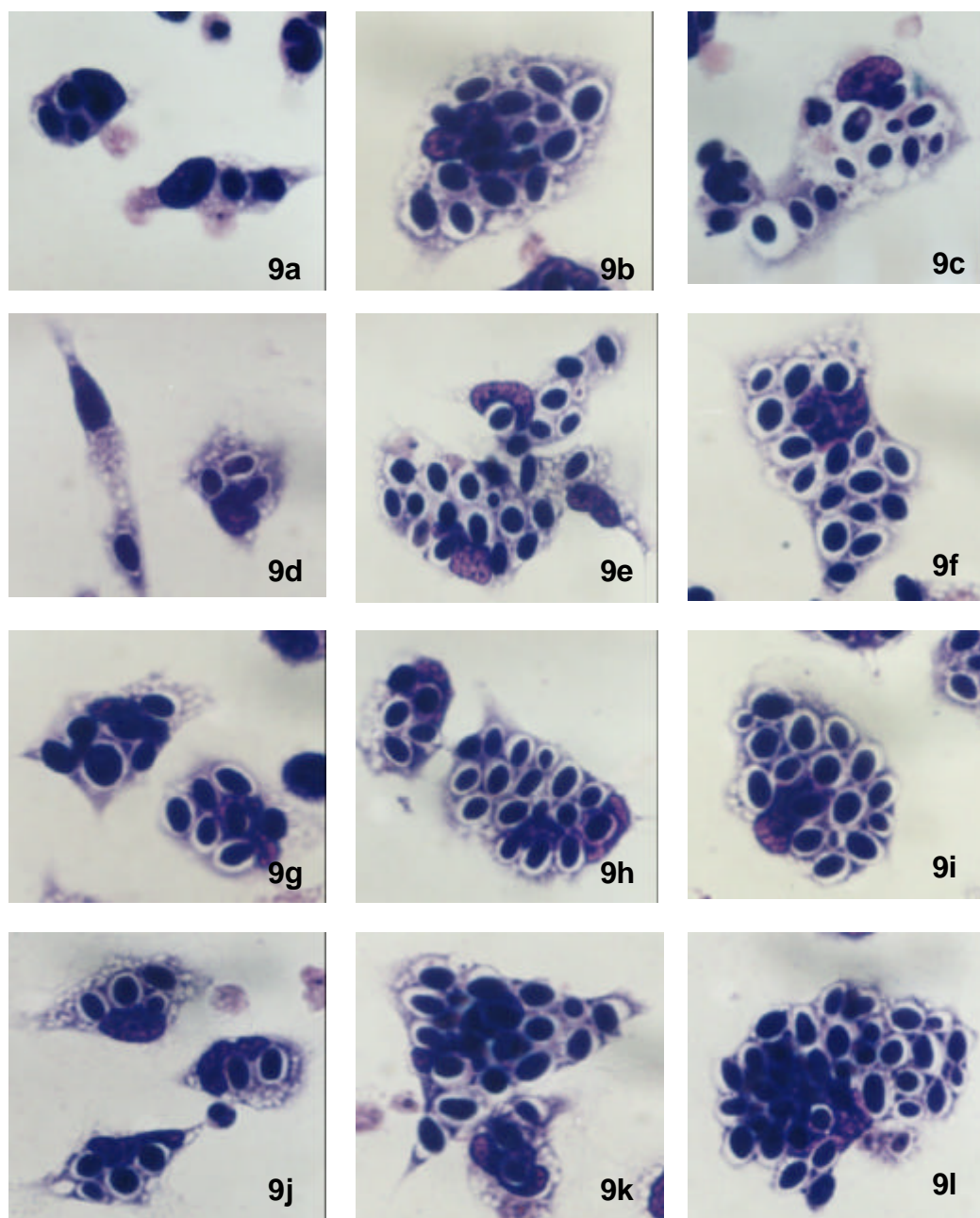
Sistema: Camundongos (n=10, para cada grupo) foram inoculados intraperitonealmente com as concentrações indicadas de ARAGAL, os animais do grupo controle foram inoculados com PBS estéril. Após 7 dias, as células da exudato peritoneal (PEC) de cada um dos grupos foram coletadas e cultivadas durante 24 horas em meio de crescimento (MC), em placas contendo lamínulas de vidro, as quais foram processadas para microscopia óptica. O número de macrófagos residentes e ativados foram contados. Os valores representam a média  $\pm$  DP. \* Diferença significativa do controle;  $p < 0,05$ .

mesmas doses que ARAGAL, não apresentou nenhum dano ou alteração hepática (GROMAN et al., 1994).

Além das características morfológicas, os macrófagos ativados apresentam características funcionais que os identificam. Dentre as funções de macrófagos que se tornam aumentadas durante o processo de ativação está a capacidade fagocítica. A análise da atividade fagocítica utilizando o índice endocítico é uma ferramenta útil para acessar esta função nos macrófagos (RAMESH et al., 2002) e, neste trabalho, esta função foi avaliada utilizando as leveduras como partículas fagocíticas. O índice endocítico leva em consideração o número total de macrófagos, o número de macrófagos que fagocitaram leveduras e o número de leveduras encontradas dentro dos macrófagos (fagocitadas). A tabela I apresenta os resultados obtidos para esta série de experimentos, em que um total de 25.247 macrófagos e 119.432 leveduras foram contados. Nesta tabela, pode ser observado que  $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de ARAGAL foram suficientes para desencadear a capacidade fagocítica máxima dessas células no tempo de 60 min de incubação com as leveduras, pois o valor do IE para as doses superiores neste tempo foi semelhante ao encontrado para a menor dose. Porém, quando doses mais elevadas foram testadas ( $50$  e  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), observou-se que o intervalo de tempo para atingir efeitos significativos foi menor, como demonstrado pelo valor de IE que foi estatisticamente significativo já com 30 minutos de incubação.

A figura 9 mostra imagens representativas da atividade fagocítica de macrófagos do grupo controle (9a, d, g, j) cultivados por 30, 45, 60 e 90 minutos. Para comparação, nas figuras 9b, c, e, f, h, i, k, l estão mostradas imagens de

FIGURA 9: EFEITO DE ARAGAL NA CAPACIDADE FAGOCÍTICA DE MACRÓFAGOS TRATADOS *IN VITRO* COM ARAGAL.



Sistema: Macrófagos aderentes foram incubados por 24 horas na ausência ou presença de ARAGAL. O sobrenadante foi removido, as lamínulas contendo as monocamadas de macrófagos foram lavadas meio sem SBF, e incubadas com leveduras na proporção de 10 leveduras para cada macrófago. Após cada um dos tempos indicados as lamínulas foram processadas para microscopia óptica. (1000X). As micrografias desta figura são representativas.

**30 min:** (a) controle; (b, c): ARAGAL; **45 min:** (d) controle; (e, f): ARAGAL; **60 min:** (g) controle; (h, i): ARAGAL; **90 min:** (j) controle; (k, l): ARAGAL

TABELA 1: ÍNDICE ENDOCÍTICO DE MACRÓFAGOS TRATADOS *IN VITRO* ARAGAL.

	Tempo (minutos)					
	15	30	45	60	90	120
Controle	1,57	2,55	4,04	4,08	4,90	4,16
ARAGAL 25 µg/mL	2,25	3,61	5,22	5,81 *	6,60 *	6,61 *
ARAGAL 50 µg/mL	2,26	4,23 *	5,67 *	5,82 *	7,00 *	6,70 *
ARAGAL 100 µg/mL	2,19	4,01 *	5,47 *	6,41 *	6,80 *	6,60 *

Sistema: Macrófagos aderentes foram incubados por 24 horas na ausência ou presença das concentrações indicadas de ARAGAL. O sobrenadante foi removido, as lamínulas contendo as monocamadas de macrófagos foram lavadas meio sem SBF, e incubadas com leveduras na proporção de 10 leveduras para cada macrófago. Após cada um dos tempos indicados as lamínulas foram processadas para microscopia óptica. O índice endocítico foi determinado pela contagem do número total de macrófagos, número de macrófagos que fagocitaram leveduras e o número de leveduras fagocitadas. A contagem foi realizada em objetiva de 1000X. \* Diferença significativa do controle;  $p \leq 0,05$ .

macrófagos dos grupos tratados com ARAGAL, nos tempos de incubação citados acima.

O índice endocítico, determinado em diferentes intervalos de tempo durante a internalização de leveduras, mostrou que macrófagos tratados *in vitro* com ARAGAL se tornaram eficientes fagócitos, com um grande aumento da capacidade fagocítica quando comparado ao grupo controle. O padrão de resposta dos macrófagos tratados com ARAGAL pode ser considerado bastante eficaz, uma vez que o índice endocítico obtido com ARAGAL foi 35% a 66% maior que aqueles obtidos para o grupo controle (tab.I). Comparando com dados da literatura, os resultados encontrados neste estudo para ARAGAL foram superiores a aqueles encontrados para uma arabinogalactana fracamente ácida e polissacarídeos pécticos extraídos da planta intacta e de calos de *Silene vulgaris*, os quais apresentaram um estímulo da atividade fagocítica variando de 7% a 17% maior que o grupo controle (POPOV et al., 1999). Em comparação com a galactomanana de *Trigonella foenum-graecum* L. (fenugreek), ARAGAL também mostrou melhores resultados, uma vez que o polímero de fenugreek apresentou um índice endocítico de ~8% to ~40% (RAMESH, et al., 2002). Os resultados foram ainda superiores aos efeitos do polissacarídeo neutro (NPS) e do fosfopolissacarídeo (APS) produzidos por *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* OLL1073R-1, os quais estimulam a capacidade fagocítica destas células, de ~ 8 e 17% em relação ao controle foi observado para o NPS e APS respectivamente (KITAZAWA et al., 2000). Vale mencionar que a  $\alpha$ -D-glucana (1→3) (1→4) extraída do líquen *Ramalina celastri* promoveu um aumento de 70% da capacidade fagocítica quando comparada ao grupo controle (STUELP-CAMPELO et al., 2002), padrão de resposta que foi semelhante ao encontrado para a  $\beta$ -glucana

(1→3) altamente ramificada em (1→6) extraída do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (SUGA et al., 1984). Outros estudos, utilizando macrófagos pré-incubados com 200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de uma  $\beta$ -(1→3),(1→6)-glucana extraída do fungo *Glomerella cingulata*, demonstraram que sua ação é tempo dependente, ou seja, pré-incubações rápidas de 30 minutos, por exemplo, não afetaram a fagocitose de partículas de zimosana, enquanto tratamentos prolongados (15 horas) ocasionaram um aumento de 93% (GOMAA et al., 1992). Aumentos da atividade fagocítica de 58, 117 e 173% foram encontrados quando macrófagos foram cultivados na presença de 10, 50 e 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  do extrato aquoso Changkil (CK) de *Platycodon grandiflorum* (CHOI et al., 2001). Uma explicação possível para as várias respostas encontradas para os polissacarídeos seria a existência de múltiplos sítios de reconhecimento de polissacarídeos nos macrófagos, o que desencadaria diferentes mecanismos sinais no seu interior, suscitando uma resposta específica (OKASAKI et al., 1996; REMENRERÍA et al., 1997).

Quando macrófagos e células fagocíticas estão realizando o processo da fagocitose de bactérias ou de células tumorais, há uma associação desta ação com a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que causam danos celulares por lipoperoxidação, destruição de proteínas e danos no DNA, destruindo os invasores (PASQUIER et al., 1997). Além disso, vários polissacarídeos, descritos como modificadores da resposta biológica, têm sido testados quanto a sua habilidade em aumentar a produção de ânion superóxido e óxido nítrico por macrófagos (RAMAMOORTHY et al., 1996; BERTON & GORDON, 1983; WILLIAMS et al., 1986; KIM, 1998; JUN et al., 1999; DEUK et al., 1998). Sendo assim, a



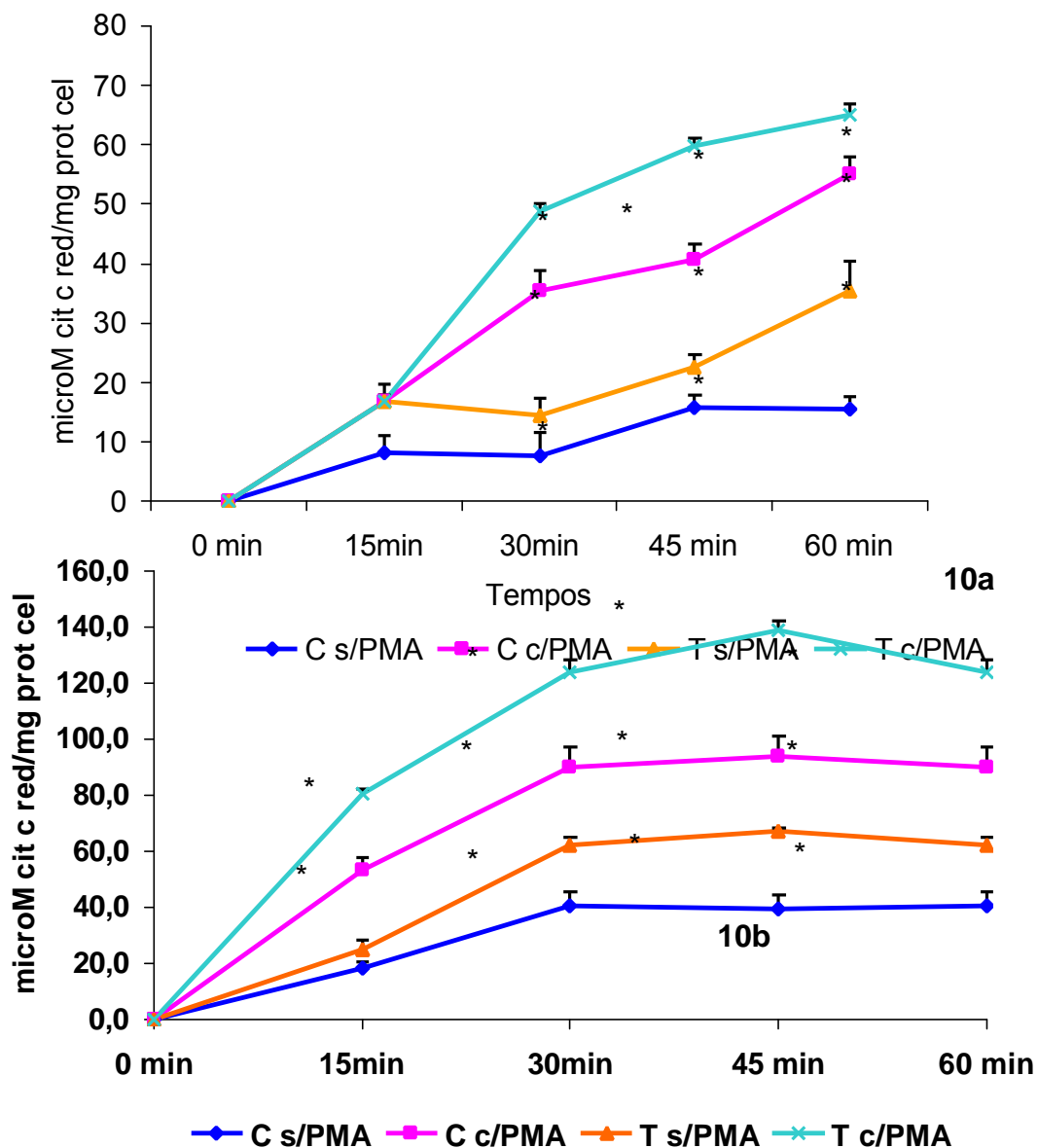
influência de ARAGAL sobre a produção dessas duas espécies reativas por macrófagos foi avaliada.

#### **6.1.1. Produção de ânion superóxido por macrófagos peritoneais de camundongos tratados com ARAGAL.**

A interferência de ARAGAL na produção de  $O_2^-$  resultante da ativação da NADPH oxidase está mostrada na figura 10. Nestes experimentos os animais do grupo controle foram inoculados com PBS estéril (i.p.), enquanto que os animais do grupo tratado foram inoculados (i.p.) com 100 (figura 10a) ou 200  $mg.kg^{-1}$  (figura 10b) de ARAGAL. Sete dias após a inoculação, os animais foram sacrificados, as células do exudato peritoneal coletadas e plaqueadas. As condições experimentais incluíram também a adição de PMA, um agente conhecido por seu efeito estimulador do “burst” respiratório *in vitro* (JUN et al., 1993; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). A figura 10a representa a produção de  $O_2^-$  por macrófagos de animais tratados intraperitonealmente com 100  $mg.kg^{-1}$  de ARAGAL, onde se observa que mesmo na ausência de PMA houve um aumento estatisticamente significativo na produção de  $O_2^-$  pelos macrófagos dos animais tratados com ARAGAL, quando comparados aos macrófagos dos animais do grupo controle, os quais foram inoculados com PBS estéril. Dessa maneira, na ausência de PMA, os macrófagos de animais tratados com ARAGAL estão ativados, visto que a partir de 30 minutos este parâmetro se mostrou maior que o grupo controle. Esta produção se mostrou ainda maior quando os macrófagos dos animais tratados com ARAGAL foram incubados *in vitro* com o PMA, neste caso o efeito foi observado a partir de 15 minutos. A figura 10b mostra a produção desta espécie reativa por macrófagos de animais tratados com uma dose

maior de ARAGAL, de  $200 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Também neste caso a produção de  $\text{O}_2^-$  mostrou-se aumentada na ausência e na presença do estimulador do “burst” respiratório caracterizando um efeito cumulativo destes dois efetores. Na figura 11 pode ser visualizada uma comparação entre os resultados da produção de  $\text{O}_2^-$ , no tempo de 60 minutos, pelos macrófagos de animais tratados com  $100$  e  $200 \text{ mg.kg}^{-1}$  de ARAGAL. Esta figura mostra que na ausência de PMA não houve diferença na produção de  $\text{O}_2^-$  quando os animais foram tratados com  $100$  ou com  $200 \text{ mg.kg}^{-1}$  do polímero. Entretanto, quando se compara os valores obtidos para a produção de  $\text{O}_2^-$  dos grupos tratados com as diferentes doses de ARAGAL na presença de PMA, observa-se que os macrófagos dos animais tratados com  $200 \text{ mg.kg}^{-1}$  do polímero estavam mais predispostos aos efeitos estimuladores do PMA no meio de reação, já que a produção de  $\text{O}_2^-$  foi maior que a observada pelos os macrófagos dos animais tratados com  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$ , portanto um efeito tempo e dose-dependente na presença do PMA. Estes resultados, obtidos com ARAGAL, foram similares a aqueles observados com zimosana, uma mistura de manana e glucana, que é utilizada para induzir o “burst” respiratório em células fagocíticas como macrófagos e neutrófilos (BADWAY & KARNOVSKI, 1980; KARNOVSKI & BADWAY, 1986; BERTON & GORDON, 1983; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Foram semelhantes também aos efeitos de uma preparação comercial de  $\beta$ -glucana, EcoActiva™, onde observou-se um significativo aumento no “burst” respiratório induzido pela presença de PMA (COOK et al., 2001). Entretanto, ARAGAL promoveu efeitos que são diferentes daqueles observados para a  $\alpha$ -D-glucana do líquen *Ramalina celastri*, a qual mostrou-se capaz de aumentar a produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , apenas quando na presença de

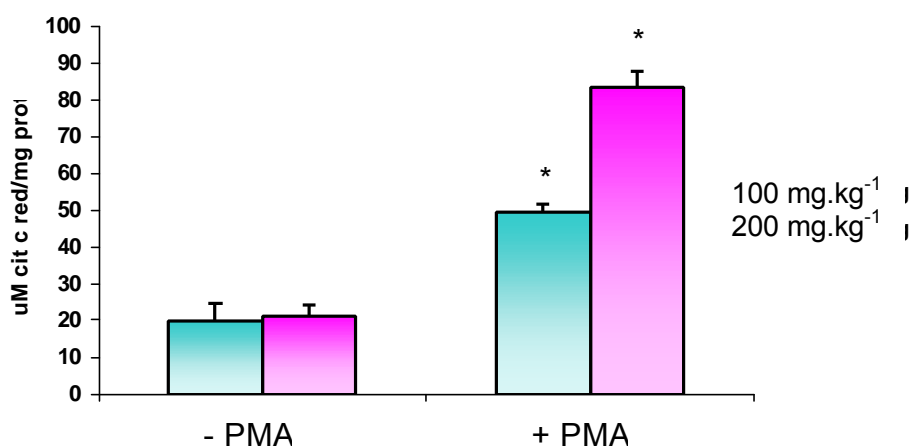
FIGURA 10: PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM ARAGAL.



Sistema: Camundongos (n=10, para cada grupo) foram inoculados intraperitonealmente com ARAGAL 100 (10a) ou 200 mg.kg<sup>-1</sup> 10b), ou PBS estéril (controle). Após 7 dias PEC de cada um dos grupos foram coletadas e plaqueadas separadamente. Macrófagos aderentes de cada um dos grupos foram incubados em meio de reação constituído de HBSS e ferricitocromo c (80  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) na ausência ou presença de 1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de PMA. Após cada um dos tempos indicados, a absorbância foi medida em 550 nm. A concentração de citocromo c reduzido, que corresponde a concentração de ânion superóxido produzido pelos macrófagos, foi determinada utilizando o Coeficiente de Extinção Molar para a mistura citocromo  $C_{\text{oxid-red.}} \Delta\epsilon = 2,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (JOHNSTON et al., 1978).

Os valores representam a média  $\pm$  DP. \* Diferença significativa do controle;  $p \leq 0,05$ .

FIGURA 11: PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM ARAGAL - TEMPO DE 60 MINUTOS.



Sistema: Produção de ânion superóxido após **60 minutos**, na presença ou ausência de PMA, por macrófagos tratados com ARAGAL nas concentrações indicadas. Camundongos (n=10, para cada grupo) foram inoculados intraperitonealmente com ARAGAL. Após 7 dias PEC de cada um dos grupos foram coletadas e plaqueadas separadamente. Macrófagos aderentes de cada um dos grupos foram incubados em meio de reação constituído de HBSS e ferricitocromo c (80  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) na presença de 1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de PMA. Após 60 minutos a absorbância foi medida em 550 nm. A concentração de citocromo c reduzido, que corresponde a concentração de ânion superóxido produzido pelos macrófagos, foi determinada utilizando o Coeficiente de Extinção Molar para a mistura citocromo  $C_{\text{oxid-red.}} \Delta\epsilon = 2,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (JOHNSTON *et al.*, 1978).

Os valores representam a média  $\pm$  DP. \* Diferença significativa do controle;  $p \leq 0,05$ .

PMA, o que caracteriza um efeito sinérgico ao PMA na indução do “burst” respiratório e não cumulativo (STUELP-CAMPELO et al., 2002).

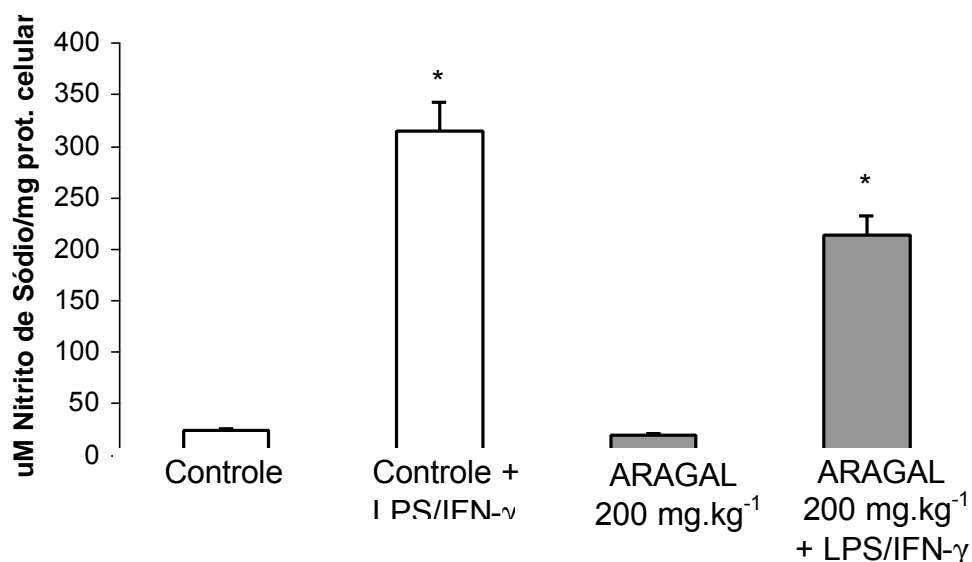
Os efeitos de ARAGAL na produção de  $O_2^-$  foram diferentes também quando comparados com outros polissacarídeos, os quais tem efeito inibitório sobre o “burst” respiratório. Um exemplo é a galactomana (GMPOLY) isolada também do líquen *Ramalina celastri*; este polímero promoveu uma diminuição tempo e dose-dependente na produção de  $O_2^-$ , sugerindo um efeito antioxidante para esta molécula (NOLETO et al., 2002).

#### **6.1.2. Produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais de camundongos tratados *in vivo* com ARAGAL.**

Outra via de importância para os macrófagos pela qual exercem a sua função é a via de produção de óxido nítrico ( $NO^*$ ), que atua como parte da resposta inflamatória contra patógenos, tais como bactérias, vírus e células tumorais e tem sido proposto como um dos importantes efetores da atividade tumoricida (MIWA et al., 1997). A produção de  $NO^*$  ocorre em resposta ao estímulo produzido principalmente por  $IFN-\gamma$  e LPS (STUEHR & MARLETTA, 1985; JAMES, 1995), sendo que na indução da enzima óxido nítrico sintase (iNOS) por  $IFN-\gamma$ , o LPS é reconhecido como molécula co-sinal (CUNHA et al., 1993). No presente estudo, a produção de  $NO^*$  foi determinada em experimentos de 48 horas de duração, desenvolvidos na ausência ou presença de  $IFN-\gamma$  e LPS, e onde os macrófagos foram obtidos de animais previamente tratados (i.p.) com diferentes concentrações de ARAGAL. A figura 12 mostra os resultados da produção de  $NO^*$  por macrófagos obtidos após sete dias do tratamento i.p. dos animais com  $200\text{ mg.kg}^{-1}$  de ARAGAL. Nesta figura pode-se observar que sob estas condições experimentais, ARAGAL não

exercer efeito ativador na produção de NO<sup>•</sup>. Estes resultados se assemelham àqueles obtidos com os polissacarídeos extracelulares neutros (NPS) e ácidos (APS) extraídos de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1, cuja composição é de galactose e glucose na razão molar de 3:2; estes, incubados com macrófagos da linhagem J774.1, também foram incapazes de estimular a produção de NO<sup>•</sup>. Porém, à semelhança de ARAGAL, os dois polímeros levaram ao desenvolvimento de alterações morfológicas características do processo de ativação e, apesar de não estimularem a via de produção de NO<sup>•</sup>, são capazes de ativar macrófagos, como verificado através de outras alterações funcionais (NISHIMURA-UEMURA et al., 2003). Vale também mencionar que o resultado encontrado para ARAGAL em relação a produção de NO<sup>•</sup> difere do observado para outros polissacarídeos, os quais estimulam a produção de NO<sup>•</sup>, como a  $\alpha$ -D-glucana de *Ramalina celastri*, que sete dias após a inoculação de 200 mg.kg<sup>-1</sup> estimulou a produção de NO<sup>•</sup> em cerca de 50% em relação ao grupo controle, na presença de LPS e IFN- $\gamma$  (STUELP-CAMPELO et al., 2002). A manana de levedura (MPOLY) e uma galactomana do líquen *R. celastri* (GMPOLY) estimularam a produção de NO em aproximadamente 40% na ausência de LPS e IFN- $\gamma$ . Sobretudo, o efeito de ARAGAL difere daqueles desencadeados pelo LPS; conhecido por estimular a produção de NO<sup>•</sup> e exibir uma variedade de atividades imunobiológicas (NISHIMURA-UEMURA et al., 2003). Considerando que a produção descontrolada de NO<sup>•</sup> pode levar a uma resposta tóxica exacerbada (COTRAN et al., 1994), a ausência de efeito estimulador por parte de ARAGAL pode estar relacionada com o fato de não se observar efeitos de toxicidade nos animais inoculados com esse polímero.

FIGURA 12: PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM ARAGAL.



Sistema: Camundongos (n=10, para cada grupo) foram inoculados intraperitonealmente com 200 mg.kg<sup>-1</sup> de ARAGAL, os animais do grupo controle foram inoculados com PBS estéril. Após 7 dias PEC de cada um dos grupos foram coletadas e plaqueadas separadamente. Macrófagos aderentes de cada um dos grupos foram incubados em meio de crescimento (MC) na presença ou ausência de 50 ng.mL<sup>-1</sup> de LPS + 26 U.mL<sup>-1</sup> de IFN- $\gamma$ . Após 24 horas, 100  $\mu$ L do sobrenadante foram incubados com 100  $\mu$ L do reagente de Griess para determinação da produção de NO. Após 10 minutos a absorbância foi medida em 550 nm. A concentração de nitrito foi determinada utilizando uma curva padrão de NaNO<sub>2</sub>. Os valores representam a média  $\pm$  DP. \* Diferença significativa do controle; p $\leq$  0,05.

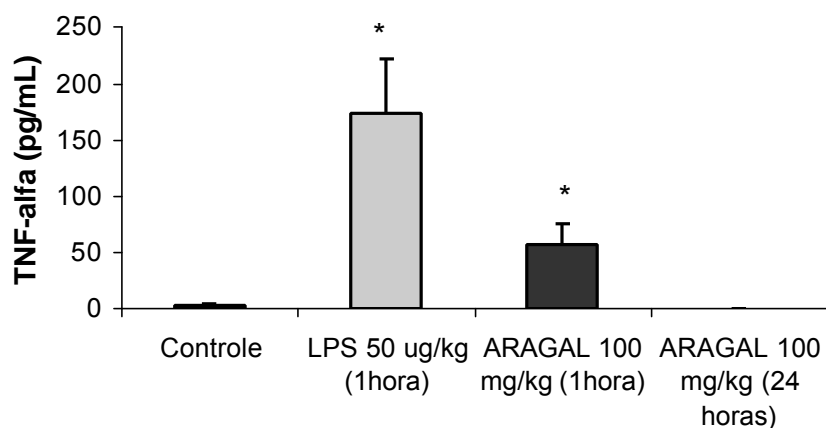
### **6.1.3. Produção de TNF- $\alpha$ por macrófagos peritoneais de camundongos tratados *in vivo* com ARAGAL.**

O processo de ativação de macrófagos inclui, além das alterações morfológicas, o aumento da capacidade fagocítica, da produção de  $O_2^-$  e da produção de  $NO^*$ , aspectos que já foram abordados neste trabalho. Além destes, o processo de ativação de macrófagos inclui a geração de citocinas, como as interleucinas (ILs), interferons (IFN) e fator de necrose tumoral (TNF), os quais estão diretamente envolvidos na destruição de células tumorais (SONG et al., 2002). De fato, um dos mecanismos para os efeitos antitumorais dos polissacarídeos tem sido relacionado com a indução da produção de TNF (TAKAHASHI et al., 1988a; TAKAHASHI et al., 1988b; LUETTIG et al., 1989; MORI et al., 1989; USAMI et al., 1988; WONG et al., 1994). Portanto, a avaliação do efeito de ARAGAL neste parâmetro se fez importante.

A figura 13 mostra resultados de experimentos em que os animais do grupo controle foram inoculados com PBS estéril (i.p.), enquanto que os animais do grupo tratado foram inoculados (i.p.) com  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$  de ARAGAL. Em um terceiro grupo, o controle positivo, os animais foram inoculados com  $50 \text{ }\mu\text{g.kg}^{-1}$  de LPS. Uma ou 24 horas após a inoculação, a produção de TNF- $\alpha$  no fluido peritoneal foi determinada. Nesta figura é possível observar que 1 hora após a inoculação do polissacarídeo ARAGAL, a produção de TNF- $\alpha$  estava significativamente aumentada quando comparada aos animais do grupo controle inoculados com PBS. Neste grupo, a produção de TNF- $\alpha$  foi de  $\sim 2 \text{ pg.mL}^{-1}$ , enquanto que no fluido peritoneal de animais tratados com  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$  de ARAGAL a produção foi de  $\sim 57 \text{ pg.mL}^{-1}$ . No controle positivo, como esperado, a produção de TNF- $\alpha$  ( $\sim 174 \text{ pg.mL}^{-1}$ ) foi detectada no



FIGURA 13: PRODUÇÃO DE FATOR DE NECROSE TUMORAL- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM ARAGAL.



Sistema: Camundongos (n=10, para cada grupo) foram inoculados intraperitonealmente com  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$  de ARAGAL, os animais do grupo controle foram inoculados com PBS estéril e um grupo de animais inoculados com  $50 \mu\text{g.kg}^{-1}$  de LPS foi utilizado como controle positivo. Uma ou 24 horas após a inoculação, os animais foram sacrificados e o fluido peritoneal foi coletado com PBS estéril e centrifugado. O “pellet” de células foi descartado e o sobrenadante foi congelado à  $-70 \text{ }^\circ\text{C}$  até o uso. Os níveis de TNF- $\alpha$  no fluido peritoneal foram medidos por “enzyme-linked immunosorbent assay” (ELISA) como descrito em materiais e métodos. Os valores representam a média  $\pm$  DP. \* Diferença significativa do controle;  $p < 0,05$ .

fluido peritoneal de animais inoculados com  $50 \text{ ng.kg}^{-1}$  de LPS. A produção de TNF- $\alpha$  induzida por ARAGAL, uma hora após o tratamento, foi 26 vezes maior que a produção no fluido peritoneal dos animais controle (PBS). Após 24 h da inoculação de ARAGAL, o TNF- $\alpha$  não foi mais detectado no fluido peritoneal dos animais, o que sugere um estímulo imediato e transitório na produção de TNF- $\alpha$ . Este resultado é importante considerando a relação existente entre esta citocina e a atividade antitumoral, pois o TNF- $\alpha$  induz a lise de células malignas e causa regressão de alguns tumores em animais (CALLARD, 1990), além de induzir necrose de certos tumores experimentais *in vivo* (CARSWELL et al., 1975) e exercer efeitos citotóxicos e citostáticos em várias linhagens tumorais *in vitro* (WATANABE et al., 1985; HARANAKA & SATOMI, 1981).

O aumento da produção de TNF- $\alpha$  induzido por ARAGAL pode ser comparado aos efeitos demonstrados para a lentinana (CHIHARA et al., 1969; CHIHARA et al., 1970; MIZUNO et al., 1995; TAKATSUKI et al., 1996) e para o complexo polissacarídeo-proteína, PSPC, extraído do cogumelo *Tricholoma lobayense* (LIU et al., 1995; LIU et al., 1996). Estes polímeros aumentaram dramaticamente a síntese do mRNA de TNF- $\alpha$  3 horas após a inoculação, sendo que a partir de 24 horas os níveis de mRNA para TNF- $\alpha$  começaram a baixar (LIU et al., 1999). Segundo alguns autores (WONG et al., 1994), polissacarídeos contendo em sua estrutura ácidos urônicos possuem a capacidade de induzir a produção de TNF e a atividade antitumoral. Isto foi verdadeiro para um polissacarídeo ácido (PH-I Cb) extraído da raiz de *Pseudostellaria heterophylla* e demonstrado como um forte indutor na produção de TNF por macrófagos tanto *in vitro* como endógeno no soro e no fluido ascítico de animais portadores de tumor ascítico de Ehrlich (EAT) (WONG

et al., 1994). Considerando a presença de ácido urônico na estrutura de ARAGAL, tal possibilidade poderia ser também verdadeira para essa arabinogalactana. Polissacarídeos de várias outras fontes como microrganismos (UM et al., 2002), fucogalactanas (MIZUNO et al., 2000) e aqueles isolados de *Panax ginseng* (SONG et al., 2002; LIM et al., 2002) também estimularam a produção de TNF.

Os resultados até aqui obtidos sugerem que ARAGAL tem propriedades de um modificador da resposta biológica (MRB). Isto porque ARAGAL foi capaz de elicitar para a cavidade peritoneal de camundongos macrófagos com características morfológicas e funcionais de células ativadas.

O estímulo da fagocitose causado por ARAGAL foi muito significativo. A fagocitose representa o passo final e indispensável do sistema de defesa imunológico (VAN OSS, 1986) e, uma vez que os fagócitos atuam como as células efetoras e regulatórias, um estímulo da função fagocítica deve contribuir na terapia contra infecções bacterianas e invasões tumorais (POPOV et al., 1999). Desta forma, a próxima etapa do trabalho foi referente a análise desta possibilidade.

## **6.2. EXPERIMENTOS COM CÉLULAS DO SARCOMA-180 (S-180)**

### **6.2.1. Efeito de ARAGAL sobre células do S-180 *in vitro*.**

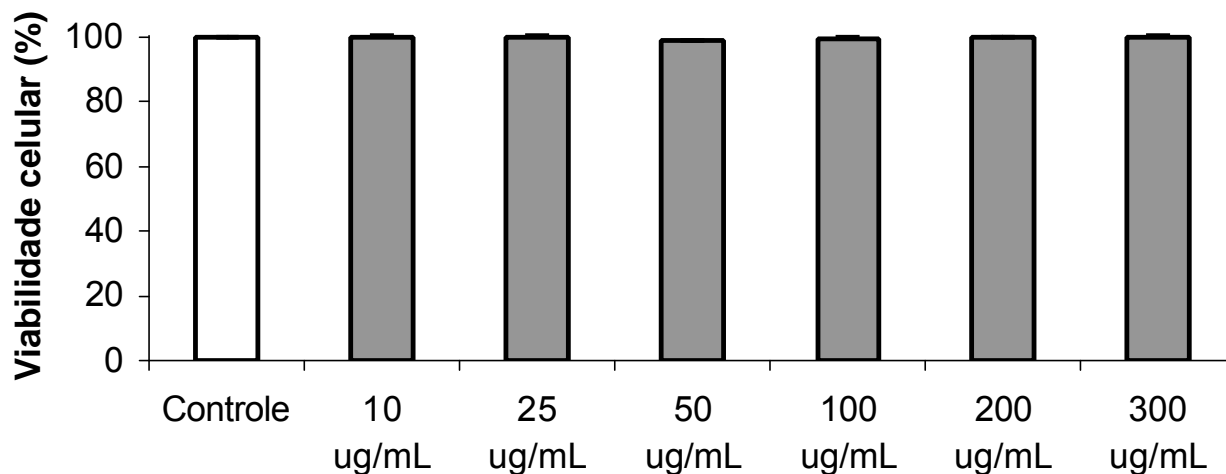
Os experimentos cujos resultados estão apresentados na figura 14 foram desenvolvidos com a finalidade de avaliar se ARAGAL interferia na viabilidade das células do S-180. Nestes, as células do S-180 foram incubadas *in vitro* por 1 hora em presença de concentrações ARAGAL que variaram de 10 a 300  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . O resultado encontrado mostrou que não houve alteração da viabilidade de células do

S-180 causada pelo polímero nestas condições experimentais, caracterizando a ausência de toxicidade do polímero sobre esta linhagem de células, a exemplo do observado também na viabilidade de macrófagos (Figura 3).

Considerando o fato de ARAGAL não apresentar toxicidade direta às células do S-180, e ainda os seus efeitos ativadores da função de macrófagos, onde ARAGAL mostrou-se capaz de ativar estas células tanto *in vitro* como *in vivo*, a análise da interação entre macrófagos peritoneais tratados *in vitro* com ARAGAL e células do S-180 se tornou importante.

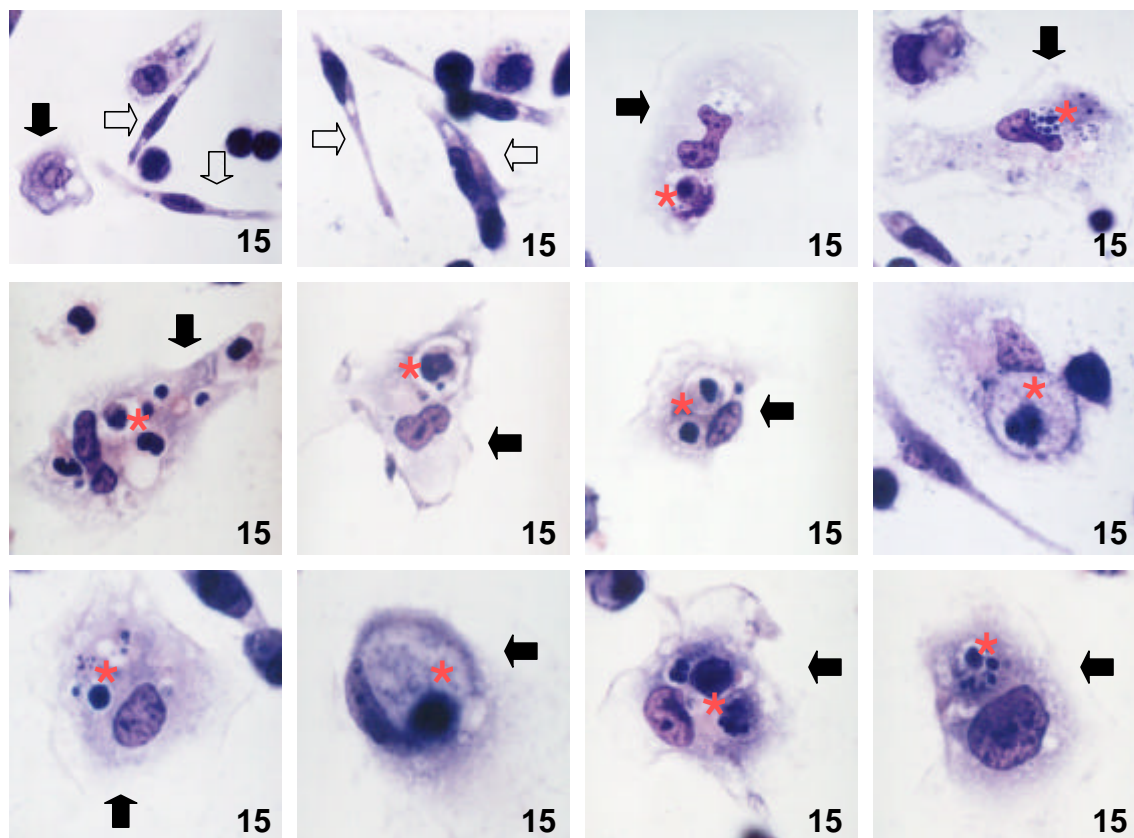
Com tal finalidade, macrófagos peritoneais de camundongos foram cultivados na presença de diferentes concentrações de ARAGAL (10 a 200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e então co-incubados com as células do S-180 por mais 18 h. O resultado deste experimento está mostrado na figura 15, onde se observa as imagens representativas de tais experimentos. No grupo controle (Figura 15 a, b) a maioria dos macrófagos são residentes (setas abertas) e apenas alguns estão ativados (setas fechadas). Um dado importante é que estes não apresentam estruturas de células tumorais fagocitadas. Entretanto, nos grupos onde as células foram pré-tratadas com ARAGAL (Figuras 15 e – l), a maioria delas células apresentam características morfológicas de macrófagos ativados, reproduzindo os resultados anteriormente mostrados (Figura 7 e 10). Além disso, estas células apresentam dentro de seu citoplasma vacúolos citoplasmáticos contendo estruturas das células do S-180 (asteriscos). Estes resultados indicam que macrófagos pré-tratados com ARAGAL apresentam habilidade em fagocitar porções celulares de células do S-180, as quais podem ter sido destruídas pela atividade biomoduladora que ARAGAL exerce sobre os macrófagos peritoneais. De fato, a lise das células tumorais pode ser uma

FIGURA 14: EFEITO *IN VITRO* DE ARAGAL SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE CÉLULAS DO SARCOMA-180 (S-180).



Sistema: Células do S-180 foram incubadas em meio de crescimento (MC) na ausência ou presença das concentrações indicadas de ARAGAL. Após 1 hora o sobrenadante foi retirado e centrifugado e o "pellet" de células obtido foi ressuspensão em PBS. As células aderentes foram descoladas após incubação por 2 minutos com EDTA 2 mM. A suspensão contendo as células que estavam aderidas à placa foi centrifugada e o "pellet" de células obtido foi ressuspensão em PBS. Os dois "pellets" de células, não aderentes (do sobrenadante) e aderentes, foram reunidos e a viabilidade da suspensão resultante foi avaliada pelo método do azul de Trypan. Os valores representam a média  $\pm$  DP (n=3). 100% de viabilidade corresponde à viabilidade celular determinada para as células cultivadas em meio de crescimento (MC). \* Diferença significativa do controle;  $p \leq 0,05$ .

FIGURA 15: INTERAÇÃO *IN VITRO* ENTRE MACRÓFAGOS PRÉ-EXPOSTOS *IN VITRO* COM ARAGAL E CÉLULAS DO S-180.



Sistema: Macrófagos aderentes em lamínulas de vidro foram incubados na ausência ou presença de ARAGAL nas concentrações de 10 a 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Após 24 horas o sobrenadante foi descartado, as lamínulas contendo as monocamadas de macrófagos foram lavadas e incubadas em MC em presença de células do S-180. Após 18 horas de co-incubação as lamínulas foram lavadas e processadas para microscopia óptica. Coloração: Giemsa. (1000X); Setas abertas: macrófagos residentes; Setas fechadas: macrófagos ativados; (\*) : estruturas de células do S-180. As micrografias desta figura são representativas.

15 a,b) Controle; 15 b,c) ARAGAL 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; 15 d,f) ARAGAL 25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; 15 g,h) ARAGAL 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; 15 i,j) ARAGAL 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; 15 k,l) ARAGAL 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

consequência da liberação do TNF- $\alpha$ , produto dos macrófagos ativados por ARAGAL, ou mesmo resultante de uma ação direta dos macrófagos ativados sobre estas células. Embora estes resultados sejam uma demonstração inequívoca de que macrófagos pré-tratados *in vitro* com ARAGAL, quando co-incubados com células do S-180, foram capazes de fagocitar porções destas células, as condições do experimento não permitiam análises quantitativas deste efeito. Sendo assim, uma análise da atividade antitumoral de ARAGAL *in vivo*, mais detalhada, se fez necessária.

Os experimentos visando analisar a atividade antitumoral de ARAGAL em animais portadores de tumor foram realizados utilizando o modelo do S-180 em crescimento ascítico e crescimento subcutâneo como tumor sólido.

#### **6.2.2. Efeito de ARAGAL sobre células do S-180 *in vivo*.**

A atividade de ARAGAL frente as células de S-180 na forma ascítica foi avaliada de acordo com a metodologia proposta por SAIMA et al. (2000) e MIZUNO et al. (1986) na qual o número de células viáveis do S-180 presentes no fluido peritoneal foi determinado segundo o método do azul de Trypan, 3 dias após a inoculação i.p. diária de 50 ou 100 mg.kg<sup>-1</sup> de ARAGAL. A figura 16 mostra os resultados obtidos neste experimento, onde está representado o número de células do S-180 que permaneceram viáveis após o tratamento i.p. com diferentes concentrações de ARAGAL. Verifica-se diminuição no número de células tumorais viáveis nos animais tratados com ARAGAL, resultando em inibição do crescimento do S-180 ascítico. Esta inibição foi de 33% de 66% quando os animais foram tratados com três doses de 50 e 100 mg.kg<sup>-1</sup> de ARAGAL, respectivamente. O

presente resultado fortalece a proposição de que ARAGAL, além de exercer atividade ativadora de macrófagos *in vitro*, capacitando estas células a fagocitar em porções celulares de células do S-180, exerce esta atividade também *in vivo*. Sendo assim, a redução dos tumores ascíticos é justificada devido a atividade biomoduladora exercida por ARAGAL sobre os macrófagos peritoneais. Resultados similares foram demonstrados para um heteropolissacarídeo ácido (FL-1A-I) isolado de *Feronia limonia*, composto por 82,5% de ácido galacturônico, 8,2% de ramnose, 4,7% de galactose, 5,4% de arabinose e traços de glucose e xilose (SAIMA et al., 2000). Este polímero, quando inoculado i.p., apresentou atividade antitumoral frente ao carcinoma ascítico de Ehrlich, sendo que a inibição do crescimento do tumor ascítico, a qual foi medida segundo a mesma metodologia utilizada neste trabalho para o S-180 ascítico, foi de 58 e 75%, para doses de 50 e 100 mg.kg<sup>-1</sup> do polímero respectivamente (SAIMA et al., 2000).

As condições em que foram feitos estes experimentos permitiram a ativação dos macrófagos no mesmo local onde as células tumorais foram inoculadas. No entanto, era importante avaliar também se este efeito estaria presente em animais portadores da forma sólida do S-180. Para isso, células do S-180 foram implantadas subcutaneamente na região interescapular dos animais e, no dia seguinte, os animais foram inoculados (i.p.) com 100 mg.kg<sup>-1</sup> de ARAGAL. O crescimento dos tumores foi avaliado no 21<sup>o</sup> dia após a implantação das células.

Na figura 17 estão mostrados os resultados referentes a massa média dos tumores dos animais dos grupos controle e tratados com ARAGAL (100 mg.kg<sup>-1</sup>). Os dados referentes as massas dos tumores foram utilizados para calcular a percentagem de inibição de crescimento do S-180 (MIZUNO et al., 1986; KOJIMA et

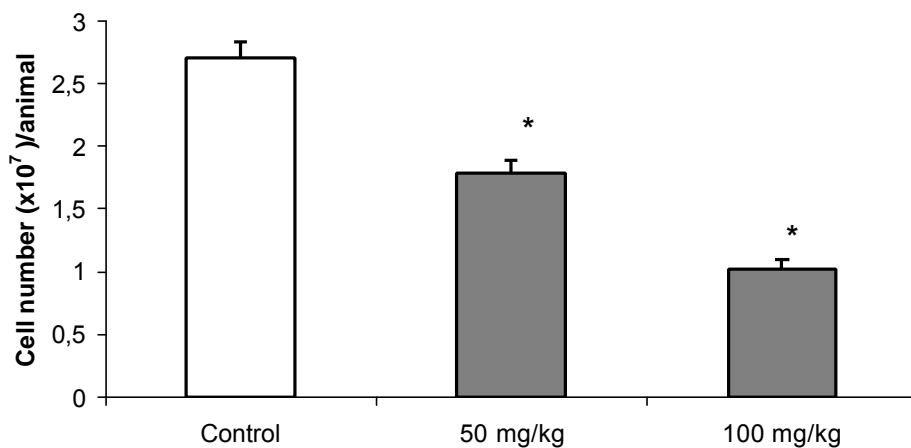


al., 1986; BLASCHEK et al., 1992; REN et al., 1995). Para o grupo de animais tratados com  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$  do polímero, o percentual de inibição de crescimento encontrado foi de ~39% em relação seu grupo controle; mostrando que um efeito antitumoral é possível mesmo quando a inoculação do polissacarídeo se dá em local diferente daquele onde as células estão instaladas. Segundo os critérios estabelecidos por MIZUNO et al. (1986), a arabinogalactana ARAGAL seria classificada como um polissacarídeo de atividade antitumoral regular, visto que seu percentual de inibição ficou entre 26 e 50%. A utilização de dose única de polissacarídeo parece ser mais eficaz do que a sua administração repetida a intervalos regulares ou ainda seu fracionamento em doses maiores associado a uma administração prolongada (STUELP-CAMPELO et al., 2002). Essa observação baseia-se em alguns resultados encontrados na literatura, como os propostos por CARNEIRO-LEÃO (1998), que analisou a atividade antitumoral da  $\alpha$ -D-glucana de *Ramalina celastri*. Quando uma única dose de  $200 \text{ mg.kg}^{-1}$  deste polímero era inoculada i.p. em animais portadores de S-180 subcutâneo, 24 horas após a implantação das células tumorais, observou-se uma inibição do crescimento de 80%, porém quando esta dose foi administrada de forma repetida a intervalos regulares, observou-se uma diminuição da inibição do crescimento, para 60% (STUELP-CAMPELO, 2002).

### **6.3. EXPERIMENTOS COM OUTRAS LINHAGENS CELULARES**

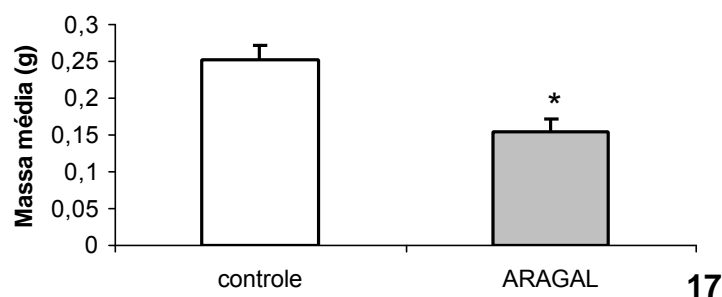
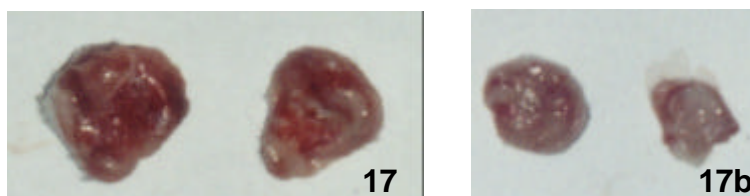
A maioria dos estudos visando determinar a atividade anti-tumoral de polissacarídeos foram desenvolvidos contra células do Sarcoma 180. Entretanto,

FIGURA 16: EFEITO DE ARAGAL SOBRE O CRESCIMENTO DO SARCOMA 180 (S-180) ASCÍTICO EM CAMUNDONGOS.



Sistema: Camundongos (n=10, para cada grupo) foram inoculados intraperitonealmente com células do S-180 (dia zero). Nos dias 1,2 e 3 (24, 48 e 72 h após inoculação das células do S-180), os animais dos grupos tratados foram inoculados (i.p.) com as concentrações indicadas de ARAGAL ou com PBS estéril (controle). No dia 4 (96 h após a inoculação das células), os animais foram sacrificados por asfixia e as células do S-180 da cavidade peritoneal foram coletadas com 10 mL de PBS estéril, centrifugadas e ressuspensas em PBS estéril. O número de células do S-180 viáveis foi avaliados pelo método do azul de Trypan. Os valores representam a média  $\pm$  DP. \* Diferença significativa do controle;  $p \leq 0,05$ .

FIGURA 17: EFEITO DE ARAGAL SOBRE A MASSA TUMORAL DE SARCOMA 180 (S-180).



Sistema: Células do S-180 ( $5 \times 10^5$ ) em 200  $\mu\text{L}$  foram inoculadas (s.c.) em camundongos. Após 24 h da implantação das células tumorais, os animais do grupo controle foram inoculados (i.p.) com PBS estéril, e os animais do grupo tratado com ARAGAL foram inoculados (i.p.) com 100  $\text{mg.kg}^{-1}$  de ARAGAL (n=21). No 21º dia após a implantação das células, os animais foram sacrificados os tumores dissecados e pesados para avaliação da massa média dos tumores. Os valores representam a média  $\pm$  EPM. \* Diferença significativa do controle;  $p \leq 0,05$ .

17a) Tumores representativos dos animais do grupo controle

17b) Tumores representativos dos animais do grupo tratado co ARAGAL

17c) Massa tumoral média dos tumores

outras linhagens estão disponíveis, como a de células B16-F10, que são células de melanoma de alto potencial metastático úteis como modelo de estudo da atividade de agentes anti-tumorais, e ainda porque o melanoma constitui uma das modalidades de tumor que parece apresentar resposta à imunoterapia (WACK et al., 2001; LOTZE et al., 2001). Assim, uma avaliação dos efeitos de ARAGAL sobre esta linhagem tumoral seria relevante. Além desta, outro modelo muito utilizado *in vitro* são as células HeLa, derivadas de carcinoma de cérvix uterino, de características epiteliais. Ambas as linhagens foram também utilizadas neste trabalho para a verificação dos efeitos diretos de ARAGAL.

### **6.3.1. Viabilidade e proliferação das células de melanoma B16-F10 tratadas *in vitro* com ARAGAL**

Os experimentos cujos resultados estão mostrados nas figuras 18 e 19 foram planejados com a finalidade de avaliar se ARAGAL interferia na viabilidade e proliferação das células B16-F10. Nestes experimentos as células do melanoma B16-F10 foram incubadas na ausência (grupo controle) ou presença de concentrações variadas de ARAGAL ( $10 - 300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e a viabilidade desta linhagem celular foi avaliada pelo método do MTT após 1, 2 ou 3 horas de cultivo. Verifica-se na figura 18 que em nenhum dos tempos testados ARAGAL alterou a viabilidade da monocamada de células B16-F10, sugerindo que, nestas condições experimentais, este polissacarídeo não apresenta toxicidade *in vitro* sobre esta linhagem de células tumorais, tal como anteriormente verificado para macrófagos e para as células do S-180. A ausência de efeitos imediatos à viabilidade das células B16-F10 não excluía a possibilidade de ARAGAL induzir efeitos na proliferação

destas células. Para avaliar esta possibilidade, células B16-F10 foram mantidas nas condições de cultivo durante 16 horas, para que uma monocamada de células uniforme fosse estabelecida. Após o descarte do sobrenadante, as células foram incubadas por 24 horas na ausência de SFB, permitindo-se que as células entrassem na fase  $G_0$  do ciclo celular. Então, o efeito de ARAGAL foi avaliado após 24, 48 ou 72 horas de cultivo na ausência (grupo controle) ou presença de diferentes concentrações do polímero ( $10 - 300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). A figura 19 apresenta os resultados referentes a estes experimentos, onde é possível observar que a proliferação das células B16-F10 mostrou-se apenas discretamente alterada quando estas células foram incubadas na presença de ARAGAL. Nesta figura está ilustrado o perfil da proliferação das células (figura 19a) incubadas com as diferentes concentrações de ARAGAL por 24, 48 e 72 horas. Nota-se, na figura 19b, que embora tenha havido um nítido efeito dependente da dose e do tempo de exposição das células ao polímero, a porcentagem de inibição não ultrapassou ~22% após 72 h de cultivo com  $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de ARAGAL, mostrando de fato um efeito muito discreto sobre este parâmetro.

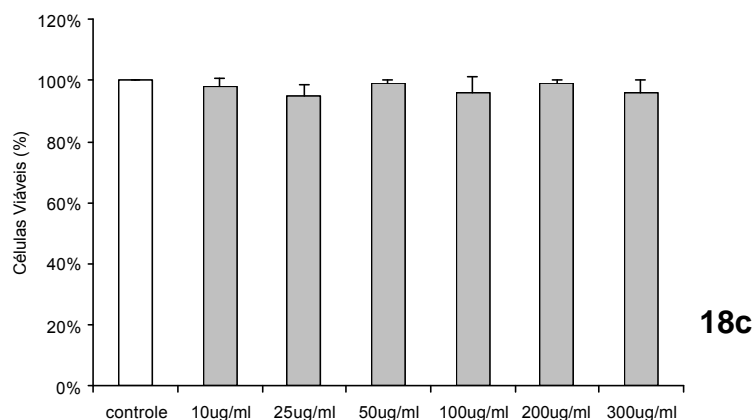
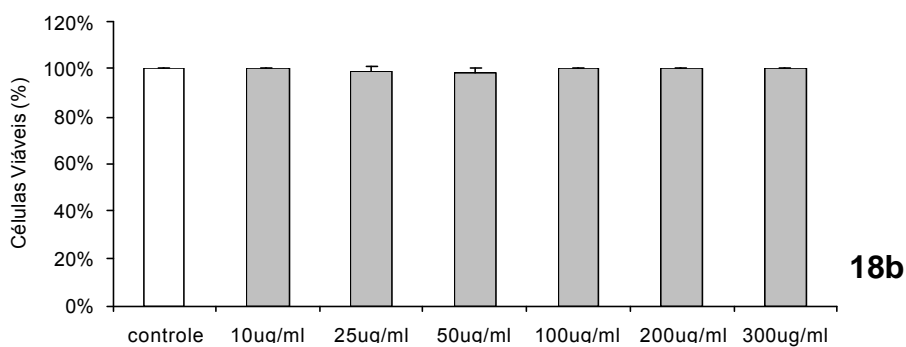
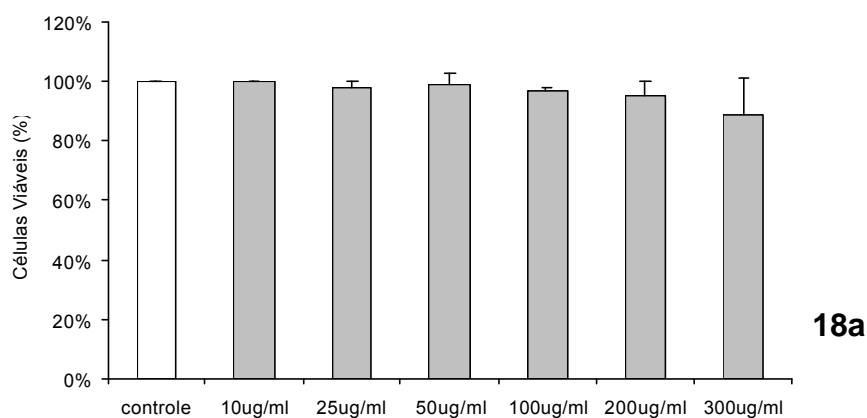
### **6.3.2. Morfologia de células B16-F10 e células HeLa tratadas *in vitro* com ARAGAL.**

O estudo das alterações de morfologia celular consiste em um instrumento importante pelo qual informações sobre a possível citotoxicidade das substâncias testadas podem ser obtidas. Portanto, esta é uma etapa obrigatória na determinação dos efeitos biológicos de diferentes compostos. A ausência de efeitos sobre a

redução do MTT não excluía a possibilidade de efeitos deletérios causados por ARAGAL às células. Com a finalidade de verificar tal possibilidade, alguns parâmetros morfológicos das células B16-F10 foram analisados quanto ao efeito de ARAGAL.

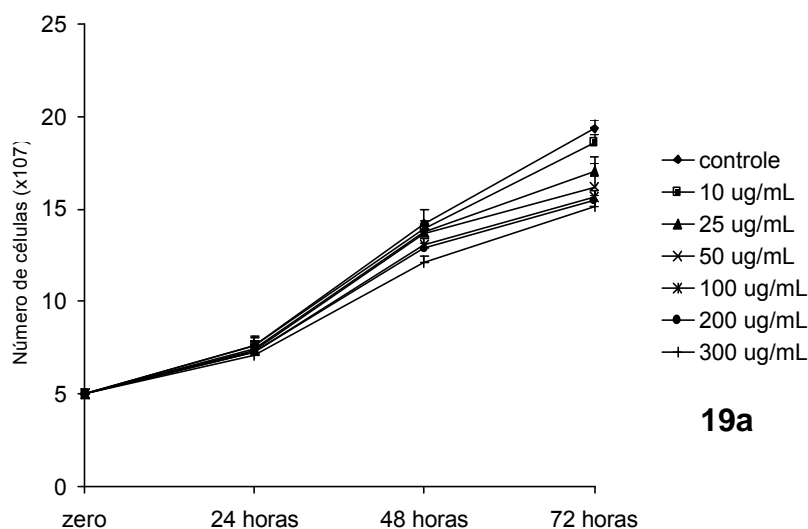
A Figura 20 apresenta as características das células B16-F10 crescidas na ausência (controle) de ARAGAL. Verifica-se a presença de núcleos grandes nas células, muitas vezes apresentando mais de um por célula, presença de vários

FIGURA 18: EFEITO *IN VITRO* DE ARAGAL SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS B16-F10.

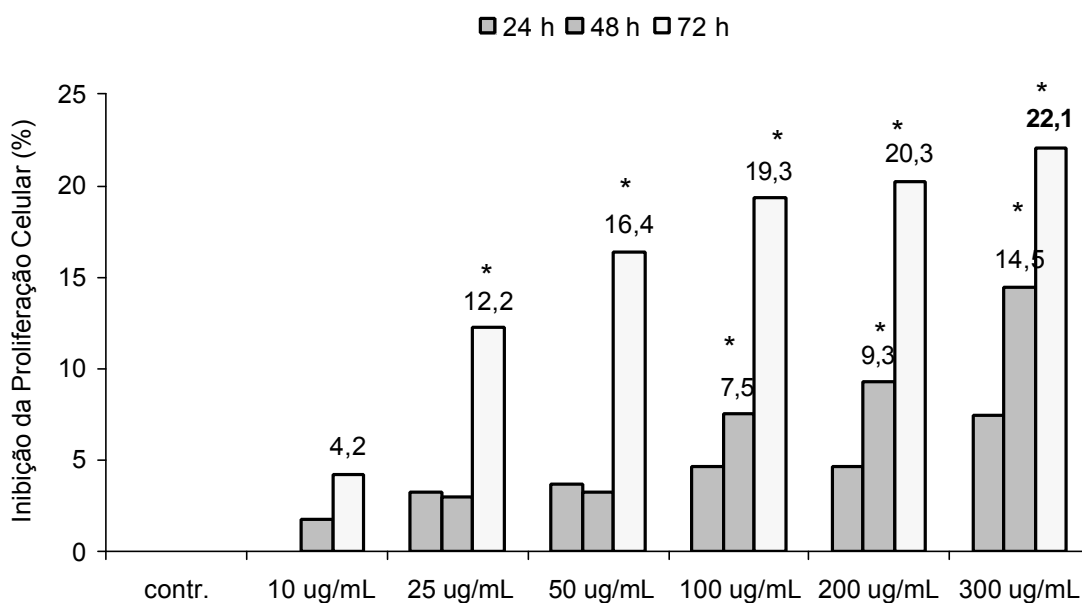


Sistema: Células B16-F10 foram incubadas na ausência (grupo controle) ou presença das concentrações indicadas de ARAGAL. Após 1 (a), 2 (b) ou 3 (c) horas, o meio foi removido e o reagente MTT foi adicionado, seguindo-se de incubação por mais 3 horas. O excesso de MTT foi removido e DMSO adicionado. A absorbância foi medida em 550 nm com filtro de 655 nm como referência. Os valores representam a média  $\pm$  DP (n=3). 100% de viabilidade corresponde à viabilidade celular determinada para as células cultivadas em meio de crescimento (MC). \* Diferença significativa do controle;  $p \leq 0,05$ .

FIGURA 19: EFEITO DE ARAGAL SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS B16-F10 *IN VITRO*.



19a



19b

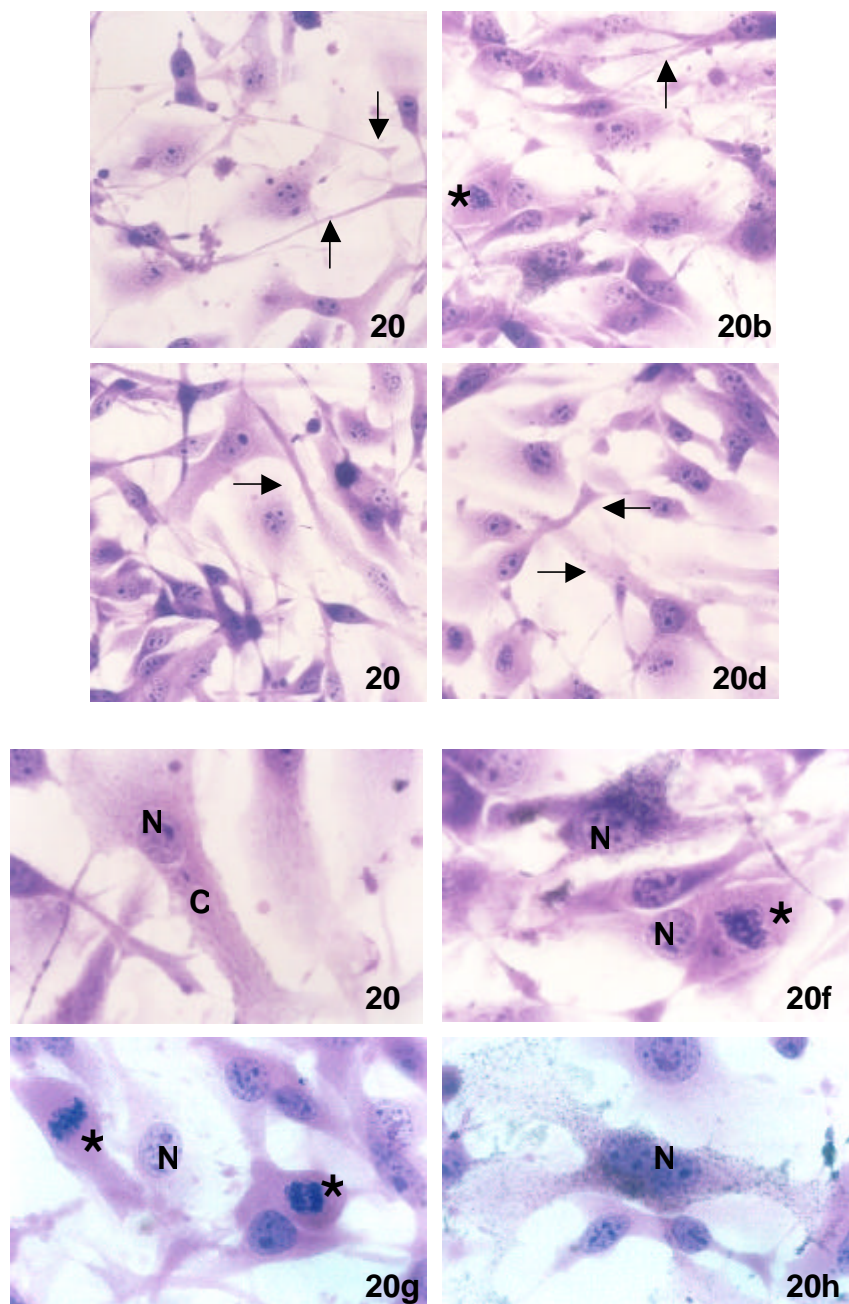
Sistema: Células B16-F10 foram incubadas em meio de crescimento (MC) durante 16 horas. O sobrenadante foi removido e as células foram incubadas por 24 h em meio Eagle - MEM sem SFB. Em seguida, as células foram incubadas por mais 24, 48 ou 72 horas em MC na ausência (grupo controle) ou presença das concentrações indicadas de ARAGAL. Após cada um dos tempos citados acima o meio foi removido e o reagente MTT foi adicionado, seguindo-se de incubação por mais 3 horas. O excesso de MTT foi removido e adicionado DMSO. A absorbância foi medida em 550 nm com filtro de 655 nm como referência. Os valores representam a média  $\pm$  DP (n=3). \* Diferença significativa do controle;  $p \leq 0,05$ .

19a) Perfil da proliferação celular

19b) Inibição da proliferação celular (%)



FIGURA 20: CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE CÉLULAS B16-F10



Sistema: Células B16-F10 foram incubadas em meio de crescimento (MC) em placas contendo lamínulas de vidro durante 12 - 72 horas em estufa com 5% CO<sub>2</sub>. Aos tempos determinados as lamínulas foram processadas para microscopia óptica. Coloração Giemsa; N=: núcleo; C= citoesqueleto organizado; \* = figuras de mitose; setas: expansões celulares longas. As micrografias desta figura são representativas.

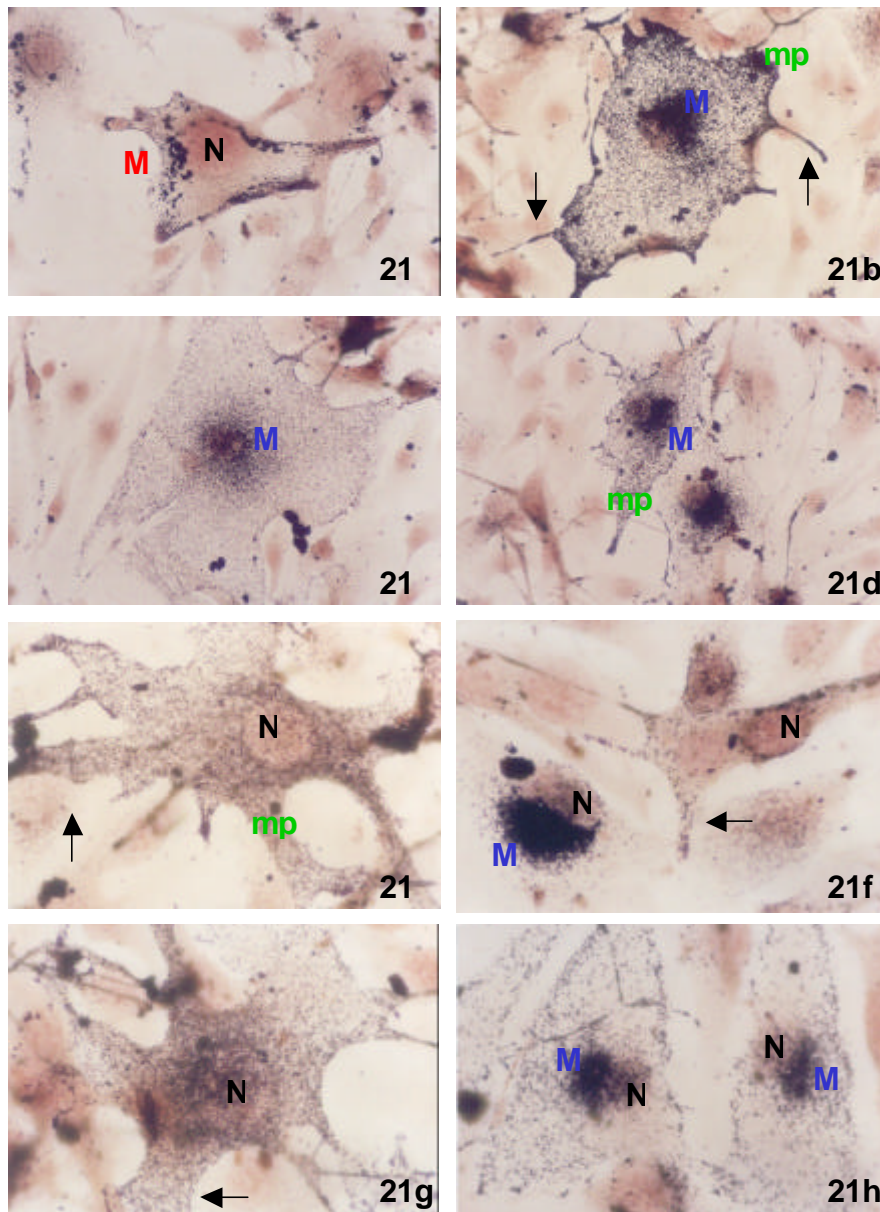
⇒ Células cultivadas por 24 (a,e), 36 (b,f), 48 (c,g) e 72 (d,h) horas. Micrografias a - d: 400X; Micrografias e - h: 1000X

nucléolos, chegando até a 8 por núcleo; expansões celulares bastante longas e citoplasma com citoesqueleto organizado, características para estas células. Para a visualização dos melanossomos, organelas subcelulares presentes em células de melanoma que são responsáveis pela produção e armazenamento da melanina (GILCHREST et al., 1996), foi utilizada uma coloração específica - prata amoniacal - e as ilustrações referentes a esta coloração estão representadas na figura 21. Verifica-se a presença de melanossomos perinucleares (MP) e aqueles chamados de melanossomos periféricos (mpe), presentes nas expansões celulares conforme o espalhamento das células, ambos característicos para melanócitos (GILCHREST et al., 1996). Além disso, nesta figura pode-se observar outra característica desta linhagem celular, o freqüente aparecimento de células com volume aumentado (Figuras 21 a – d) e a presença de melanossomos gigantes no citoplasma de algumas células (Figura 21a). As características aqui relacionadas são consideradas de observações usuais para estas células, indicando uma boa adaptação do seu crescimento nas condições do Laboratório de Cultivo Celular do Departamento de Bioquímica da UFPR. Na figura 22 estão apresentadas imagens representativas das células B16-F10 cultivadas em presença de ARAGAL. Concentrações inferiores a  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do polímero não induziram alterações morfológicas significativas (Figuras 22 a, b), porém quando as células foram cultivadas com  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (Figuras 22 c, d) foram observadas algumas regiões eosinofílicas próximas ao núcleo; quando as células foram cultivadas com  $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (Figuras 22 e, f) e  $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (Figuras 22 g, h) pode-se notar a presença de projeções celulares bastante longas e filiformes, as quais formaram uma trama de projeções citoplasmáticas, e além disso, nestas duas últimas concentrações, algumas células apresentaram

expansões globosas (*blebs*) características de sofrimento celular. Além disso, em altas concentrações de ARAGAL, foi observada uma diminuição na quantidade de células aderidas a lamínula, como indicado nas figuras 22 g e h, o que poderia estar relacionado ao discreto efeito inibidor da proliferação destas células em presença de ARAGAL (Figura 19) ou com interferência na adesão celular, como descrito para outros polímeros (STUELP-CAMPELO et al., 2002).

Na outra linhagem avaliada, a linhagem de células HeLa, os experimentos realizados de acordo com o mesmo protocolo, ou seja, na presença de 10 a 300  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de ARAGAL durante 24, 48 ou 72 h, mostraram que quando utilizada nas concentrações de 25 e 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (Figuras 23 b, c), ARAGAL induziu a formação de uma intensa condensação celular e a presença de *blebs*, características de sofrimento celular. Com concentrações de 100 e 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (Figuras 23 d, e), estas características se tornaram ainda mais freqüentes, indicando um efeito dependente da concentração do polímero. A diminuição na quantidade de células aderidas a lamínula, quando cultivadas em presença de altas concentrações de ARAGAL, também foi verificada para a linhagem de células HeLa (Figura 23 e), assim como detectada para as células B16-F10. Pode-se concluir, portanto, que os efeitos diretos causados por ARAGAL dependem do tipo celular em questão, sendo as células de origem epitelial (HeLa) mais sensíveis que as células B16F10, as quais não sofreram efeitos tão drásticos quanto os verificados para as células HeLa. Vale mencionar que alguns polissacarídeos estudados quanto aos efeitos em células cultivadas causaram alterações morfológicas como as demonstradas para ARAGAL, ou seja, a condensação celular, a presença de vesículas contendo material acidófilo no citoplasma, ocorrência de “blebs” na superfície celular, agregação celular

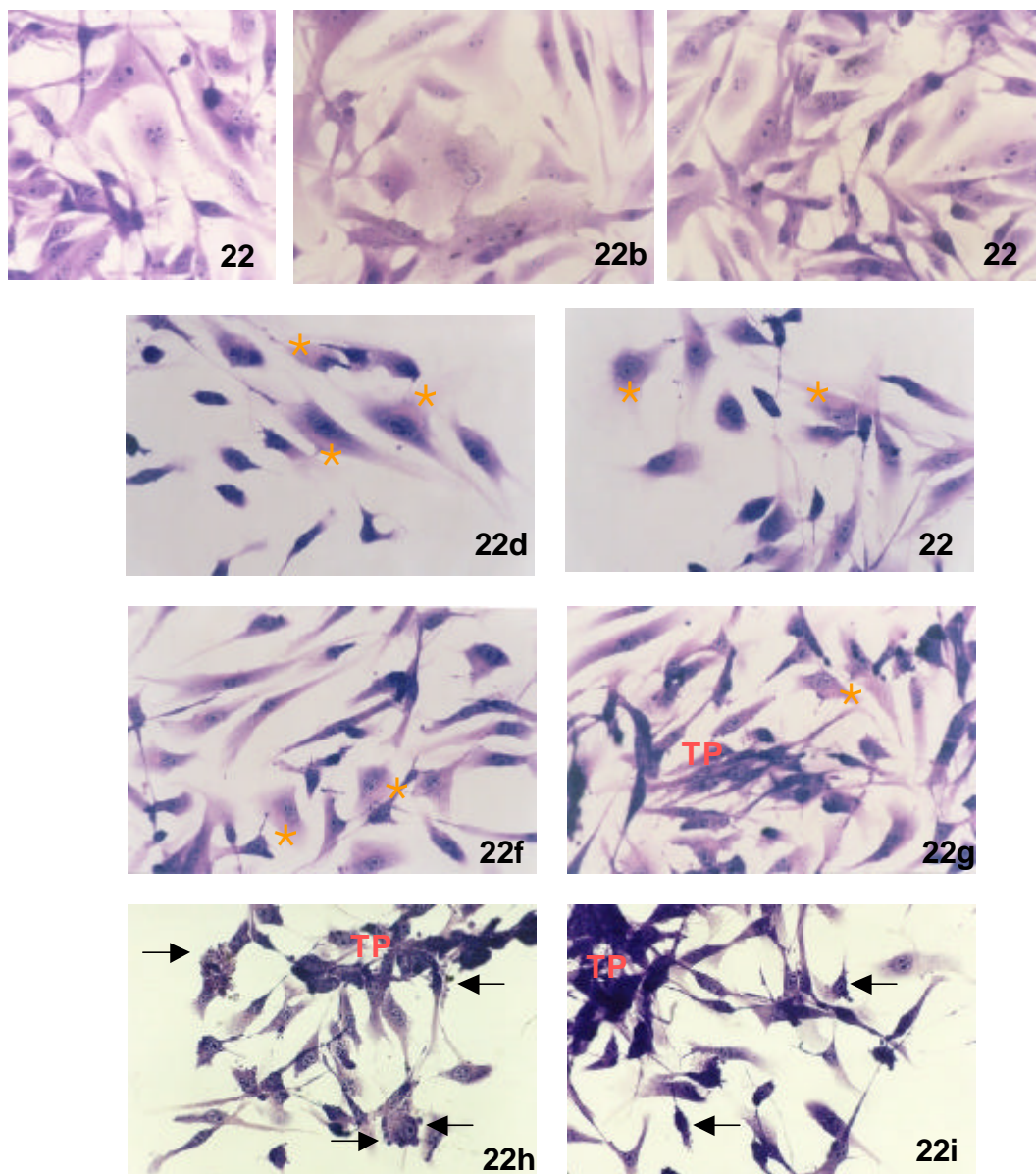
FIGURA 21: CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE CÉLULAS B16-F10 - MELANOSSOMOS.



Sistema: Células B16-F10 foram incubadas em meio de crescimento (MC) em placas contendo lamínulas de vidro durante 72 horas em estufa com 5% CO<sub>2</sub>. Aos tempos determinados as lamínulas foram processadas para microscopia óptica. Coloração Prata Amoniaca; N=: núcleo; M= melanosomos; MP= melanosomos perinucleares; MG= melanosomos gigantes; mpe: melanosomos periféricos; setas: expansões celulares longas.

⇒ Micrografias a - d (células com volume aumentado): 400X; Micrografias e - h: 1000X.

FIGURA 22: EFEITO *IN VITRO* DE ARAGAL NA MORFOLOGIA DE DE CÉLULAS B16-F10.

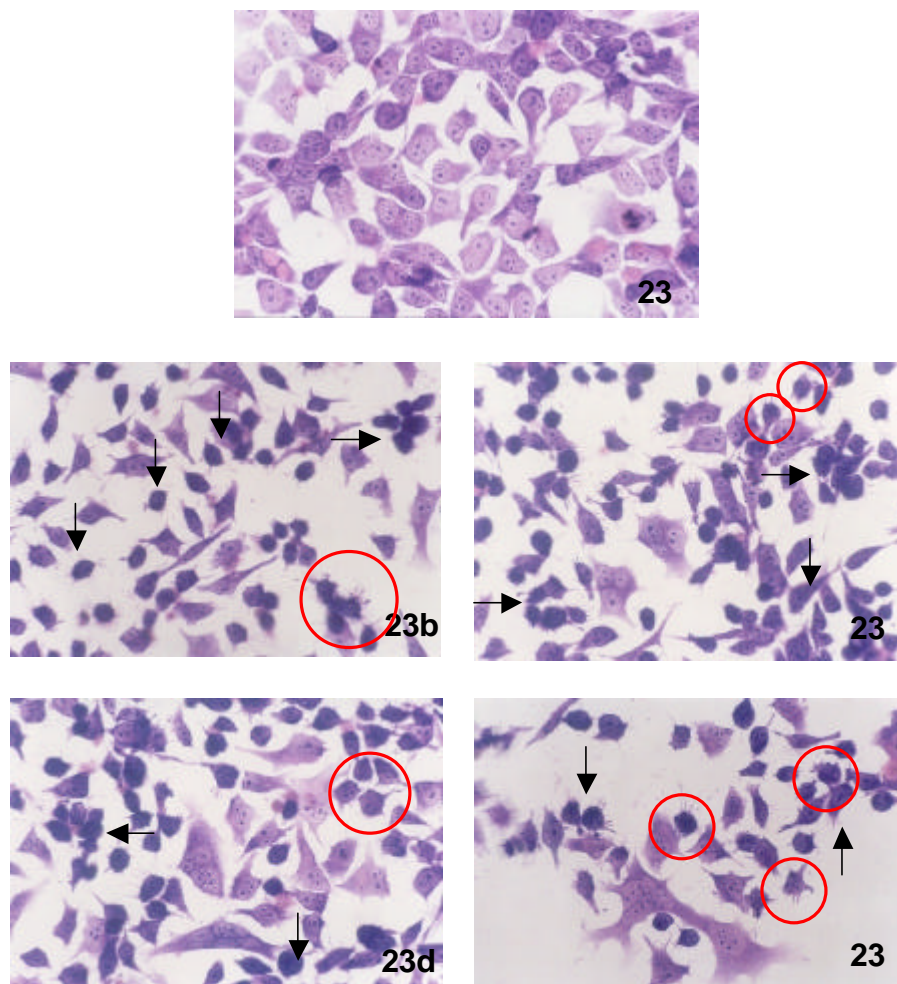


Sistema: Células B16-F10 foram incubadas em meio de crescimento (MC) em placas contendo lamínulas de vidro na presença de 10 a 300  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de ARAGAL. Após 72 horas as lamínulas foram processadas para microscopia óptica. Coloração Giemsa; **TPM**: trama de projeções citoplasmáticas; setas: expansões globosas (*blebs*); **\***: regiões eosinofílicas. (400X).

a) controle; b) 25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de ARAGAL; c) 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de ARAGAL; d,e) 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de ARAGAL; f,g) 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de ARAGAL; h,i) 300  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de ARAGAL



FIGURA 23: EFEITO *IN VITRO* DE ARAGAL NA MORFOLOGIA DE DE CÉLULAS HeLa.



Sistema: Células HeLa foram incubadas em meio de crescimento (MC) em placas contendo lamínulas de vidro na presença de 10 a 300  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de ARAGAL. Após 72 horas as lamínulas foram processadas para microscopia óptica. Coloração Giemsa; setas: células condensadas; círculo vermelho: células com expansões globosas (*blebs*); (400X). As micrografias desta figura são representativas.

a) controle; b) 25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de ARAGAL; c) 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de ARAGAL; d) 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de ARAGAL; e) 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de ARAGAL

diminuição do número de células aderidas (STEVAN et al., 2001). Além disso, várias alterações morfológicas foram descritas para células HeLa tratadas com a  $\alpha$ -D-glucana do líquen *Ramalina celastri*. Foram encontradas células com vacúolos citoplasmáticos contendo material acidófilo, acúmulo de material filamentosos, presença de grânulos eletrondensos dispersos no citoplasma e o aparecimento “blebs”, sugerindo sofrimento celular. Além dessas características, foram encontradas células com aparência fusiforme, condensação e fragmentação celular e a presença de agregados celulares, quando as células eram expostas ao derivado sulfatado desta molécula (CARNEIRO-LEÃO et al., 1997).

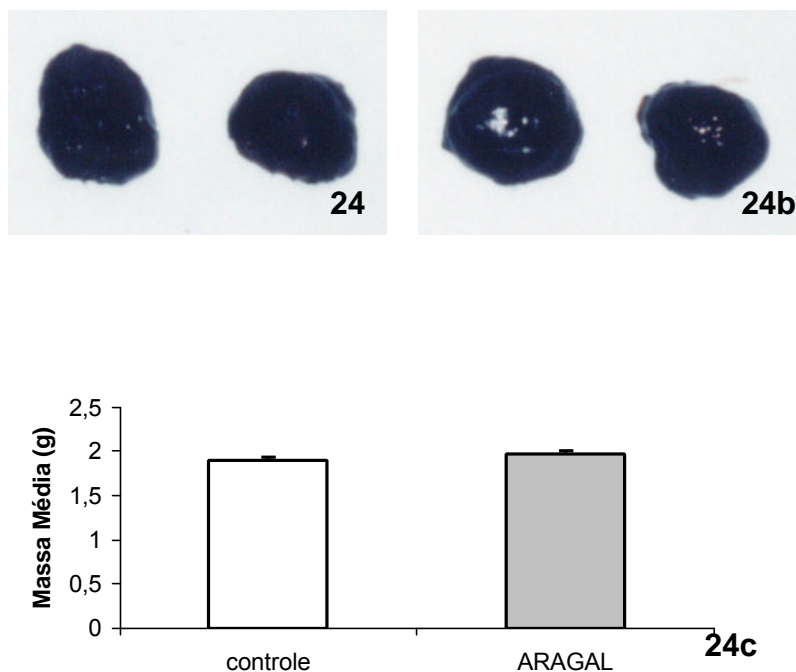
### **6.3.3. Atividade antitumoral de ARAGAL frente ao melanoma B16-F10 *in vivo*.**

Com a finalidade de avaliar se ARAGAL, a exemplo do efeito causado em S-180, poderia influenciar no desenvolvimento do Melanoma B16-F10, camundongos C57-BL6 foram inoculados subcutaneamente com células B16-F10 e após 24 h tratados i.p. com ARAGAL. Após 17 dias, os tumores foram avaliados.

Na figura 24 estão relacionadas as massas médias dos tumores retirados dos animais dos grupos tratados com a dose única de  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$  de ARAGAL, e dos animais do grupo controle. Como pode ser observado, não houve diferença entre a massa média dos tumores do grupo controle e do grupo tratado com ARAGAL, em nenhum dos dois tratamentos, ou seja, o polissacarídeo em estudo, para o tumor sólido de células B16-F10, não apresentou atividade antitumoral.

Outro fator importante relacionado ao resultado encontrado para ARAGAL em relação as células B16-F10 é que uma das características desta linhagem celular é a formação de metástases para vários órgãos, e que no estabelecimento de

FIGURA 24: EFEITO DE ARAGAL SOBRE A MASSA MÉDIA DOS TUMORES SÓLIDOS DE MELANOMA B16-F10



Sistema: Células B16-F10 foram inoculadas subcutaneamente em camundongos C57-BL6 (n=10 para cada grupo) Após 24 h da implantação das células tumorais, os animais do grupo controle foram inoculados (i.p.) com PBS estéril, e os animais do grupo tratado com ARAGAL foram inoculados (i.p.) com 100 mg.kg<sup>-1</sup> (n=10). No 17º dia após a implantação das células, os animais foram sacrificados os tumores dissecados e pesados para avaliação da massa tumoral e da taxa de inibição de crescimento tumoral, calculada segundo a fórmula descrita em materiais e métodos. Os valores representam a média ± EPM. \* Diferença significativa do controle; p ≤ 0,05.

24a) Tumores representativos dos animais do grupo controle

24b) Tumores representativos dos animais do grupo tratado com ARAGAL

24c) Massa média dos tumores



metástases para um determinado órgão, entre outros fatores, está a interação entre lectinas da célula invasora e do órgão invadido. O processo de reconhecimento mediado por lectinas é altamente específico. Por exemplo, o receptor para  $\beta$ -D-galactose reconhece, além do monossacarídeo, oligossacarídeos com unidades terminais de  $\beta$ -D-galactose, os quais são restritos a certas galactanas ou glicoconjugados contendo galactose (UHLENBRUCK et al., 1985). Tem sido proposto que arabinogalactanas poderiam inibir o processo metastático para o fígado, mas não para os pulmões, devido ao bloqueio de tais receptores nos hepatócitos (BEUTH et al., 1987). A ausência de efeitos sobre a forma sólida do tumor de B16-F10 não excluía a possibilidade de efeito antimetastático, visto que alguns estudos com arabinogalactanas têm mostrado que esses polissacarídeos podem bloquear o estabelecimento de metástases em órgãos específicos (D'ADAMO, 1996). Com finalidade de avaliar um eventual efeito inibidor do processo metastático exercido por ARAGAL, camundongos C57BL6 foram inoculados i.p. com  $5 \times 10^5$  células B16-F10 e após 24 h tratados com  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$  de ARAGAL pela mesma via de inoculação das células tumorais. Após 21 dias, os animais foram sacrificados por asfixia com éter e os órgãos da cavidade peritoneal foram retirados e processados para microscopia óptica como descrito em Materiais e Métodos. Os resultados encontrados após a análise dos órgãos mostraram que este polímero também não exerceu qualquer efeito sobre a atividade metastática. A figura 25 mostra os resultados da análise histológica de órgãos de animais inoculados i.p. com células B16-F10 e tratados i.p. com ARAGAL. Foram retirados o coração, pulmão, baço, rim e fígado, dos animais de cada um dos grupos experimentais, e a análise histológica foi feita com a coloração de prata amoniacal, a qual permitiu a

identificação e localização das células B16-F10. Na figura 25 estão mostrados cortes histológicos representativos dos órgãos de animais do grupo controle e tratado com ARAGAL, e, como pode ser observado, não houve diferença no aspecto geral dos órgão nem mesmo na presença ou não de massas tumorais aderidas aos órgãos analisados. A coloração de prata amoniacal permitiu a clara visualização das massas tumorais de melanoma aderidas ao baço (figuras 25 a, b) e ao rim (figuras 25 c, d). Na figura 25 g a seta indica um melanócito dentro de um capilar que se localiza entre o rim e o tecido adiposo. Nas figuras 25 e e 25 f os cortes histológicos de pulmão mostram melanócitos no parênquima pulmonar.

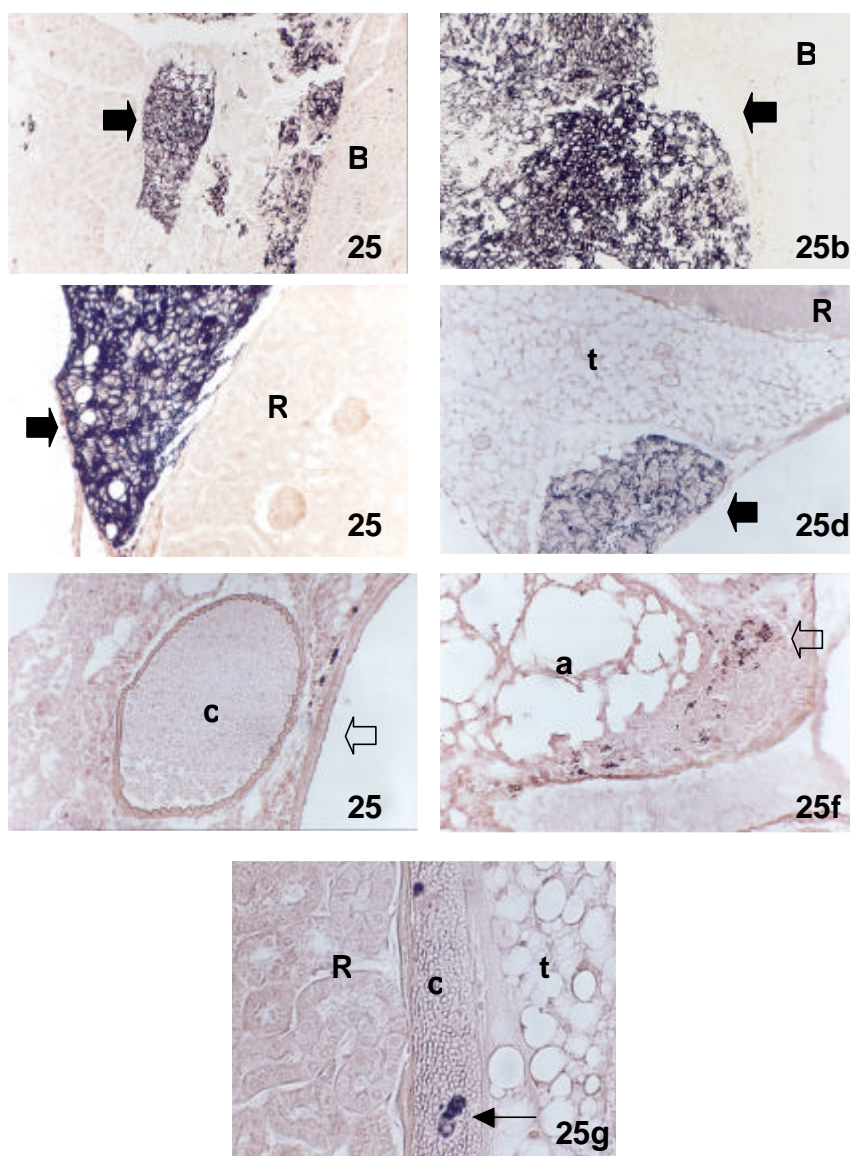
HAGMAR et al. (1991) mostrou que o tratamento com uma arabinogalactana reduziu a quantidade de metástases no fígado e prolongou o tempo de sobrevivência de animais, sendo que o tratamento do hospedeiro se mostrou mais efetivo que o pré-tratamento das células tumorais. Este resultado foi explicado pelos autores pelo efeito bloqueador exercido pela arabinogalactana em receptores específicos para galactose, impedindo a instalação da célula tumoral. Em outro estudo, verificou-se que a pré-injeção e a aplicação regular (3 dias após a inoculação das células tumorais) de agentes capazes de bloquear receptores para galactose, como a D-galactose e arabinogalactana, evitou que células do Sarcoma L-1 se estabelecessem no fígado, porém não influenciou seu estabelecimento nos pulmões (BEUTH et al., 1987). Nas condições experimentais utilizadas no presente trabalho, ARAGAL não apresentou nenhum efeito antimetastático, ao menos para células de melanoma B16-F10. Entretanto, vale mencionar que nos experimentos realizados por HAGMAR et al., (1991), as células tumorais foram injetadas diretamente na corrente sanguínea dos animais, e no caso de ARAGAL as condições experimentais

utilizadas foram diferentes, já que as células tumorais foram injetadas na cavidade peritoneal dos animais, ou seja, no mesmo local onde o tratamento com o polímero foi realizado, condição na qual há redução no crescimento das células do S-180. Os tumores encontrados nos animais tratados com ARAGAL estavam na sua maioria presentes aderidos aos órgãos, como pode ser verificado na figura 25, apesar de terem sido encontradas algumas células tumorais dentro de vasos sanguíneos.

Entretanto, a possibilidade de que ARAGAL, devido aos seus efeitos sobre macrófagos, levasse ao aumento da sobrevivência dos camundongos portadores de melanoma, não podia ser descartada. Nesta análise, onde os animais foram inoculados subcutaneamente com as células B16-F10, e após 24 horas tratados com  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$  de ARAGAL, foi possível observar que não houve diferença estatisticamente significativa entre o tempo de sobrevivência dos animais do grupo controle e os animais do grupo tratado com ARAGAL, como pode ser visualizado na figura 26. Nesta figura estão representados o número de animais vivos durante o tempo de experimento, que durou 26 dias, demonstrando a agressividade da linhagem tumoral de melanoma. Em um estudo realizado por HAN e colaboradores (1998), onde animais inoculados i.p. com células B16-F10 e tratados i.p. com  $30 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  de angelan, um polissacarídeo composto por arabinose, galactose e ácido galacturônico, tiveram sua taxa de sobrevivência avaliada. Os resultados mostraram que os animais que receberam o tratamento com o polissacarídeo tiveram uma taxa de sobrevivência maior que os animais não tratados. Entretanto, esses resultados não podem ser comparados aos encontrados com ARAGAL, pois os animais analisados quanto a sobrevivência eram portadores de tumor sólido de células B16-F10, e não ascítico, como os animais tratados com angelan. Desta

forma, o efeito de ARAGAL sobre células de melanoma B16-F10 é uma questão que necessita de estudos complementares, particularmente quanto a via de inoculação das células e do polissacarídeo.

FIGURA 25: EFEITO DE ARAGAL SOBRE OS ÓRGÃOS DE ANIMAIS PORTADORES DE TUMOR INTRAPERITONEAL DE CÉLULAS B16F10.

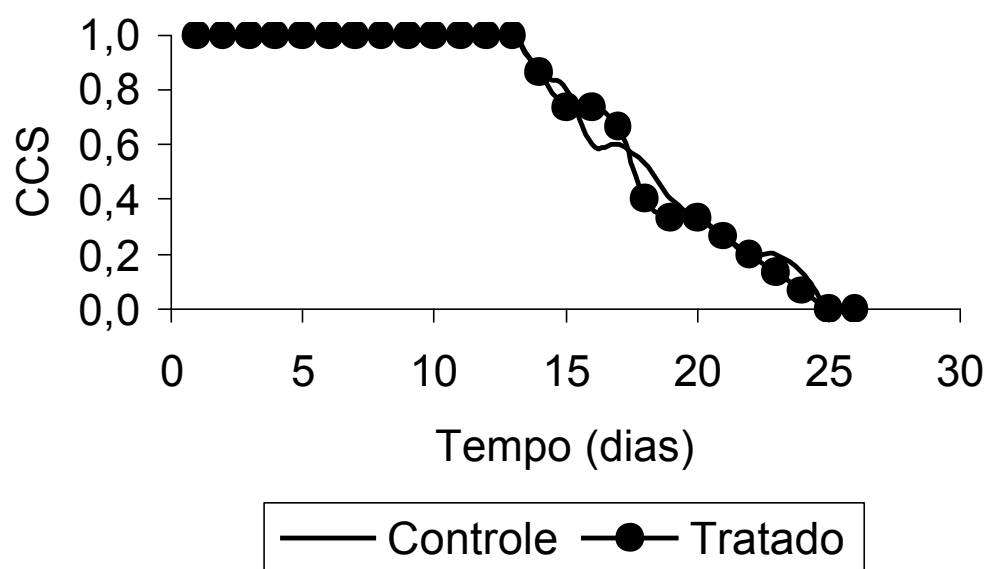


Sistema: Células B16-F10 foram inoculadas (i.p.) em camundongos C57-BL6 (n=10 para cada grupo) Após 24 h, os animais do grupo controle inoculados (i.p.) com PBS estéril, e os animais do grupo tratado com ARAGAL foram inoculados (i.p.) com  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$  de ARAGAL. 21 dias após a implantação das células os animais foram sacrificados para análise histológica dos órgãos. Setas fechadas= tumores aderidos aos órgãos; setas abertas= células tumorais dentro dos órgãos; seta fina: célula tumoral dentro de capilar; B= Baço; c= capilar; ap= alvéolos pulmonares; ta= tecido adiposo; R= Rim. (a,b,d: 100X) (c,e,f,g: 200X). As micrografias desta figura são representativas.

a,c,e,g) grupo controle

b,d,f) ARAGAL  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$

FIGURA 26: EFEITO DE ARAGAL SOBRE A SOBREVIVÊNCIA DE ANIMAIS PORTADORES DE TUMOR SÓLIDO DE CÉLULAS B16-F10.



Sistema: Camundongos (n=15 para cada grupo) foram inoculados subcutaneamente com células B16-F10 em 200  $\mu\text{L}$ . Após 24 h da implantação das células tumorais, os animais do grupo controle foram inoculados (i.p.) com PBS estéril, e os animais do grupo tratado foram inoculados (i.p.) com 100  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  de ARAGAL. Após o tratamento o número de animais vivos foi acompanhado até que último dos animais viesse a morrer. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste Z. CCS: chance cumulativa de sobreviver.

## 7. DISCUSSÃO FINAL

Neste trabalho foram utilizados modelos murinos para o estudo das propriedades de uma arabinogalactana (ARAGAL). Foram utilizados os camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) que permitem o crescimento das células do S-180, sendo avaliadas também as ações de ARAGAL sobre os macrófagos e os camundongos transgênicos C57BL6, que permitem o crescimento da linhagem de melanoma B16-F10.

Os resultados apresentados neste trabalho demonstraram que ARAGAL, uma arabinogalactana estruturalmente complexa isolada do exudato de *Anadenanthera colubrina*, pode ser classificado como uma MRB, que desencadeia o processo de ativação de macrófagos. As observações experimentais que permitem tal afirmação são: ativação de macrófagos após tratamento *in vitro* e *in vivo*, como demonstrado pelas características morfológicas de células ativadas encontradas na grande maioria das células após o tratamento, recrutamento de macrófagos para a cavidade peritoneal quando injetado i.p., aumento da capacidade fagocítica *in vitro* frente a leveduras e células do S-180, aumento da produção de  $O_2^-$  e do TNF- $\alpha$ , atividade antitumoral *in vivo* contra o S-180 nas formas ascítica e sólida além de discreta diminuição da proliferação *in vitro* de células de melanoma B16-F10.

ARAGAL não exerceu efeito na produção de  $NO^*$  mesmo na presença de IFN- $\gamma$ , apresentando assim, uma atividade diversa do LPS. Em relação a esta questão, embora este trabalho seja de natureza mais fenomenológica do que mecanística, algumas especulações poderiam ser feitas. O efeito de ARAGAL difere fundamentalmente do causado pelo LPS e pela peptidoglicana (PG), os quais estimulam a produção de  $NO^*$  (CUNHA, et al., 1993; MACMICKING et al., 1997).

Isso indicaria uma clara diferença entre a transdução de sinal induzida por ARAGAL e aquela induzida por LPS, incluindo os efeitos relacionados com a proteína quinase ativadora de mitose (MAPK), a proteína quinase ativadora de estresse (SAPK) e da quinase c Junc NH<sub>2</sub> terminal (JNK), todas as quais são fortemente ativadas por LPS (DZIARSKI et al., 1996). Os resultados aqui apresentados também parecem excluir as interações de ARAGAL com a proteína ligante de LPS, e pelo menos em parte com CD14, os quais estão envolvidos nos efeitos do LPS em macrófagos (WRIGHT et al., 1990; HAILMAN et al., 1994; MANCEK et al., 2002). Isto poderia ser esperado, pois ARAGAL é um polímero fortemente hidrofílico, enquanto que o LPS tem uma cadeia lipídica que é reconhecida pela proteína ligante de LPS e CD14 (HAILMAN et al., 1994). Esta cadeia lipídica, juntamente com a região negativamente carregada, confere um padrão anfipático ao LPS, permitindo uma interação com MD-2, um fragmento peptídico de uma proteína acessória do receptor Toll (MANCEK et al., 2002). Contudo, um modelo multimérico tem sido proposto para o receptor CD14 (ULEVICH & TOBIAS, 1995), portanto a possibilidade de interação de ARAGAL com um outro domínio envolvido na ligação do LPS não pode ser descartada.

O aumento da produção de TNF- $\alpha$  no fluido peritoneal de animais tratados com ARAGAL se mostrou um resultado importante, visto que esta citocina, quando liberada por macrófagos ativados, é capaz de promover a lise de células alvo, cujo reconhecimento envolve a ligação do TNF aos seus receptores que são conhecidos como receptores para TNF do tipo 1 e do tipo 2 (TNF-R1 e TNF-R2). Após a ligação do TNF com seu receptor, o complexo receptor-TNF é internalizado por endocitose mediada por receptor, o que leva a indução de múltiplas vias intercelulares (KLIMP, et al., 2002), como a via de produção de O<sub>2</sub><sup>-</sup> (GOOSSENS et al., 1995; OGURA et



al., 1997), assim como o rompimento de fitas de DNA (BALOCH et al., 1990), fatores que por último podem levar a morte celular (MONASTRA et al., 1996; SVEINBJORNSSON et al., 1997; van de LOOSDRECHT, et al., 1993). Importantes aspectos a respeito da produção de TNF- $\alpha$  são os seus efeitos colaterais drásticos, relacionados aos estados catabólicos, como caquexia, que ocorre quando esta citocina está presente em altos níveis (SOUBA, 1994). Entretanto, a produção de TNF- $\alpha$  induzida por ARAGAL é muito inferior àquela obtida pela inoculação dos animais com LPS e, além disso, a produção induzida por ARAGAL mostrou-se transitória, pois após 24 h de inoculação do polissacarídeo, o TNF- $\alpha$  não é mais detectado no fluido peritoneal dos animais. Portanto, ARAGAL é um indutor de TNF- $\alpha$  não tão forte como o LPS, um resultado interessante, já que a aplicação clínica do LPS como imunomodulador é difícil devido a sua toxicidade (KITAZAWA et al., 1996). ALLEVA et al. (1994) sugere que os tumores escapam da vigilância imunológica pela atividade de supressores de macrófagos, diminuindo a citotoxicidade induzida por macrófagos. É extensamente conhecido que TNF- $\alpha$  é citotóxico à células tumorais (LARRICK et al., 1990) e atrai monócitos para o sítio onde as células tumorais se localizam. Sendo assim, pode ser proposto que a regulação que estimula a produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos exercida por ARAGAL (baixos níveis, uma vez que o tratamento com ARAGAL não induz toxicidade) pode contribuir para reduzir a imunossupressão no portador tumor gerando efeitos antitumorais. Por esta razão, algumas citocinas, como TNF- $\alpha$ , têm sido usadas em propostas terapêuticas (DRANOFF et al., 2004). Neste trabalho, é de particular importância que TNF- $\alpha$  mostrou-se uma citocina potente na atividade antitumoral contra o S-180 (LU et al., 2001).

O TNF- $\alpha$  é conhecido por induzir a lise de células malignas e levar à regressão de alguns tumores em animais (CALLARD, 1990), e assim um possível mecanismo para os efeitos antitumorais descritos para polissacarídeos pode ser relacionado a indução desta citocina (TAKAHASHI et al., 1988; LUETTIG et al., 1989; MORI et al., 1989; USAMI et al., 1988; WONG et al., 1994). Portanto, a possibilidade de indução da produção de TNF- $\alpha$  por ARAGAL, a qual mostrou-se aumentada em 26 vezes em relação ao controle, é um importante resultado que pode estar relacionado com a atividade antitumoral apresentada por este polímero. ARAGAL induziu macrófagos a fagocitarem fragmentos de células do S-180 *in vitro*, como mostrado pelas estruturas de células do S-180 encontradas dentro de vacúolos citoplasmáticos de macrófagos ativados por ARAGAL. O efeito antitumoral de ARAGAL foi também detectado *in vivo*, quando animais portadores de S-180, tanto na forma ascítica quanto na forma sólida, apresentaram inibição do crescimento dos tumores; além de um discreto efeito sobre a proliferação de células B16-F10, e da indicação de sofrimento celular nestas células tumorais e em células HeLa cultivadas na presença do polímero por até 72 horas.

Estabelecer uma relação entre a estrutura química e a atividade biológica de ARAGAL em relação a outros polímeros é uma tarefa difícil porque os polissacarídeos variam amplamente quanto a sua composição e conformação. Algumas evidências sugerem que a atividade antitumoral de polissacarídeos depende de sua massa molar (DING et al., 1999). Neste aspecto, frações com alta massa molar (100.000 – 200.000 g.mol<sup>-1</sup>) têm mostrado ativas, enquanto frações de mesma origem, com menor massa molar (5.000 – 10.000 g.mol<sup>-1</sup>) não têm mostrado atividade (KOJIMA et al., 1986; BLASCHECK et al., 1992). A ligação  $\beta(1\rightarrow3)$  parece

ser importante para a expressão da atividade anti-S-180 de  $\beta$ -D-glucanas (BOHN & BeMILLER, 1995), enquanto a presença de ligações  $\beta$ -glicosídicas, além do caráter aniônico, foi também relacionada com a atividade biológica de alginato de *Sargassum fulvellum* (FUJIHARA et al., 1984). Alta massa molar e presença de ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) são atributos presentes em ARAGAL, cuja cadeia principal é constituída por unidades de  $\beta$ -Galp em ligação (1 $\rightarrow$ 3). Porém, segundo DELGOBO et al. (1998), a cadeia principal representa pouco do polissacarídeo, que é muito ramificado. Por sua vez, a presença de ramificações parece atribuir propriedades biológicas a polímeros de baixa massa molecular.

Como descrito por DELGOBO et al. (1998), e representado na figura 1, o polissacarídeo ARAGAL apresenta-se ramificado por unidades de galactobiosídeos 3,6-di-O substituídos e por oligossacarídeos de 3, 5 ou 7 unidades, onde  $\alpha$ -L-Araf e cadeias de arabinose com diferentes conformações substituem a galactose em C6 ou C3. Essa complexidade estrutural deve influenciar a conformação final do polímero e, portanto, dificulta a comparação com outros polissacarídeos conhecidos por seus efeitos antitumorais e imunomoduladores. Considerando que a goma de Angico branco possui oligossacarídeos livres, os quais mostrou-se serem fragmentos estruturais desta arabinogalactana (DELGOBO et al., 1998), sua utilização em experimentos de atividade biológica poderia fornecer importantes informações quanto aos requisitos estruturais que conferem a ARAGAL a capacidade biomoduladora em macrófagos. Embora esta seja uma atrativa hipótese de trabalho, a relação existente entre a massa molar e a atividade biomoduladora, destada por alguns autores (BOHN & BeMILLER, 1995) poderia representar um fator limitante em tais estudos, pois os oligossacarídeos podem não atingir a massa molar

necessária para a manifestação do efeito. Estes estudos, bem como aqueles onde fossem determinados os efeitos de ARAGAL como coadjuvante de quimioterápicos convencionais seriam necessários a fim de que o real potencial de ARAGAL como imunomodulador possa ser alcançado.

Apesar de não ter sido esclarecido o mecanismo pelo qual ARAGAL exerce seus efeitos, esta arabinogalactana estruturalmente complexa e extraída do exudato de *Anadenanthera colubrina*, atua sobre o sistema imune, elicitando e desencadeando o processo de ativação de macrófagos. Estas células de defesa tornam-se morfológica e funcionalmente ativadas, como demonstrado pelas características morfológicas, pelo estímulo da atividade fagocítica, da produção de  $O_2^-$  e do TNF- $\alpha$  como também pela atividade antitumoral contra o S-180. Sendo assim, os resultados encontrados neste trabalho sugerem fortemente que este polímero pode ser classificado como MRB.

## 8. CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho permitem concluir que:

- 1) ARAGAL promove a ativação de macrófagos peritoneais de camundongos tanto *in vitro* quanto *in vivo* de acordo com os seguintes critérios:
  - a) características morfológicas de células ativadas;
  - b) aumento da porcentagem de células ativadas de forma dose e tempo-dependente;
  - c) atividade elicitora de células para a cavidade peritoneal;
  - d) atividade fagocítica;
  - e) produção de ânion superóxido;
  - f) produção de TNF- $\alpha$  e;
  - g) atividade citotóxica contra células do S-180.
  
- 2) ARAGAL não apresenta efeito citotóxico direto sobre o S-180 sugerindo que a atividade antitumoral observada contra as formas sólida e ascítica, resulta do estímulo das células do sistema imune.
  
- 3) ARAGAL apresenta discreto efeito antiproliferativo sobre células B16-F10, e nenhum efeito sobre o desenvolvimento *in vivo* dessas células foi observado.
  
- 4) A presença de ARAGAL no crescimento *in vitro* de células HeLa promove alterações sugestivas de intenso sofrimento celular, sugerindo que células de

diferentes tipos e linhagens apresentam padrões de resposta diferentes quanto ao polissacarídeo.

5) ARAGAL não apresenta toxicidade *in vivo* aos animais tratados.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. Immunologia celular e molecular. 3 ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2000. 468p.

ABEL, G.; CZOP, J.K. Stimulation of human monocyte  $\beta$ -glucan receptors by glucan particles induces production of TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . **Int. J. Immunopharmacol.**, Kidlington, v. 14, p. 1363-1373, 1992.

ADACHI, Y.; OHNO, N.; YODAMAE, T. Inhibitory effect of  $\beta$ -glucans on zymosan-mediated hydrogen peroxide production by murine peritoneal macrophages *in vitro*. **Biol. Pharm. Bull.**, Tokyo, v. 16, n. 5, p. 462-467, 1993.

ADAMS, D.O. Macrophages. **Methods Enzymol.**, San Diego, v. 58, p. 494-506, 1979.

ALLEVA, J.; BURGER, C.J.; ELGER, T.K.D. Tumor induced regulation of suppressor macrophage nitric oxide and TNF- $\alpha$  production. **J. Immunol.**, Bethesda, v. 153, p. 1674-1686, 1994.

ARINAGA, S.; KARIMINE, N.; TAKAMUKU, K.; NANBARA, S.; NAGAMATSU, M.; UEO, H.; AKIYOSHI, T. Enhanced production of interleukin 1 and tumor necrosis factor by peripheral monocytes after lentinan administration in patients with gastric carcinoma. **Int. J. Immunopharmacol.**, Kidlington, v. 14, p. 43-47, 1992.

BABIOR, M.B. The respiratory burst oxidase. **Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.**, New York, v. 65, p. 49-95, 1992.

BADWEY, J.A. & KARNOVSKI, M.L. Active oxygen species and the functions of phagocytic leukocytes. **Annu. Rev. Biochem.**, Palo Alto, v. 49, p. 695-726, 1980.

BALKWILL, F. et al. Evidence for tumor necrosis factor/cachectin production in cancer. **The Lancet**, New York, v. 330, p. 1229-1232, 1987.

BALOCH, Z.; COHEN, S.; COFFMAN, F.D. Synergistic interactions between tumor necrosis factor and inhibitors of DNA topoisomerase I and II. **J. Immunol.**, Bethesda, v. 145, n. 9, p. 2908-2913, 1990.

BASTOS, M.T.; OLIVEIRA, M.B.M.; CAMPELLO, A.P.; KLUPPEL, M.L. Methotrexate: studies on cellular metabolism. IV. Effect on the mitochondrial oxidation of cytosolic-reducing equivalents in HeLa cells. **Cell. Biochem. Funct.**, Chichester, v. 8, n. 4, p. 199-203, 1990.

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

BEUTH, J.; KO, H.L.; OETTE, K.; PULVERER, G.; ROSZKOWSKI, K.; UHLENBRUCK, G. Inhibition of liver metastasis in mice by blocking hepatocyte lectins with arabinogalactan infusion and D-galactose. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, Berlin, v. 113, p. 51-55, 1987.

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

BLASCHEK, W.; KÄSBAUER, J.; KRAUS, J.; FRANZ, G. *Pythium aphanidermatum*: culture, cell wall composition, isolation and structure of antitumor storage and solubilised cell-wall (1→3), (1→6)-β-D-glucans. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 231, p. 293-307, 1992.

BOHN, J.A.; Be MILLER, J.N. 1→3 β-D-glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. **Carbohydr. Polymers**, England, v. 28, p. 3-14, 1995.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, Orlando, v. 72, p. 248-254, 1976.

BREDDT, D.S. & SNYDER, S.H. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v. 87, p. 682-685, 1990.

BROCKHAUS, M.; SCHOENFELD, H.J.; SCHLAEGER, E.J.; HUNZIKER, W.; LESSLAUER, W.; LOETSCHER, H. Identification of two types of tumor necrosis factor receptors on human cell lines by monoclonal antibodies. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v. 87, n. 8, p. 3127-3131, 1990.



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

BURGALETA, C.; TERRITO, M.; QUAN, S.G.GOLDE, D.W. Glucan activated macrophages: functional characteristics and surface morphology. **J. Reticuloendothel. Soc.**, New York, v. 23, p. 195-204, 1978.

CALLARD, R.E. Cytokines and B Lymphocytes 1990, Academic Press, London.

CARNEIRO-LEÃO, A.M.A.; BUCHI, D.F.; IACOMINI, M.; GORIN, P.A.J.; OLIVEIRA, M.B.M. Cytotoxic effect against HeLa cells of polysaccharide from the lichen *Ramalina celastri*. **J. Sub. Cytol. Pathol.**, Siena, v. 24, n. 4, p. 1-5, 1997.

CARSWELL, E.A.; OLD, L.J.; KASSEL, R.L.; GREEN, S.; FIORE, N.; WILLIAMSON, B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v. 72, p. 3666-3670, 1975.

CAVAILLON, J.M. Cytokines and macrophages. **Biomed. Pharmacother.**, Paris, v. 48, p. 445-453, 1994.

CHEN, Y.-J.; SHIAO, M.; LEE, S.-S.; WANG, S.-Y. Effect of *Cordyceps sinensis* on the proliferation and differentiation of human leukemic U937 cells. **Life Sci.**, New York, v. 60, n. 25, p. 2349-2359, 1997a.

CHEN, R.H.; CHANG, J.R.; SHYUR, J.S. effects of ultrasonic conditions and storage in acidic solutions on changes in molecular weight and polydispersity of treated chitosan. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 229, n. 4, p. 287-294, 1997b.

CHIHARA, G.; MAEDA, Y.; HAMURO, J.; SASAKI, T.; FUKUOKA, F. Inhibition of mouse sarcoma 180 by polysaccharide from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. **Nature**, London, v. 222, p. 687-688, 1969.

CHIHARA, G.; HAMURO, J.; MAEDA, Y.Y.; ARAI, Y.; FUKUOKA, F. Fraction and purification of the polysaccharide with marked anti-tumor activity, especially Lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk) Sing. (an edible mushroom). **Cancer Res.**, Amsterdam, v. 30, p.2776-2781, 1970.

CHINTALWAR, G.; JAIN, A.; SIPAHIMALANI, A.; BANERJI, A.; SUMARIWALLA, P.; RAMAKRISHNAN, R.; SAINIS, K. Na immunologically active arabinogalactan from *Tinospora cordifolia*. **Phytochemistry**, Kidlington, v. 52, p. 1089-1093, 1999.

CLEARY, J.A.; KELLY, G.E.; HUSBAND A.J. The effect of molar weight and beta-1,6-linkages on priming of macrophages function in mice by (1,3)-beta-D-glucan. **Immunol. Cell. Biol.**, Carlton South, v. 77, p. 395-403, 1999.

COFFMAN, F.D.; GREEN, L.M.; WARE, C.F. The relationship of receptor occupancy to the kinetics of cell death mediated by tumor necrosis factor. **Lymphokine Cytokine Res.**, New York, v. 7, p. 371-383, 1988.

COHEN, S.M.; RYAN, L.R.; ROOT, K.P. The oxidative metabolism of thioglycollate-elicited mouse peritoneal macrophages: the relationship between oxygen, superoxide and hydrogen peroxide and the effect on monolayer formation. **J. Immunol.**, Bethesda, v. 127, n.3, p. 1007-1011, 1981.

COHN, Z.A. The activation of mononuclear phagocytes: fact, fancy and future. **J. Immunol.**, Bethesda, v. 121, n. 3, p. 813-816, 1978.

COMPTON, S.J.; JONES, C.G. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. **Anal. Biochem.**, Orlando, v. 151, p. 369-374, 1985.

COOK, M.T.; HAYBALL, P.J.; HUTCHINSON, W.; NOWAK, B.; HAYBALL, J.D. The efficacy of a commercial  $\beta$ -glucan preparation, EcoActiva™, on stimulating respiratory burst activity of head-kidney macrophages from pink snapper (*Pagrus auratus*), Sparidae. **Fish Shellfish Immunol.**, London, v.11, p. 661-672, 2001.

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

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

CUNHA, F.Q.; ASSREUY, J.; MONCADA, S.; LIEW, F.Y. Phagocytosis and induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. **Immunology**, Oxford, v. 79, p. 408-411, 1993.

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

D'ADAMO, P. Larch arabinogalactan is a novel immune modulator. **J. Naturopath. Med.**, v. 4, p. 32-39, 1996.

DAEMEN, T.; VENINGA, A.; ROERDINK, F.H.; SCHERPHOF, G.L. Conditions controlling tumor cytotoxicity of rat liver macrophages mediated by liposomal muramyl dipeptide. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 991, n.1, p. 145-151, 1989.

DECKER, T.; LOHMANN MATTHES, M.L.; GIFFORD, G.E. Cell-associated tumor necrosis factors (TNF) as a killing mechanism of activated cytotoxic macrophages. **J. Immunol.**, Bethesda, v. 138, n. 2, p. 957-962, 1987.

DELGOBO, C.L. Polissacarídeo e oligossacrídeos presentes no exudato de *Anadenanthera colubrina* (ANGICO BRANCO). Curitiba, 1999. Tese de Doutorado em Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

DELGOBO, C.L.; GORIN, P.A.J.; JONES, C.; IACOMINI, M. Gum heteropolysaccharide and free reducing mono- and oligosaccharide of *Anadenanthera colubrina*. **Phytochemistry**, Kidlington, v. 47, n. 7, p. 1207-1214, 1998.

DEUK, H.M.; SOOK, L.E.; KWEON, K.Y.; WOO, L.J.; HOON, J.; HÁ, Y.K. Production of nitric oxide in raw 264.7 macrophages treated with ganoderan, the beta-glucan of *Gonoderma lucidum*. **Korean J. Mycol.**, Seoul, v. 26, n. 2, p. 246-255, 1998.

DiLUZIO, N.R. Update on the immunomodulating activities of glucans. **Springer Semin. Immunopathol.**, Berlin, v. 8, p. 384-400, 1999.

DING, A.H.; NATHAN, C.F.; STUEHR, D.J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. **J. Immunol.**, Bethesda, v. 141, n. 7, p. 2407-2412, 1999.

DRANOFF, G. Cytokines in cancer pathogenesis and therapy. **Nat. Rev. Cancer**, London, v. 4, n. 1, p. 11-22, 2004

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

DZIARSKI, R.; JIN, Y.P.; GUPTA, D. Differential activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1, ERK2, p38 and c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase mitogen-activated protein kinases by bacterial peptidoglycan. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 174 p. 777-785, 1996.

EGERT, D.; BEUSCHER, N. Studies on antigen specificity of immunoreactive arabinogalactan proteins extracted from *Baptisia tinctoria* and *Echinacea purpurea*. **Planta Med.**, Ayr, v. 58, p. 163-165, 1991.

ELNEMR, A. et al. N-ethylmaleimide-enhanced phosphatidylserine externalization of human pancreatic cancer cells and immediate phosphatidylserine-mediated phagocytosis by macrophages. **Int. J. Oncol.**, Athens, v. 16, n. 6, p. 1111-1116, 2000.

FADOK, V.A.; LASZLO, D.J.; NOBLE, P.W.; WEINSTEIN, L.; RICHES, D.W.H.; HENSON, P.M. Particle digestibility is required for induction of the phosphatidylserine recognition mechanism used by murine macrophages to phagocytose apoptotic cells. **J. Immunol.**, Bethesda, v. 151, n. 8, p. 4274-4285, 1993.

FOUQUERAY, B.; PHILIPPE, C.; AMRANI, A.; PEREZ, J.; BAUD, L. Heat shock prevents lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- $\alpha$  synthesis by rat mononuclear phagocytes. **Eur. J. Immunol.**, Weinheim, v. 22, p. 2983-2987, 1992.

FUJIHARA, M.; IIZIMA, N.; YAMAMOTO, I.; NAGUMO, T. Purification and chemical and physical characterization of an antitumoral polysaccharide from the brown seaweed *Sargassum fulvellum*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 125, p. 97-106, 1984.

GAILLARD, T.; MULSCH, A.; KLEIN, H.; DECKER, K. Regulation by prostaglandin E<sub>2</sub> of cytokine-elicited nitric oxide synthesis in rat liver macrophages. **Biol. Chem. Hoppe-Seyler**, Berlin, v. 373, p. 897-902, 1992.

GILCHREST, B.A.; PARK, H.-Y.; ELLER, M.S.; YAAR, M. Mechanisms of ultraviolet light-induced pigmentation. **Photochem. Photobiol.**, Augusta, v. 63, p. 1-10, 1996.

GOEL, V.; CHANG, C.; SLAMA, J.V.; BARTON, R.; BAUER, R.; GAHLER, R.; BASU, T.K. Echinacea stimulates macrophage function in the lung and spleen of normal rats. **J. Nutr. Biochem.**, New York, v. 13, p. 487-492, 2002.

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

GOMAA, K.; KRAUS, J.; ROBKOPF, F.; RÖPER, H.; FRANZ, G. Antitumor and immunological activity of a  $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3/1 $\rightarrow$ 6 glucan from *Glomerella cingulata*. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, Berlin, v. 118, p. 136-140, 1992.

GONDA, R.; TOMODA, M.; OHARA, N.; TAKADA, K. Arabinogalactan core structure and immunological activities of ukonan C, an acidic polysaccharide from the rhizome of *Curcuma longa*. **Biol. Pharm. Bull.**, Tokyo, v. 16, n. 3, p. 235-238, 1993.

GOOSSENS, V.; GROOTEN, J.; De VOS, K.; FIERS, W. Direct evidence for tumor necrosis factor-induced mitochondrial reactive oxygen intermediates and their involvement in cytotoxicity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington v. 92, n. 18, p. 8115-8119, 1995.

GORDON, S. The macrophage home page. 1996 Disponível em <http://www.path.ox.ac.uk/sg/>> Acesso em 14 abr. 1999.

GREEN, J.S.; CRAWFORD, R.M.; HOCKMEYER, J.T.; MELTZER, M.S.; NACY, C.A. *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN- $\gamma$ -stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor- $\gamma$ . **J. Immunol.**, Bethesda, v. 145, n. 12, p. 4290-4297, 1990.

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

GROMAN, E.V.; ENRIQUEZ, P.M.; JUNG, C.; JOSEPHSON, L. Arabinogalactan for hepatic drug delivery. **Bioconjug. Chem.**, Washington, v. 5, n. 6, p. 547-556, 1994.

HAGMAR, B.; RYD, W.; SKOMEDAL, H. Arabinogalactan blockade of experimental metastases to liver by murine hepatoma. **Invasion Metastasis**, Basel, v. 11, n. 6, p. 348-355, 1991.

HAILMAN, E.; LICHENTEIN, H.S.; WURFEL, M.M.; MILLER, D.S.; JOHNSON, D.A. ; KELLEY, M.; BUSSE, L.A.; ZUKOWSKI, M.M.; WRIGHT, S.D. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. **J. Exp. Med.**, New York, v. 179, p. 269-277, 1994.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals reactive species and toxicology. In: Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. (eds.), **Free Radic. Biol. Med.**, New York, p. 544-616, 1999.

HAN, S.B.; KIM, Y.H.; LEE, C.W.; PARK, S.M.; LEE, H.Y.; AHN, K.S.; KIM, I-H ; KIM, H.M. Characteristic immunostimulation by angelan isolated from *Angelica gigas* Nakai. **Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 40, p. 39-48, 1998.

HAN, S.B.; PARK, S.H.; LEE, K.H.; LEE, C.W.; LEE, S.H.; KIM, H.C.; KIM, Y.S.; LEE, H.S.; KIM, H.M. Polysaccharide isolated from the radix of *Platycodon grandiflorum* selectively activates B cells and macrophages but not T cells. **Int. Immunopharmacol.**, Kidlington, v. 1, p. 1969-1978, 2001.

HAUER, J.; ANDERER, F.A. Mechanism of stimulation of human natural killer cytotoxicity by arabinogalactan from *Larix occidentalis*. **Cancer Immunol. Immunother.**, Berlin, v. 36, n. 4, p. 237-244, 1993.

HARANAKA, K. & SATOMI, N. Cytotoxic activity of tumor necrosis factor (TNF) on human cancer cells *in vitro*. **Jpn. J. Exp. Med.**, Tokyo, v. 51, p. 191-194, 1981.

HAWORTH, R.; GORDON, S. Isolation of na measuring the function of professional phagocytes: murine macrophages. **Methods Microbiol.**, London, v. 25, p. 287-310, 1998.

HOHMANN, H.P.; BROCKHAUS, M.; BAEUERLE, P.A.; REMY, R.; KOLBECK, R. van LOON, A.P. Expression of the types A and B tumor necrosis factor (TNF) receptors is independently regulated, and both receptors mediate activation of the transcription factor NF-kappa B. TNF alpha is not needed for induction of a biological effect via TNF receptors. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 265, n. 36, p. 22409-22417, 1990.

ICHII, S.; IMAI, Y.; IRIMURA, T. Initial steps in lymph node metastasis formation in an experimental system: possible involvement of recognition by macrophage C-type lectins. **Cancer Immunol. Immunother.**, Berlin, v. 49, n. 1, p. 1-9, 2000.

IMAI, T.; HIRATA, K.; MARUMO, F. Induction of nitric oxide synthase by cyclic AMP in rat vascular smooth muscle cells. **J. Clin. Invest.**, Ann Arbor, v. 93, p. 543-549, 1994.

JAMES, S.L.; Role of nitric oxide in parasitic infections. **Microbiol. Rev.**, Washington, v. 59, n. 4, p. 533-547, 1995.

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

JEON, Y.J.; JUE, D.M. Chloroquine inhibits processing of tumor necrosis factor in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. **J. Immunol.**, Bethesda, v. 158, p. 4901, 1997.

JEON, Y.J.; KIM, H.M. Experimental evidences and signal transduction pathways involved in the activation of NF- $\kappa$ B/Rel by angellan in murine macrophages. **Int. Immunopharmacol.**, Berlin, v. 1, p. 1331-1339, 2001.

JEONG, J.Y.; JUE, D.M.; Chloroquine inhibits processing of tumor necrosis factor in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. **J. Immunol.**, Bethesda, v. 158, n. 10, p. 4901-4907, 1997.

JOHANSSON, A.; JESAITIS, A.J.; LUNDQVIST, H.; MAGNUSSON, K.-E.; SJÖLIN, C.; KARLSSON, A.; DAHLGREN, C. Different subcellular localization of cytochrome c and the dormant NADPH-oxidase in neutrophils and macrophages: effect on the production of reactive oxygen species during phagocytosis. **Cell. Immunol.**, Orlando, v. 161, p. 61-71, 1995.

JOHNSON, W.J.; STEPLEWSKI, Z.; MATTHEWS, T.J.; HAMILTON, T.A.; KOPROWSKI, H.; ADAMS, D.O. Cytolytic interactions between murine macrophages, tumor cells, and monoclonal antibodies characterization of lytic conditions and requirements for effector activation. **J. Immunol.**, Bethesda, v. 136, n. 12, p. 4707-4713, 1986.

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

JUN, L.; MET, Z.; YUAN, C. Reversal of inhibition of reactive oxygen species on respiratory burst of macrophages by polysaccharide from *Coriolus versicolor*. **Int. J. Immunopharmacol.**, Kidlington, v. 15, n. 3, p. 429-433, 1993.

JUN, P.Z.; YUAN, C.; MEI, Z.; WAN, J. The effect of polysaccharide krestin on nitric oxide production in mouse peritoneal macrophages. **Med. Sci. Res.**, Hagerstown, v.27, n. 5, p. 299-302, 1999.

KARNOVSKY, M.L.; BADWAY, J.A. Respiratory burst during phagocytosis: an overview. **Met. Enzymol.**, New York, v. 132, p. 353-364, 1986.

KARNOVSKI, M.L.; LAZDINS, J.K. Biochemical criteria for activated macrophages. **J. Immunol.**, Bethesda, v. 121, n. 3, p. 809-813, 1978.

KAWASE, I.; KOMUTA, K.; OGURA, T.; FUJIWARA, H.; HAMAOKA, T.; KISHIMOTO, S. Murine tumor cell lysis by antibody-dependent macrophage-mediated cytotoxicity using syngeneic monoclonal antibodies. **Cancer Res.**, Philadelphia, v. 45, 1985.

KERÉKGYÁRTÓ, C.; VIRÁG, L.; TANKÓ, L.; CHIAHARA, G.; FACHET, J. Strain differences in the cytotoxic activity and TNF production of murine macrophages stimulated by lentinan. **Int. J. Immunopharmacol.**, Kidlington, v. 18, n. 6/7, p. 347-353, 1996.

KIHO, T.; SHIOSE, Y.; NAGAI, K.; UKAI, S. Polysaccharides in fungi: XXX. Antitumor and immunomodulating activities of two polysaccharides from the fruiting bodies of *Armillariella tabescens*. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 40, n. 4, p. 2110-2114, 1992.

KIHO, T.; YOSHIDA, I.; NAGAI, K.; UKAI, S.; HARA, C. (1→3)- $\alpha$ -D-glucan from the alkaline extract of *Agrocybe cylindracea*, and antitumor activity of its O-(carboxymethylated) derivatives. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 189, p. 273-279, 1989.

KIM, K.H.; LEE, Y.S.; JUNG, I.S.; PARK, S.Y.; CHUNG, H.Y.; LEE, I.R.; YUN, Y.S. Acidic polysaccharide from *Panax ginseng*, Ginsan, induces Th1 cell and macrophage cytokines and generates LAK cells in synergy with rIL-2. **Planta Med.**, Ayr, v. 64, p. 110-115, 1998.



KIM, S.W. Nitric oxide production ability and its formation mechanisms in macrophages TIB 71 cells line by polysaccharide extracted from *Gonoderma lucidum*. **Journal of the Korean Society Food Science Nutrition**, Seoul, v. 27, n. 2, p. 333-337, 1998.

KITAZAWA, H.; ISHII, Y.; UEMURA, J.; KAWAI, Y.; SAITO, T.; KANEKO, T.; NODA, K.; ITOH, T. Augmentation of macrophage functions by na extracellular phosphopolysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. **Food Microbiol.**, London, v. 17, p. 109-118, 2000.

KITAZAWA, H.; ITOH, T.; TOMIOKA, Y.; MIZUGAKI, M.; YAMAGUCHI, T. Induction of IFN- $\alpha$  and IL-1 $\alpha$  production in macrophages stimulate with phosphopolysaccharide produced by *Lactococcus latis* ssp. *cremoris*. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v. 31, p. 99-106, 1996.

KIYOHARA, H.; CYONG, J.C.; YAMADA, H. Relationship between structure and activity of na anti-complementary arabinogalactan from the roots of *Angelica acutiloba* Kitagawa. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 193, p. 193-200, 1989.

KIYOHARA, H.; YAMADA, H.; CYONG, J.C.; OTSUKA, Y. Studies on polysaccharide from *Angelica acutiloba*. V. Molecular aggregation and anti-complementary activity of arabinogalactan from *Angelica acutiloba*. **J. Pharmacobio-dyn.**, Tokyo, v. 9, n. 4, p. 339-346, 1986.

KLASSEN, D.K.; SAGONE, A.L.Jr. Evidence for both oxygen and non-oxygen dependent mechanisms of antibody sensitized target cell lysis by human monocytes. **Blood**, Philadelphia, v. 56, n. 6, p. 985-992, 1980.

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

KLIMP, A.H.; VRIES, E.G.E.; SCHERPHOF, G.L.; DAEMEN, T. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, Shannon, v. 44, n. 2, p. 143-161, 2002.

KOGAN, G.; SANDULA, J.; KOROLENKO, T.A.; FALAMEEVA, O.V.; PTERYAEVA, O.N.; ZHANAIEVA, S.Y.; LEVINA, O.A.; FILATOVA, T.G.; KALIEDIN, V.I. Increased efficiency of Lewis lung carcinoma chemotherapy with a macrophages stimulator – yeast carboxymethyl glucan. **Int. Immunopharmacol.**, v. 2, p. 775-781, 2002.

KOJIMA, T.; TABATA, K.; ITOH, W.; YANAKI, T. Molecular weight dependence of the antitumor activity of Schizophyllan. **Agric. Biol. Chem.**, Tokyo, v. 50, n. 1, p. 231-232, 1986.

KOPP, E.B. & GHOSH, S. NF-(kappa) B and real proteins in innate immunity. **Adv. Immunol.**, San Diego, v. 58, p. 1-27, 1995.

KRAUS, J.; FRANZ, G.  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glucans: anti-tumor activity and immunostimulation. In: LATGE, J.P.; BOUCIAS, D. (eds.) **Fungal cell wall and immune response**. Springer-Verlang: Berlin, p. 31-444, 1991.

KUBES, P.; KUROSE, L.; GRANGER, D.N. NO donors prevent integrin-induced leukocyte adhesion but not P-selectin-dependent rolling in postischemic venules. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v. 267, p. 931, 1994

LADÁNYI, A.; TÍMÁR, J.; LAPIS, K. Effect of lentinan on macrophage cytotoxicity against metastatic tumor cells. **Cancer Immunol. Immunother.**, Berlin, v. 36, p. 123-126, 1993.

LARRICK, J.W.; WRIGHT, S.C. Cytotoxic mechanism of tumor-necrosis-factor-alpha. **FASEB J.**, Bethesda, v. 4, n. 14, p. 3215-3223, 1990.

LEU, R.W.; ZHOU, A.Q.; KENNEDY, M.J.; SHANNON, B.J. Exogenous C1q reconstitutes a secondary deficiency of C5-deficient AKR mouse macrophages for FcR-dependent cellular cytotoxicity and phagocytosis. **J. Immunol.**, Bethesda, v. 146, n. 4, p. 1233-1239, 1991.

LEUNG, M.Y.K.; FUNG, K.P.; CHOY, Y.M. The isolation and characterization of an immunomodulatory and anti-tumor polysaccharide preparation from *Flammulina velutipes*. **Immunopharmacology**, v. 35, p. 255-263, 1997.

LEW, W.; OPPENHEIN, J.J.; MATSUSHIMA, K. Analysis of the suppression of IL-1 and IL-1 production in peripheral blood mononuclear adherent cells by a glucocorticoid hormone. **J. Immunol.**, Bethesda, v. 140, p. 1895-1902, 1988.

LIM, D.S.; BAE, K.G.; JUNG, I.S.; KIM, C.H.; YUN, Y.S.; SONG, J.Y. Anti-septicaemic effect of polysaccharide from *Panax ginseng* by macrophage activation. **J. of Infection**, v. 45, p. 32-38, 2002.

LIU, F.; OOI, V.E.C.; FUNG, M.C. Analysis of immunomodulating cytokine mRNAs in the mouse induced by mushroom polysaccharide. **Life Sci.**, New York, v. 64, n. 12, p. 1005-1011, 1999.

LIU, F.; OOI, V.E.C.; CHANG, S.T. Antitumor components of the culture filtrates from *Tricholoma* sp. **World J. Microbiol. Biotech.**, v. 11, p. 486-490, 1995.

LIU, F.; OOI, V.E.C.; LIU, W.K.; CHANG, S.T. Immunomodulation and antitumoral activity of polysaccharide-protein complex from the culture filtrates of a local edible mushroom, *Tricholoma lobayense*. **Gen. Pharmacol.**, New York, v. 27, p. 621-624, 1996.

LIU, M.; LI, J.; KONG, F.; LIN, J.; GAO, Y. Induction of immunomodulating cytokines by a new polysaccharide-peptide complex from culture mycelia of *Lentinus edodes*. **Immunopharmacology**, v. 40, p. 187-198, 1998.

LIU, Y.; MISULOVIN, Z.; BJORKMAN, P.J.; The molecular mechanism of the carbohydrate recognition by the cystein-rich domain of mannose receptor. **J. Mol. Biol.**, London, v. 305, p. 481-490, 2001.

LOTZE, M.T.; DALLAL, R.M.; KIRWOOD, J.M.; FLICKINGER, J.C. Melanoma: Cutaneous melanoma. DEVITA, V.T. Jr; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S.A In: **Cancer: Principles and Practice of Oncology**, 6ed. Lippincott and Williams & Wilkins, 2001.

LOWENSTEIN, C.J. & SNYDER, S.H. Nitric oxide, a novel biological messenger. **Cell**, Cambridge, v. 148, p. 705-707, 1992.

LU et al. A novel human tumor necrosis factor alpha mutant showed potent antitumor activity and reduced toxicity *in vivo*. **Acta Pharmacol. Sin.**, Beijing, v. 22, n. 7, p. 619-623, 2001.

LUETTIG, B.; STEINMULLER, C.; GIFFORD, G.E.; WAGNER, H.; LOHMANN-MATTHES, M.L. Macrophages activation by the polysaccharide arabinogalactan isolated from plant cell cultures of *Echinacea purpurea*. **J. Natl. Cancer Inst.**, Bethesda, v. 81, p. 669-675, 1989.

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

MacMICKING, J.; XIE, Q.W.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Ann. Rev. Immunol.**, v. 15, p. 323-350, 1997.

MANCEK, M.; PRISTOVSEK, P.; JERALA, R. Identification of LPS-binding peptide fragment of MD-2, a Toll-receptor accessory protein. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v. 292, p. 880-895, 2002.

MANNEL, D.N.; MOORE, R.N. MERGENHAGEN, S.E. Macrophages as a source of tumoricidal activity (tumor necrosis factor). **Infect. Immunol.**, v. 30, p. 523-526, 1980.

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

MARR, R.A.; ADDISON, C.L.; SNIDER, D.; MULLER, W.J.; GAULDIE, J.; GRAHAM, F.L. Tumour immunotherapy using as adenoviral vector expressing a membrane-bound mutant of murine TNF alpha. **Gene Ther.**, Basingstoke, v. 4, n. 11, p. 1181-1188, 1997.

MARTIN, J.H.; EDWARDS, S.W. Changes in mechanisms of monocyte/macrophages-mediated cytotoxicity during culture. Reactive oxygen intermediates are involved in monocyte-mediated cytotoxicity, whereas reactive nitrogen intermediates are employed by macrophages in tumor cell killing. **J. Immunol.**, Bethesda, v. 150, p. 3478-3486, 1993.

MATEO, A.O.; ARTIÑANO. Nitric oxide reactivity and mechanisms involved in its biological effects. **Pharmacol. Res.**, London, v. 42, n. 5, p.421-427, 2000.

MATTHYS, P.; FROYEN, G.; VERDOT, L.; HUANG, S.; SOBIS, H.; Van DAMME, J.; VRAY, B.; AGUET, M.; BILLIAU, A. IFN- $\gamma$  receptor-deficient mice are hypersensitive to the anti-CD3-induced cytokine release syndrome and thymocyte apoptosis. Protective role of endogenous nitric oxide. **J. Immunol.**, Bethesda, v. 155, p. 3823-3829, 1995.

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

MCNEIL, M.; WALLNER, S.J.; HUNTER, S.W.; BRENNAN, P.J. Demonstration that the galactosyl and arabinosyl residues in the cell wall arabinogalactan of *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium tuberculosis* are furanoid. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 166, n. 2, p. 299-308, 1987.

MISAKI, A.; KISHIDA, E.; KAKUTA, M.; TABATA, K. Antitumor fungal (1→3)-β-D-glucans: structural diversity and effects of chemical modification. In: YALPANI, M. (ed) **Carbohydr. Polymers**, ATAL. Press Mount Prospect. Illinois, p. 116-129, 1993.

MISSHIMA, T.; MURATA, J.; TOYOSHIMA, M.; FUJII, H.; NAKAJIMA, M.; HAYASHI, T.; KATO, T.; SAIKI, I. Inhibition of tumor invasion and metastasis by calcium spirulan (Ca-SP), a novel sulfated polysaccharide derived from a blue-green alga, *Spirulina platensis*. **Clin. Exp. Metastasis**, v. 16, p. 541-550, 1998.

MITCHELL, M.S. Combining chemotherapy with biological response modifiers in treatment of cancer. **J. Nat. Cancer Inst.**, Bethesda, v. 80, p. 1445-1450, 1988.

MIWA, M.; SHIBATA, K.; NAGAYAMA, K.; AIKAWA, K. Nitric oxide formation by macrophages stimulated with water extracts from meats and offals. **Biosc. Biotech. Biochem.**, Bethesda, v. 61, n. 11, p. 1953-1954, 1997.

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

MIZUNO, T.; SAKAI, T.; CHIHARA, G. Health foods and medicinal usages of mushrooms. **Food Rev. Int.**, Monticello, v. 11, p. 69-81, 1995.

MIZUNO, M.; MORIMOTO, M.; MINATO, K.; TSUCHIDA, H. Polysaccharides from *Agaricus blazei* stimulated lymphocyte T-cell subsets in mice. **Biosci. Biotech. Biochem.**, Bethesda, v. 63, p. 434-437, 1998.

MIZUNO, M.; SHIOMI, Y.; MINATO, K.; KAWAKAMI, S.; ASHIDA, H.; TSUCHIDA, H. Fucogalactan isolated from *Sarcodon aspratus* elicits release of tumor necrosis factor-α and nitric oxide from murine macrophages. **Immunopharmacology**, v. 46, p. 113-121, 2000.

MOLINARO, A.; LANZETTA, R.; MANCINO, A.; EVIDENTE, A.; Di ROSA, M.; IANARO, A. Immunostimulant (1→3)-D-glucans from the cell wall of *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr strain 263. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 329, p. 441-445, 2000.

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

**MONASTRA, G. et al. Membrane form of TNF alpha induces both lysis and apoptosis in susceptible target cells. Cell. Immunol., Orlando, v. 171, p. 102-110, 1996.**

MORI, H.; ITOH, N.; YAMADA, Y.; TAMAYA, T. Induction of endogenous tumor necrosis factor by OK-432 in ovarian cancer patients with ascites. **Biotherapy**, v. 1, p. 123-131, 1989.

MORRISON, D.C.; JACOBS, D.M. Binding of polymyxin B to the lipid A portion of bacterial lipopolysaccharide. *Immunochemistry*, v. 13, n. 10, p. 813-818, 1976.

MÜLLER, A.; RICE, P.J.; ENSLEY, H.E.; COOGAN, P.S.; KALBFEISCH, J.H.; KELLEY, J.L.; LOVE, E.J.; PORTERA, C.A.; HÁ, 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.**, Bethesda, v. 156, p. 3418-3425, 1996.

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

NATHAN, C. & XIE, Q. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. **Cell**, Cambridge, v. 78, p. 915-918, 1994.

NISHIMURA-UEMURA, J.; KITAZAWA, H.; KAWAI, Y.; ITOH, T.; ODA, M.; SAITO, T. Functional alteration of murine macrophages stimulated with extracellular polysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1. **Food Microbiology**, v. 20, p. 267-273, 2003.

NOLETO, G.R.; MERCÊ, A.L.R.; IACOMINI, M.; GORIN, P.A.J.; SOCCOL, V.T.; OLIVEIRA, M.B.M. Yeast manna-vanadium (IV) complex and their effect on peritoneal macrophages. **Carbohydr. Polymers**, England, 2004 (*in press*).

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

NUSSLER, A.J. & BILLIAR, T.R. Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. **J. Leuk. Biol.**, Bethesda, v. 54, p. 171-178, 1993.

ODONMAZIG, P.; EBRINGEROVA, A.; MACHOVA, E.; ALFOLDI, J. Structural and molecular properties of the arabinogalactan isolated from *Mongolian larchwood* (*Larix dahurica* L.). **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 252, p. 317-324, 1994.

OGURA, T.; TATEMACHI, M.; ESUMI, H. TNF-alpha mediates inducible nitric oxide synthase expression in human neuroblastoma cell line by cisplatin. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v. 233, p. 788-791, 1997.

OKASAKI, M.; CHIBA, N.; ADACHI, Y.; OHNO, N.; YODAMAE, T. Signal transduction pathway on  $\beta$ -glucans triggered hydrogen peroxide production by murine macrophages. **Carbohydr. Polymers**, England, v. 23, p. 47-54, 1994.

OKASAKI, M.; CHIBA, N.; ADACHI, Y.; OHNO, N.; YODAMAE, T. Signal transduction pathway on  $\beta$ -glucans triggered hydrogen peroxide production by murine macrophages *in vitro*. **Biol. Pharm. Bull.**, Tokyo, v. 19, n. 1, p. 18-23, 1996.

OKASAKI, M.; ADACHI, Y.; OHNO, N.; YODAMAE, T. Structure-activity relationship of (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucans in the induction of cytokine production from macrophages, *in vitro*. **Biol. Pharm. Bull.**, Tokyo, v. 18, p. 1320-1327, 1995.

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

OSTENSEN, M.E.; THIELE, D.L.; LIPSKY, P.E. Tumor necrosis factor- $\alpha$  enhances cytolytic activity of human natural killer cells. **J. Immunol.**, Bethesda, v. 138, p. 4185-4191, 1987.

PARK, J.-W.; MA, M.; RUEDI, J.M.; SMITH, R.M.; BABIOR, B.M. The cytosolic components of the respiratory burst oxidase exist as a Mr 240.000 complex that acquires a membrane binding site during activation of the oxidase in a cell-free system. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 267, n. 24, p. 17327-17332, 1992.

PARK, J.W. & BABIOR, B.M. The translocation of respiratory burst oxidase components from cytosol to plasma membrane is regulated by guanine nucleotides and diacylglycerol. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 167, n. 28, p. 19901-19906, 1992.

PASQUIER, C.; MARTY, N.; DOURNES, J.L.; CHABANON, G.; PIPY, B. Implication of neutral polysaccharide associated to alginate in inhibition of murine macrophages response to *Pseudomonas aeruginosa*. **FEMS Microbiol. Letters**, Amsterdam, v. 147, p. 195-202, 1997.

PHILLIPS, H.J. Dye exclusion test for viability. In: KRUSE Jr, P.F.; PATTERSON, Jr.M.H. Tissue Culture: methods and application. New York, Academic Press, 1973, p. 406-408.

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

POTIER P. Rhone-Poulenc Lecture – Search and discovery of new antitumor compounds. **Chem. Soc. Res.**, p. 113-119, 1992.

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

PULLYBLANK, A.M.; GUILLOU, P.J.; MONSON, J.R. Interleukin-1 and tumour necrosis factor alpha may be responsible for the lytic mechanism during anti-tumour antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. **Br. J. Cancer**, Edinburgh, v. 72, n. 3, p. 601-606, 1995.

PUTZ, E.F.; MANNEL, D.N. Monocyte activation by tumor cells: a role for carbohydrate structures associated with CD2. **Scand. J. Immunol.**, Oxford, v. 41, n. 1, p. 77-84, 1995.



RAMAMOORTHY, L.; KEMP, M.C.; TIZARD, I.R. Acemannan, a  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-acetylated mannan, induces nitric oxide production in macrophages cell line raw 264.7. **Mol. Pharmacol.**, Bethesda, v. 50, p. 878-884, 1996.

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

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

REN, D.L.; WANG, J.Z.; NODA, H.; AMANO, H.; OGAWA, S. The effects of an algal polysaccharide from *Gloiopeltis tenax* on transplantable tumors and immune activities in mice. **Planta Med.**, Ayr, v. 61, p. 120-125, 1995.

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

ROBBINS, R.A.; HADELI, K.; NELSON, D.; SATO, E.; HOYT, J.C. Nitric oxide, peroxynitrite, and lower respiratory tract inflammation. **Immunopharmacology**, v. 48, p. 217-221, 2000.

ROSE, W.C.; REED, F.C.III, SIMINOFF, P.; BRADNER, W.T. Immunotherapy of Madison 109 lung carcinoma and murine tumours using lentinan. **Cancer Res.**, Philadelphia, v. 44, p. 1368-1373, 1984.

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

ROTROSEN, D. & LETO, T.L. Phosphorylation of neutrophil 47-kDa cytosolic oxidase factor. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 265, n. 32, p. 19910-19915, 1990.

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

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

SAIMA, Y.; DAS, A.K.; SARKAR, K.K.; SEM, A.K.; SUR, P. An antitumor pectic polysaccharide from *Feronia limonia*. **Int. J. Biol. Macromol.**, Amsterdam, v. 27, p. 333-335, 2000.

SAKAMAKI, T.; IMAI, Y.; IRIMURA, T. Enhancement in accessibility to macrophages by modification of mucin-type carbohydrate chains on a tumor cell line: role of a C-type lectin of macrophages. **J. Leukoc. Biol.**, Bethesda, v. 57, n. 3, p. 407-414, 1995.

SAKURAI, T.; OHNO, N.; YODAMAE, T. Intravenously administered (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -glucan, SSG, obtained from *Sclerotinia sclerotiorum* IFO 9395 augments murine peritoneal macrophages function in vivo. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 40, n. 8, p. 2120-2124, 1992.

SASADA, M.; PABST, M.J.; JOHNSTON, R.B.Jr. Activation of peritoneal macrophages by lipopolysaccharide alters the kinetic parameters of the superoxide-producing NADPH oxidase. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 258, n. 16, p. 9631-9635, 1983.

SASAKI, T.; ABIKO, N.; UCHIDA, H.; TANAKA, M.; NITTA, K.; YOSHIOKA, Y.; NOMURA, H. Antitumoral activity of tetrahydro-2-furanyl- and tetrahydro-2-pyranyl-glucans obtained by chemical modification of (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucan from *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* IFO 13140 and its lower molecular weight glucans. **Cancer Treat. Rep.**, Washington, v. 67, n. 3, p. 275-280, 1983.

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

SHAW, G.M.; LEVY, P.C.; LOBUGLIO, A.F. Human monocyte cytotoxicity to tumor cells. I. Antibody-dependent cytotoxicity. **J. Immunol.**, Bethesda, v. 121, p. 573-578, 1978.

SHEPHERD, V.L.; LEE, Y.C.; SCHLESINGER, P.H.; STAHL, P.D. L-Fucose-terminated glycoconjugates are recognized by pinocytosis receptors on macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v. 78, n. 2, p. 1019-1022, 1981.

SMITH, D.M.; LACKIDES, G.A.; EPSTEIN, L.B. Coordinated induction of autocrine tumor necrosis factor and interleukin 1 in normal human monocytes and the implications for monocyte-mediated cytotoxicity. **Cancer Res.**, Philadelphia, v. 44, p. 3146-3153, 1990.

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

SOUBA, W.W. Cytokine control of nutritional and metabolism in critical illness. **In: Current Problems in Surgery**, v. XXXI (7) (1994) p. 579-643. Mosby-Year Book, Inc, St Louis, Mo.

SPRIGGS, D.R.; SHERMAN, M.L.; ILL, E.F.; KUFFE, D.W. Clinical studies with tumor necrosis factor. In *Tumor Necrosis Factor and related cytotoxins* (Edited by Bock, g. and Marsh, j.) Wiley, Chichester, p. 206-227, 1987.

STAHL, P.D.; WILEMAN, T.E.; DIMENTE, S.; SHEPHERD, V.L. Mannose-specific oligosaccharide recognition by mononuclear phagocytes. **Biology of the Cell**, Paris, v. 51, p. 215-218, 1984.

STEVAN, F.R.; OLIVEIRA, M.B.M.; BUCCHI, D.F.; NOSEDA, M.D.; IACOMINI, M.; DUARTE, M.E.R. Cytotoxic effects against HeLa cells of polysaccharides from seaweeds. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, Paris, v. 33, n. 4, p. 477-484, 2001.

STOVROFF, M.C.; FRAKER, D.L.; NORTON, J.A. Cachectin activity in the serum of cachectic, tumor-bearing rats. **Arch. Surg.**, Chicago, v. 124, p. 94-99, 1989.

STUEHR, D.J. & MARLETTA, M.A. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v. 82, p. 7738-7742, 1985.

STUELP-CAMPELO, P.M. Efeitos biológicos *in vivo* e *in vitro* de polissacarídeos extraídos de líquens sobre macrófagos peritoneais de camundongos. Curitiba, 2002. Tese de Doutorado em Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

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

STONE, B.A.; CLARKE, A.E. **Chemistry and biology of (1<sup>®</sup>3)-b-glucans**. Victoria, Australia: La Trobe University Press, p. 60-75, 283-358, 1992.

SUFFYS, P.; BEYAERT, R.; VAN ROY, F.; FIERS, W. Involvement of a serine protease in tumour-necrosis-factor-mediated cytotoxicity. **Eur. J. Biochem.**, Paris, v. 178, p. 257-265, 1988.

SUGA, T.; SHIIO, T. MAEDA, Y.Y.; CHIHARA, G. Antitumor activity of lentinan in murine syngeneic and autochthonous hosts and its suppressive effect on 3-methylcholanthrene-induced carcinogenesis. **Cancer Res.**, Philadelphia, v. 44, p. 5132-5137, 1984.

SVEINBJORNSSON, B.; RUSHFELDT, C.; OLSEN, R.; SMEDSROD, B.; SELJELID, R. Cytotoxic effect of cytokines on murine colon carcinoma cells involved TNF-mediated apoptosis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v. 233, p. 270-275, 1997.

TAKAHASHI, K.; WATANUKI, Y.; YAMAZAKI, M.; ABE, S. Local induction of a cytotoxic factor in a murine tumor by systemic administration of an antitumor polysaccharide, MGA. **Br. J. Cancer**, Edinburgh, v. 57, p. 170-173, 1988 (a).

TAKAHASHI, K.; YAMAZAKI, M.; ABE, S. Local induction of a tumor necrosis factor (TNF)-like cytotoxic factor in murine tissues with tumorous and nontumorous inflammation after systemic administration of antitumor polysaccharides. **J. Pharmacobio-dyn.**, Tokyo, v. 11, p. 472-478, 1988 (b).

TAKANO, R. et al. Recognition of N-glycosidic carbohydrates on esophageal carcinoma cells by macrophage cell line THP-1. **Am. J. Pathol.**, Bethesda, v. 137, p. 393-401, 1990.

TAKATSUKI, F. et al. Improvement of erythroid toxicity by lentinan and erythropoietin in mice treated with chemotherapeutic agents. **J. Exp. Hematol.**, New York, v. 24, n. 3, p. 416-422, 1996.

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

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

THATTE, U.M.; DAHANUKAR, S.A. Immunotherapeutic modification of experimental infections by indian medicinal-plants. **Phytother. Res.**, London, v. 3, n. 2, p. 43-49, 1989.

TOKUZEN, R.; NAKAHARA, W. Suppression of autochthonous grafts of spontaneous mammary tumor by induced allogenic graft rejection mechanism. **Cancer Res.**, Philadelphia, v. 33, p. 645-647, 1973.

TSUJIMOTO, M.; VILCEK, J. Tumor necrosis factor receptor in HeLa cells and their regulation by interferon- $\gamma$ . **Biol. Chem.**, Berlin, v. 261, p. 5384-5388, 1986.

UHLENBRUCK, G.; LÜTTICKEN, R.; BÄK; BÖHMER, G. Serologische Kreuzreaktionen von Gruppe-B-Streptokokken. **Immun. Infekt.**, v. 13, p. 275-282, 1985.

ULEVITCH, R.; TOBIAS, P. Receptor-mediated mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. **Ann. Rev. Immunol.**, Palo Alto, v. 13, p. 437-457, 1995.

UM, S.-H.; RHEE, D.-K.; PYO, S. Involvement of protein kinase C and tyrosin kinase in tumoricidal activation of macrophage induced by *Streptococcus pneumoniae* type II capsular polysaccharide. **Int. Immunopharmacol.**, v. 2, p. 129-137, 2002.

USAMI, H.; YAMAMOTO, A.; YAMASHITA, W.; SUGAWARA, Y.; HAMADA, S.; YAMAMOTO, T.; KATO, K.; KOKEGUCHI, S.; OHOKUNI, H.; KOTANI, S. Antitumor effects of streptococcal lipoteichoic acids on meth A fibrosarcoma. **Br. J. Cancer**, Edinburgh, v. 57, p. 70-73, 1988.

UTSUGI, T.; SCHROIT, A.J.; CONNOR, J.; BUCANA, C.D.; FIDLER, I.J. Elevated expression of phosphatidylserine in the outer membrane leaflet of human tumor cells and recognition by activated human blood monocytes. **Cancer Res.**, Philadelphia, v. 51, n. 11, p. 3062-3066, 1991.

VADIVELLOO, P.K.; VAIRO, G.; HERTZOG, P.; KOLA, I.; HAMILTON, J.A. Role of type I interferons during macrophage activation by lipopolysaccharide. **Cytokine**, London, v. 12, n. 11, p. 1639-1646, 2000.

Van de LOOSDRECHT, A.A.; OSSENKOPPELE, G.J.; BEELEN, R.H.; BROEKHOVEN, M.G.; DRAGER, A.M.; LANGENHUIJSEN, M.M. Apoptosis in tumor necrosis factor-alpha-dependent, monocyte-mediated leukemic cell death: a functional, morphologic, and flow-cytometric analysis. **Exp. Hematol.**, New York, v. 21, n. 13, p. 1628-1639, 1993.

Van der VEEN, R.C.; DIETLIN, T.A.; GRAY, J.D.; GILMORE, W. Macrophage-derived nitric oxide inhibits the proliferation of activated T Helper cells and is induced during antigenic stimulation of resting T cells. **Cell. Immunol.**, Orlando, v. 199, p. 43-49, 2000.

Van OSS, C.J. Phagocytosis: an overview. **Methods Enzymol.**, San Diego, v. 132, p. 3-15, 1986.

WAAGE, A.; BAKKE, O. Glucocorticoids suppress the production of tumor necrosis factor by lipopolysaccharide-stimulated human monocytes. **Immunology**, Oxford, v. 63, p. 299-302, 1988.

WACK, C.; BECKER, J.C.; BRÖCKER, E.B.; LUTZ, W.K.; FISHER, W.H. Chemoimmunotherapy for melanoma with dacarbazine and 2,4-dinitrochlorobenzene: results from a murine model. **Melanoma Res.**, London, v. 11, p. 247-253, 2001.

WATANABE, N.; NÜTSU, Y.; NEDA, H.; SONE, H.; YAMAUCHI, N. Antitumor effect of tumor necrosis factor against various primarily cultured human cancer cells. **Jan. J. Cancer Res.**, v. 76, p. 1115-1119, 1985.

WAKSHULL, E.; BRUNKE-REESE, D.; LINDERMUTH, J.; FISETTE, L.; NATHANS, R.S.; CROWLEY, J.J.; TUFTS, J.C.; ZIMMERMAN, J.; MACKIN, W.; ADAMS, D.S. PGG-glucan, a soluble  $\beta$ -(1,3)-glucan, enhances the oxidative burst response, microbicidal activity, and activates a NK-kappaB-like factor in human PMN: evidence for a glycosphingolipid  $\beta$ -(1,3)-glucan receptor. **Immunopharmacology**, v. 41, p. 89-107, 1999.

WESTENFELDER, U.; SCHRAVEN, B.; MANNEL, D.N. Characterization of monocyte-activating tumour cell membrane structures. **Scand. J. Immunol.**, Oxford, v. 38, n. 4, p. 388-394, 1993.

WHISTLER, R.L.; BUSHWAAY, A.A.; SINGH, P.P.; NARAHARA, W.; TOKUZEN, R. Non cytotoxic antitumor polysaccharides. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, San Diego, v. 32, p. 235-275, 1976.

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

WING, E.D. & REMINGTON, J.S. In: **Basic and Clinical Immunology**. Los Altos, Lange, 1980, p. 129-143.

WONG, C.K.; LEUNG, K.N.; FUNG, K.P.; PANG, P.K.T.; CHOY, Y.M. Tumor necrosis factor eliciting fractions separated from *Pseudostellaria heterophylla*. **Int. J. Immunopharmacol.**, Kidlington, v. 16, p. 271-277, 1994.

XIA, Y.; ZWEIER, J.L. Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v. 94, P. 6954-6958, 1997.

YAMAGUCHI, T. & KANEDA, M.; Presence of cytochrome b-558 in guineapig alveolar macropahges-subcelular localization and relationship with NADPH oxidase. Amsterdam, v. 933, p. 450-459, 1988.

YOSHIZAWA, Y.; TSUNEHIRO, J.; NOMURA, K.; ITOH, M.; FUKUI, F.; AMETANI, A.; KAMINOGAWA, S. *in vivo* macrophage-stimulation activity of the enzyme-degraded water soluble polysaccharide fraction from a marine alga (*Gracilaria verrucosa*). **Biosci. Biotech. Biochem.**, Tokyo, v. 60, n. 10, p. 1667-1671, 1996.

YAMADA, H.; KIYOHARA, H.; CYONG, J.C.; OTSUKA, Y. Studies on polysaccharides from *Angelica acutiloba* IV. Characterization of na anti-complementary arabinogalactan from the roots of *Angelica acutiloba* Kitagawa. **Mol., Immunol.**, Kidlington, v. 22, n. 3, p. 295-304, 1985.

WANG, Z.T.; NG, T.B.; YEUNG, H.W.; XU, G.J. Immunomodulatory effect of a polysaccharide-enriched preparation of *Codonopsis pilosula* roots. **Gen. Pahrmac.**, v. 27, n. 8, p. 1347-1350, 1996.

WRIGHT, S.D.; RAMOS, R.A.; TOBIAS, P.S.; ULEVITCH, R.J.; MATHISON, J.C. CD14, a receptor for complex of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. **Science**, Washington, v. 249, p. 1431-1433, 1990.

ZHUANG, J.C.; WOGAN, G.N. Growth and viability of macrophages continuously stimulated to produce nitric oxide. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v. 94, p. 11875-11880, 1997.





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



Nº 013

## CERTIFICADO

A Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituída pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento da CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003, **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).

Processo: 23075.43075/2003-33 - Data da aprovação: 03/11/2003

Título: Efeitos biológicos da arabinogalactana (aragal) de *Anadenanthera columbrina*

Autores: Maria Benigna Martinelli de Oliveira (resp - BIO); Marcelo Iacomini (colab); Mariana Piemonte Moretão (acade)

Em Curitiba, 03 de Novembro de 2003.

Prof. SILVIO MARQUES ZANATA  
 Secretário

Profa. ANETE CURTE FERRAZ  
 Presidente



ELSEVIER

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

SCIENCE @ DIRECT®

Immunology Letters 89 (2003) 175–185

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

## Effect of an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco) on peritoneal macrophage functions

Mariana Piemonte Moretão<sup>a</sup>, Dorly F. Buchi<sup>b</sup>, Philip A.J. Gorin<sup>a</sup>,  
Marcello Iacomini<sup>a</sup>, Maria Benigna M. Oliveira<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, UFPR, CP 19046, CEP 81531-990, Curitiba, Paraná, PR, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná, UFPR, CP 19046, CEP 81531-990, Curitiba, Paraná, PR, Brazil

Received 24 March 2003; received in revised form 4 June 2003; accepted 9 June 2003

### Abstract

Brazilian flora are a source of interesting polysaccharides which, either in their native state or when submitted to structural modifications, might have potential applications as biological response modifiers (BRM). A complex acidic heteropolysaccharide, containing mainly galactose and arabinose (ARAGAL), isolated from the gum of the native leguminous tree *Anadenanthera colubrina* (Angico branco), was studied for its immunological properties on peritoneal exudate cells, namely their superoxide anion production, phagocytic activity, morphological alterations and percentage content of activated macrophages. Activation of macrophages showing increased cytoplasm, bright and large nuclei, various cytoplasmatic projections and spreading ability, was detected following *in vitro* cell exposure to ARAGAL or in cells obtained from treated animals. *In vitro* exposure to ARAGAL increased the occurrence of activated macrophages in a time- and a dose-dependent pattern, since ~82% of the cells were activated in the presence of 300 µg/ml of ARAGAL after 24 h of incubation and ~91% after 48 h. The occurrence of activated macrophages was also evident in cell preparations from ARAGAL-treated mice, their percentage showing a dose-dependent pattern. There were ~60, 75 and 75% following treatment with 100, 250 and 500 mg/kg of ARAGAL, respectively. A phagocytic assay showed that 25 µg/ml ARAGAL was sufficient to impose a maximum phagocytic ability, although this effect was dose-dependent. O<sub>2</sub><sup>-</sup> production by macrophages from ARAGAL-treated mice was 70% higher than that of cells from untreated mice. Moreover, cells from treated mice responded to PMA, the effect being 25% higher than that of the control using untreated mice. These results thus suggest a possible role of ARAGAL from *A. colubrina* as a BRM.

© 2003 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Macrophage; Plant arabinogalactan; Superoxide anion; Activation process

### 1. Introduction

Immune responses are influenced by exposure to several types of foreign substances. In the immune response, macrophages have a critical role, since they act as a link between the innate and acquired immune system [1], fighting infection, inflammation, angiogenesis and in the promotion of wound healing [2,3]. Macrophages kill microorganisms and tumor cells and

damage tissues during inflammation by two separate oxidative pathways involving the synthesis of superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) and nitric oxide (NO), which are formed, respectively, by NADPH oxidase and nitric oxide synthases (iNOS) [4,5]. These cells are also able to produce a variety of cytokines, such as interleukin (IL), interferon (IFN), tumor necrosis factor (TNF) and active substances like prostaglandins [6].

Immune modulatory therapy, which can be either nonspecific or cell cytokine specific, can be directed to enhance the individual's own immunity to favor a particular immunologic response. Some agents which are used in such a therapy modality have been referred to as 'biological response modifiers' (BRM) [7], which is

\* Corresponding author. Tel.: +55-41-3611-664; fax: +55-41-2662-042.

E-mail address: [mbmo@bio.ufpr.br](mailto:mbmo@bio.ufpr.br) (M.B.M. Oliveira).

an important class of safe drugs, without severe side effects. New discoveries and identification of them have become an important goal of research in biomedical sciences. Enhancement of host defense mechanisms is recognized as a possible means of inhibiting tumor growth without harming the host. From this point of view, extensive studies have been undertaken on polysaccharides isolated from natural sources [8,9], such as mushrooms, fungi, yeasts, algae, lichens and plants. Their biological activities can be antiviral, anticoagulant, interference with the respiratory burst of macrophages and polymorphonuclear cells, besides being inducers of IFN- $\gamma$  and/or NO production [10]. These have attracted attention due to their potential role as BRM, in terms of immunomodulatory and antitumor effects [11,12]. Antineoplastic activity of polysaccharides involved as biomulators in the immune response against tumors has been described for calcium spirulan from *Spirulina platensis* [13], those from *Phellinus linteus* (PL) [11], lentinan from *Lentinus edodes* (Shiitake) [14], that from the radix of *Platycodon grandiflorum* (PG) [15], a  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) glucan [16–18] and an  $\alpha$ -D-glucan from lichen *Ramalina celastri* [9,19,20].

Polysaccharides showing BRM activity are therefore structurally heterogeneous and can be either homo- or heteropolysaccharides. A class that has receiving attention is the arabinogalactan [21–27], which consists of densely branched high-molecular weight polysaccharides (MW: 10,000–120,000) [24]. In nature, they are found in several microbial systems and in many plants, mostly in a glycopeptide form, bound to a spine of threonine, proline or serine (arabinogalactan protein AGP) [27]. It is of interest that several naturopathic immune ‘enhancer’ herbs contain significant amounts of arabinogalactans, such as *Echinacea purpurea*, *Baptisia tinctoria*, *Thuja occidentalis* [22], *Angelica acutiloba* [28] and *Curcuma longa* [23]. In fact, there is much evidence that arabinogalactans can interfere in the immune response [22,24].

The larch tree is a major commercial source of arabinogalactan. Two species are western larch (*Larix occidentalis*) and Mongolian larch (*Larix dahurica*) [29]. Larch arabinogalactans (wood gum, wood sugar, larch gum, Stractan, Ara-6) have unusual immunological properties, and since they possess minimal toxicity, they were approved for food use [27]. Pretreatment of macrophages with the larch polymer (*L. occidentalis*) induced an increased release of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , interleukin-1  $\beta$  (IL-1  $\beta$ ) and interleukin-6 (IL-6), but only IFN- $\gamma$  was involved in enhancement of natural killer (NK) cytotoxicity [24]. An acidic arabinogalactan, highly purified from plant cell cultures of *Echinacea purpurea*, was effective in activating macrophages against tumor cells and microorganisms and, when injected intraperitoneally, it stimulated macrophages [27].

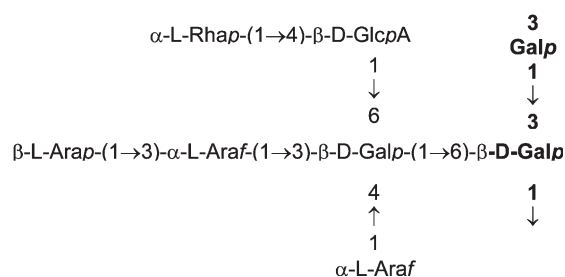


Fig. 1. ARAGAL structure. The heteropolysaccharide has a (1 $\rightarrow$ 3)-linked  $\beta$ -D-Galp main-chain (in bold) and many different side-chains, which are composed of oligosaccharide groups of two, three, five or seven units ( $\alpha$ -Araf,  $\alpha$ -Rhap and  $\beta$ -Glc pA) [31].

Brazilian flora are a source of interesting polysaccharides which either, in their native state or when submitted to structural modifications, might have potential applications as a BRM.

The leguminous tree *Anadenanthera colubrina* (Angico branco), is native to South American rain forests, starting at high altitudes from the north of Colombia and northern Brazilian States to the southern State of Paraná, where it grows at altitudes >400 m and produces an arabinogalactan-rich trunk exudate. This gum exudate is reputed to be a medicament for respiratory problems [30]. It has a complex high-arabinose heteropolysaccharide that forms an aqueous solution of low viscosity. It contains 64% of arabinose, 20% of galactose, 10% of glucuronic acid and 6% of rhamnose, and consists of a (1 $\rightarrow$ 3)-linked  $\beta$ -galactopyranosyl main chain substituted at O-6 by a variety of side chains [30,31], the most complex of which is depicted in Fig. 1.

We now investigate the effect of the arabinogalactan (ARAGAL) (Fig. 1) for its effect on macrophage characteristics and functions.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), lipopolysaccharide (LPS), *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N*-2-ethanesulfonic acid (HEPES), ferricytochrome c, superoxide dismutase (SOD), (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT), sulfanilamide, naphthylethylene-diamide were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Polymyxin was supplied by Inlab (Brazil). Corning or Nunc provided tissue culture materials. Eagle medium (MEM) was supplied by Flow Laboratories and fetal bovine serum was obtained from Cultilab (Brazil). PMA was dissolved in Me<sub>2</sub>SO and stored at  $-20$  °C as a 1 mg/ml stock solution. Other chemical reagents were obtained from Merck.

ARAGAL was dissolved in PBS solution, pre-filtered (paper filter TP10-INLAB), then filtered with 0.45  $\mu\text{m}$  pore size membrane (Millipore®) and sterilized by filtration through a sterile membrane of 0.22  $\mu\text{m}$  (Millipore®). ARAGAL was kindly donated by Delgobo et al. [31]. The polymer has been eluted as a homogeneous single peak from a Sepharose CL-4B column, the apparent molecular mass being  $1.6 \times 10^6$  Da. It contains ions ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  and  $\text{Na}^+$ ) [32]. Further analysis of ARAGAL by HPSEC-MALLS showed a homogeneous peak with a 'shoulder' composed by the same structure.

## 2.2. Animals

Male albino Swiss mice (6–8-week-old) that received a standard laboratory diet (Purine®) and water ad libitum, were used. All recommendations of the Brazilian National Law (N° 6.638,05 Nov. 1979) for scientific management of animals were respected.

## 2.3. Peritoneal exudate cell (PEC) preparation

PEC from mice were collected by infusing their peritoneal cavity with 10 ml of ice-cold sterile PBS. After centrifugation, the cell pellet was washed twice with cold, sterile PBS and then resuspended in the same solution. The cells were counted using a Neubauer hemocytometer and were plated so as to adhere on to a tissue culture plate. After 30 min at 37 °C under a 5%  $\text{CO}_2$  atm., the cells were washed twice with warm sterile PBS to remove nonadherent cells. Adherent macrophages were then incubated in a standard medium consisting of MEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  penicillin and 100 U/ml gentamicin. Accordingly, > 90% of adherent cells were macrophages [33,34] and the preparation was not further purified.

## 2.4. MTT assay for cell viability

Adherent macrophages were incubated (1–5 h) in the standard medium in the absence (control) or presence of ARAGAL (10–300  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) at 37 °C under 5%  $\text{CO}_2$ . Cell viability was then evaluated by the MTT method [35,36].

## 2.5. In vitro morphological analyses

Adherent macrophages on glass coverslips contained in a tissue culture plate of 24-wells were incubated in the standard medium in the presence or absence of ARAGAL (10–300  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). After 24 or 48 h at 37 °C under 5%  $\text{CO}_2$ , the glass coverslips were washed with PBS pH 7.4, fixed for 5 min in Bouin's fixative, stained with Giemsa for 2 h, dehydrated in acetone and the slides were then mounted with Entelan and observed using an

Olympus BHS microscope. The number of activated and resident macrophages was counted in all groups.

## 2.6. Assay for phagocytic activity

Phagocytic activity was assayed by the method described by Ramesh et al. [6] and Buchi et al. [37], using yeasts as phagocytosing particles. Briefly, a macrophage monolayer ( $5 \times 10^5$  cells/well) adhered on to glass coverslips, contained in a tissue culture plate (24-wells), was incubated with the standard medium in the absence (control) or presence of varying concentrations of ARAGAL (25, 50 and 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). After 24 h at 37 °C under 5%  $\text{CO}_2$ , the cells were washed three times with the MEM medium and the yeast (ratio of macrophages to yeast, 1:10) was added, following incubation under the same conditions up to 120 min. After each incubation time, non-phagocytosed yeasts were removed by rinsing with PBS. The coverslips were then fixed with Bouin's fixative, stained with Giemsa for 2 h, dehydrated in acetone and slides were mounted with Entelan and examined microscopically. The percentage of macrophages that phagocytosed yeasts and the mean number of intracellular particles per macrophage was determined. The endocytic index was calculated using the formula:

$$\text{EI} = \frac{\text{N}^\circ \text{ phagocytosed yeast}}{\text{N}^\circ \text{ phagocytosing macrophages}} \times \text{X\% phagocytosing macrophages}$$

## 2.7. In vivo experiments

Groups of six or ten animals/group were used for the *in vivo* morphological analyses and  $\text{O}_2^-$  and NO production, respectively. All control groups received sterile PBS (pH 7.4), which was the ARAGAL solvent.

## 2.8. Morphological analyses of macrophages from ARAGAL-treated animals

Mice were treated intraperitoneally with ARAGAL solution (100, 250 or 500 mg/kg). Seven days later, they were killed by ether anesthesia. PEC were collected and plated ( $5 \times 10^5$  cells/well) on 24-wells tissue culture plates having glass coverslips. Adherent macrophages were incubated for 24 h at 37 °C under 5%  $\text{CO}_2$  in the standard medium. The monolayer was then washed with PBS pH 7.4, fixed and examined by optical microscopy, as described above. The number of activated and resident macrophages was counted in all groups.

## 2.9. Measurement of superoxide anion ( $\text{O}_2^-$ ) production

Mice received a single intraperitoneal dose of ARAGAL solution (100 or 200 mg/kg). Seven days later,

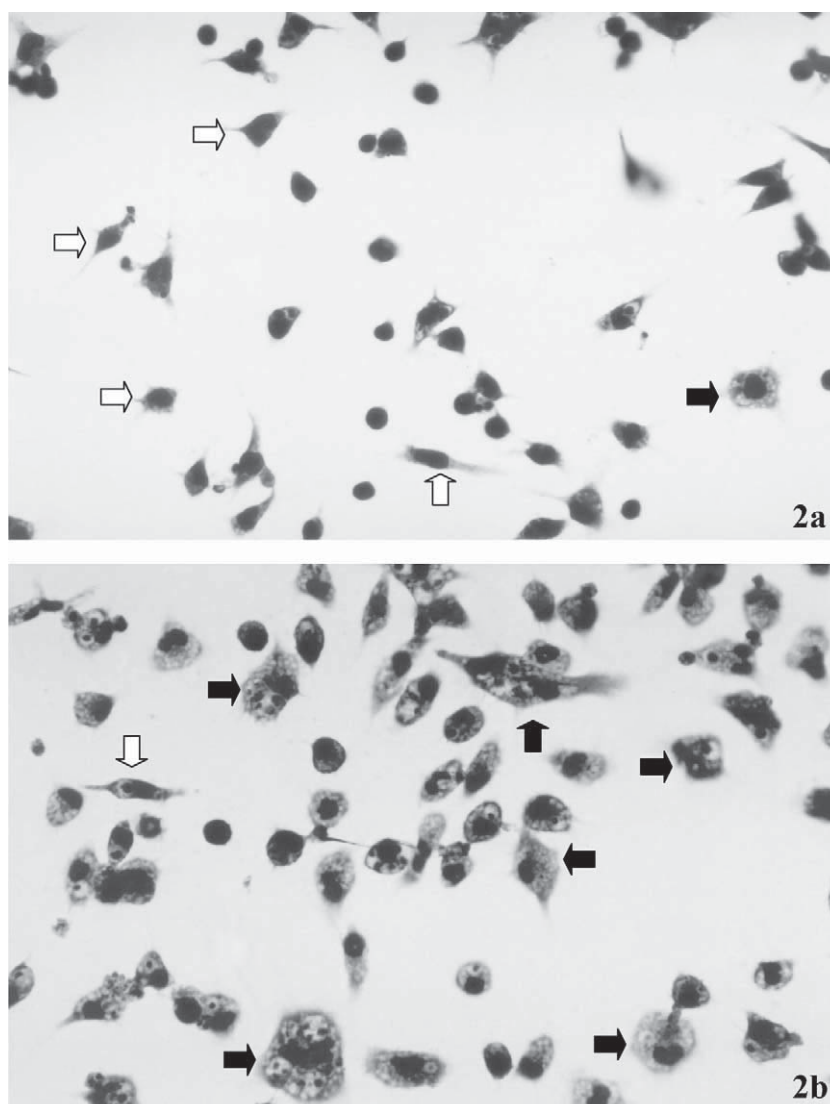


Fig. 2. Representative images from peritoneal macrophages on *in vitro* exposure to ARAGAL. (a) Control group and (b) ARAGAL treated group—300  $\mu\text{g/ml}$ —48 h, which show the general distribution of resident (opened arrow) and activated macrophages (closed arrow). Original magnification:  $\times 400$  (a, b).

PEC were collected, processed as already described and plated on tissue culture plates (96-wells). For measurement of  $\text{O}_2^-$ , adherent macrophages ( $5 \times 10^5$  cells/well) were incubated in HBSS standard reaction mixture consisting of HBSS containing ferricytochrome c (80  $\mu\text{M}$ ) in the presence or absence of PMA (1  $\mu\text{g/ml}$ ). Absorbance was measured at 550 nm and the extinction molar coefficient  $\epsilon = 2.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  was used to determine reduced cytochrome c [38]. Results are expressed as nmol  $\text{O}_2^-$  produced per mg cell protein.

#### 2.10. Nitric oxide (NO) production

Mice received a single intraperitoneal dose of ARAGAL solution (200 mg/kg). Seven days later, PEC were collected, processed as already described and plated (96-

wells). For measurements of NO production, adherent macrophages ( $5 \times 10^5$  cells/well) were incubated in the presence or absence of LPS (50 ng/ml) with IFN- $\gamma$  (26 U/ml). After 24 h, NO production was determined by measuring the nitrite in the culture medium, using the Griess reagent [39]. Absorbance was measured at 550 nm using a microplate reader (BIO-RAD). Nitrite concentration was calculated from a  $\text{NaNO}_2$  standard curve (10–80  $\mu\text{M}$ ). The Griess reagent was prepared by mixing one part of 0.1% naphthylethylene diamine dihydrochloride in twice distilled water with one part of 1% sulfanilamide in 5% concentrated  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . For control of eventual LPS contamination of ARAGAL, macrophages were incubated with ARAGAL (150 and 300  $\mu\text{g/ml}$ ), which was previously treated with polymyxin B (50  $\mu\text{g/ml}$ ) for 1 h before being used, according



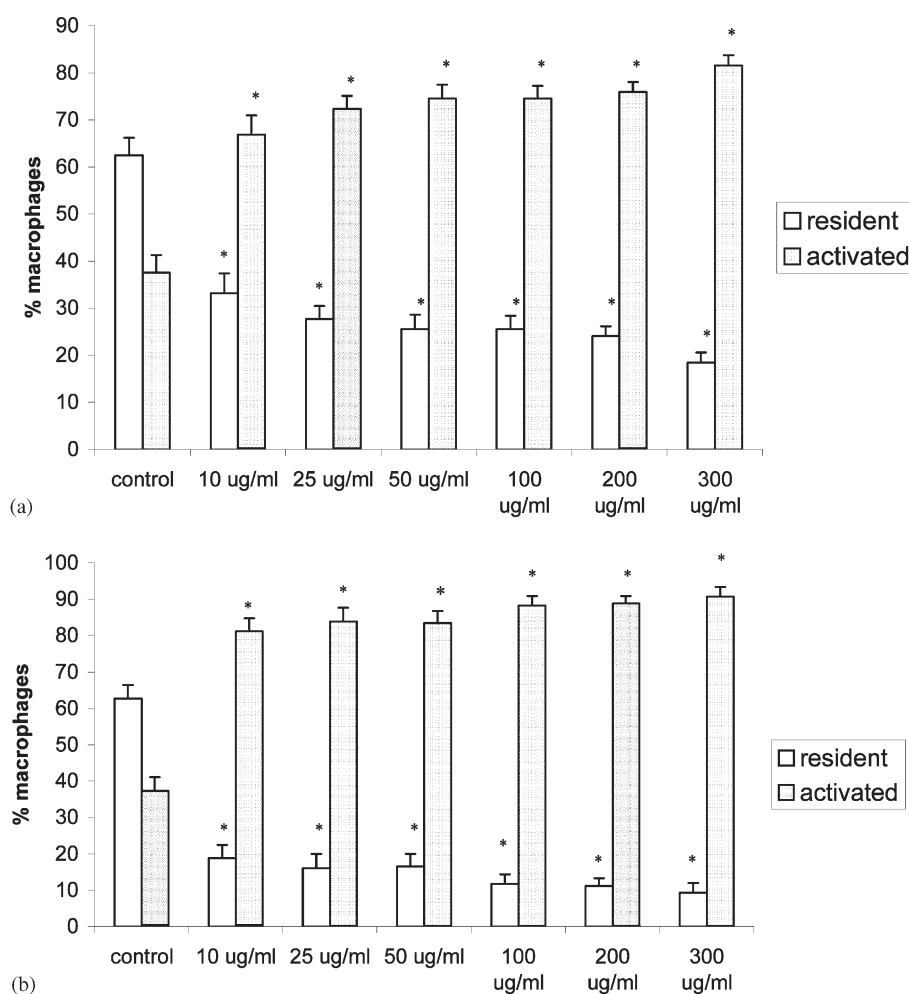


Fig. 3. Distribution of resident and activated macrophages after *in vitro* treatment with ARAGAL. Adherent macrophages were incubated in the standard MEM medium in the absence (control) or presence of ARAGAL (10–300  $\mu\text{g/ml}$ ) for 24 (a) and 48 h (b). Some 100% corresponds to the total of macrophages (residents and activated) counted in each group. (\*) Significant difference from the control group by Tukey test ( $P < 0.05$ ).

to the described by Ramammorthy et al. [40]. Polymyxin is recognized as a LPS neutralizing agent, interacting with lipid A, the active moiety of LPS [41].

#### 2.11. Protein determination

Protein was determined by the Bradford method [42] and also according to those described elsewhere [9,43].

#### 2.12. Statistic analyses

Results are expressed as means  $\pm$  S.D. Normality and homogeneity data were analyzed by analysis of variance (ANOVA). Tukey's test was used to determine the statistical significance ( $*P < 0.05\%$ ).

### 3. Results

#### 3.1. Morphological analyses of macrophages treated *in vitro* with ARAGAL solution

Fig. 2 shows representative images of the general distribution of resident and activated macrophages in control (Fig. 2a) and ARAGAL-treated group (Fig. 2b). Cells from the control group were mainly resident macrophages (opened arrow) and few activated macrophages were also present. However, in the ARAGAL-treated group the activated macrophages (closed arrow) were greater in number. Resident macrophages had small and dark nuclei, few cytoplasmic projections and showed poor spreading. Activated macrophages contained increased cytoplasm, bright and large nuclei, various cytoplasmic projections and a spreading ability [44,45].

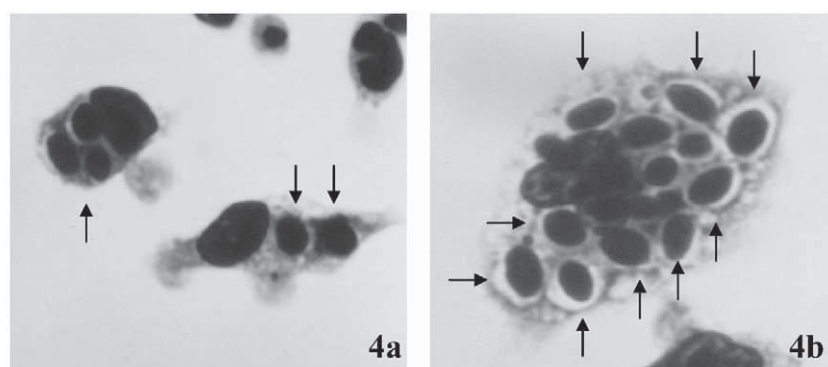


Fig. 4. Representative phagocytic activity of ARAGAL *in vitro* treated macrophages. Macrophages were cultivated in the absence (control) (a) or presence of ARAGAL for 24 h (b), after which the medium was removed and yeasts (1:10) were added following incubation for 30 min. Arrows point the yeasts phagocytosed by macrophages. Original magnification:  $\times 1000$ .

Fig. 3 shows quantitative data of the general distribution of activated and resident macrophages in the absence (control) or presence of different concentrations of ARAGAL for 24 (Fig. 3a) and 48 h (Fig. 3b). In the control group, there was  $\sim 37\%$  of activated macrophages, although in the ARAGAL-treated group the occurrence of activated macrophages was greater. ARAGAL increased the percentage of activated cells in a time and dose-dependent pattern, since  $\sim 82\%$  of cells were activated after 24 h in the presence of  $300 \mu\text{g/ml}$  of ARAGAL and  $\sim 91\%$  after 48 h incubation at this same polysaccharide concentration. It should be emphasized that under these experimental conditions, ARAGAL did not interfere in cell viability, as evaluated by the MTT assay (data not shown).

### 3.2. Endocytic index (EI)

The measurement of phagocytic activity as EI is an useful tool for the assessment of macrophage function [6].

Fig. 4(a) shows representative image of phagocytic activity for control experiments at different incubation times, in comparison to those exhibited for ARAGAL-treated macrophages (Fig. 4b). Quantitative data are shown in Table 1. It can be observed that  $25 \mu\text{g/ml}$

ARAGAL was sufficient to impose maximum phagocytic ability. At higher doses (50 and  $100 \mu\text{g/ml}$ ), the time interval to achieve significant effects was less.

### 3.3. Morphological analyses of macrophages from ARAGAL-treated mice

In order to evaluate if ARAGAL could activate macrophages following its *in vivo* i.p. administration, PEC from ARAGAL treated mice were examined according to the morphological characteristics of resident and activated macrophages. Fig. 5 compares macrophages obtained from untreated mice (Fig. 5a) with those from ARAGAL treated mice (Fig. 5b). All macrophage preparations from treated mice showed activated cells in a higher amount than in the control group. Quantitative data can be seen in Fig. 6, where in the control group 66% were resident cells and 34% were activated cells. In contrast, in ARAGAL-treated groups, the occurrence of activated macrophages was predominant, the percentage of activated cells showing a dose-dependent pattern, being  $\sim 60$  and  $\sim 75\%$  for treatments with 100 and 250 or  $500 \text{ mg/kg}$  of ARAGAL, respectively.

Table 1  
Effect of ARAGAL on EI

	Time					
	15 min	30 min	45 min	60 min	90 min	120 min
Control	1.57	2.55	4.04	4.08	4.90	4.16
ARAGAL $25 \mu\text{g/ml}$	2.25	3.61	5.22	5.81*	6.60*	6.61*
ARAGAL $50 \mu\text{g/ml}$	2.26	4.23*	5.67*	5.82*	7.00*	6.70*
ARAGAL $100 \mu\text{g/ml}$	2.19	4.01*	5.47*	6.41*	6.80*	6.60*

Adherent macrophages were incubated with ARAGAL (25, 50 and  $100 \mu\text{g/ml}$ ) for 24 h, the yeasts were then added (one macrophage to ten yeasts) allowing interaction during 15–120 min.

\* Significant difference from the control group by Tukey test ( $P < 0.05$ ).

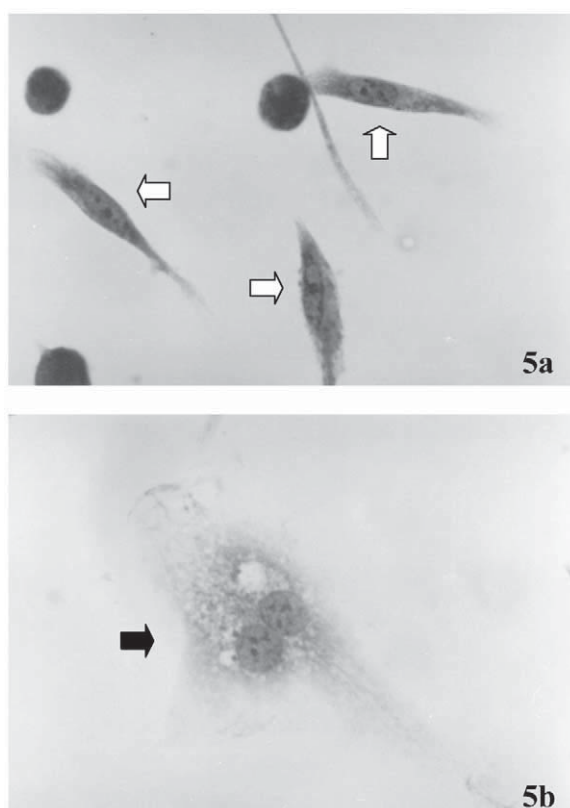


Fig. 5. Morphological characteristics of macrophages from ARAGAL-treated mice. Control group (a) shows details of morphological characteristics for resident macrophages (opened arrow), which are predominant in this group. Resident cells have small and dark nuclei, few cytoplasmic projections and poor spreading. (b) Corresponds to ARAGAL treated mice, at 100 mg/kg and show morphological characteristics of activated macrophages (closed arrow), which were mainly found in the treated group, giving increased cytoplasm, bright and large nuclei, various cytoplasmic projections, and spreading ability. Original magnification:  $\times 1000$ .

### 3.4. Superoxide anion ( $O_2^-$ ) production

The effect of ARAGAL on  $O_2^-$  production by peritoneal macrophages is shown in Fig. 7. In such experiments, the animals were inoculated with 100 or 200 mg/kg of the polymer and cells were collected 7 days later. Since PMA is able to induce  $O_2^-$  production by macrophages [46,47], these experiments were performed in the absence of PMA or in its presence. Under the former condition (Fig. 7a), macrophages from ARAGAL-treated animals were activated, since  $O_2^-$  production after 45 min was  $\sim 70\%$  greater than macrophages from untreated mice. On triggering with PMA, cells from untreated mice increased their  $O_2^-$  production as expected and it can be observed that macrophages from treated mice also responded to PMA, but the effect after 45 min was  $\sim 48\%$  higher than that of the control (untreated mice). Fig. 7(b) shows that the  $O_2^-$  production by macrophages from mice inoculated with 100 mg/kg was  $\sim 13$  nmol/mg cell protein and with 200 mg/kg of ARAGAL was  $\sim 25$  nmol/mg cell protein, suggesting a dose-dependent effect.

### 3.5. Nitric oxide production

Nitric oxide (NO) is a molecule secreted by macrophages in response to  $IFN-\gamma$  stimulation [48]. In the induction of NO synthase, LPS is recognized as a co-signal [49]. NO production by macrophages from ARAGAL-treated mice (200 mg/kg) was evaluated in the presence or absence of LPS (50 ng/ml) and  $IFN-\gamma$  (26 U/ml). Under such experimental conditions, ARAGAL did not exert any effect on NO production and in addition ARAGAL did not interfere in NO production following *in vitro* exposure of macrophages from untreated animals (data not shown). This is an impor-

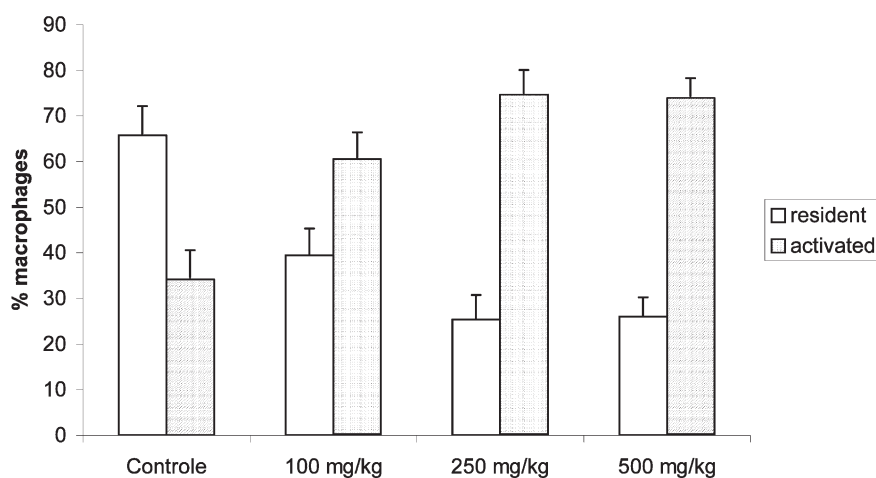


Fig. 6. Percentage of resident and activated macrophages of *in vivo*-treated mice with different doses of ARAGAL. They were injected intraperitoneally with 100, 250 and 500 mg/kg of polysaccharide. After 7 days, peritoneal cells were harvested, plated in 24-wells plates containing glass coverslips, cultivated for 24 h and processed by optical microscopy. The control group was inoculated with sterile PBS. The number of activated and resident macrophages was counted in all groups. (\*) Significant difference from the control group by Tukey test ( $P < 0.05$ ).



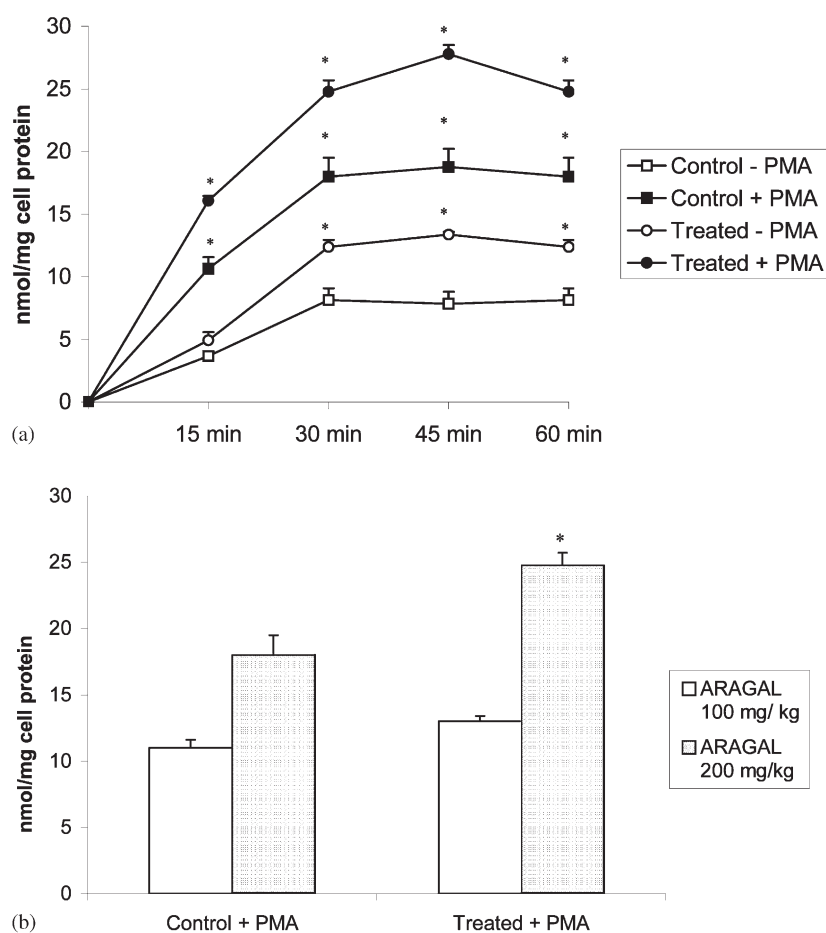


Fig. 7. Time course of O<sub>2</sub><sup>-</sup> production by peritoneal macrophages from ARAGAL (200 mg/kg) treated mice. (a) Mice were i.p. inoculated with 200 mg/kg of ARAGAL. Seven days later, adherent macrophages were incubated in a standard reaction mixture consisting of HBSS containing ferricytochrome c (80 μM) in the presence or absence of PMA (1 μg/ml). At indicated intervals the absorbance were measured at 550 nm. (b) Animals were i.p. inoculated with the indicated concentration of ARAGAL. Seven days later, adherent macrophages were incubated with the same standard reaction mixture and after 60 min the absorbance were measured at 550 nm. Results are expressed as nmol O<sub>2</sub><sup>-</sup>/mg of cell protein. Values are mean ± S.D. (n = 3). (\*) Significantly difference from the control group by Tukey test (P < 0.05).

tant result since it is quite different from those of LPS and peptidoglycan (PG), whose stimulatory effects on NO production are recognized [49,50].

#### 4. Discussion

Macrophages have different cellular morphologies and functional states that vary considerably. As they pass from resident to activated cells, they enhance proliferation, modify their cell morphology and acquire properties such as spreading ability, phagocytosis, and reactive species production (O<sub>2</sub><sup>-</sup> and NO), besides cytokine production, which results in the enhancement of bactericidal potency against a wide variety of microorganisms and lethal effects against tumor cells [51]. Enhancement of the uptake of glucose and oxygen, which is associated with O<sub>2</sub><sup>-</sup> production and stimulation of specific protein secretion, are therefore associated with the macrophage activation process [52,53].

The results shown herein give rise to experimental evidence that ARAGAL, a structurally complex arabinogalactan isolated from the gum exudate of *Anadenanthera colubrina*, can be classified as a BRM, thus leading to a macrophage activation process. ARAGAL promoted cell activation both *in vitro* and following *in vivo* treatment (Figs. 2, 3, 5 and 6). It had significant effects on various macrophage functions, namely the enhancement of *in vitro* phagocytic activity (Fig. 4 and Table 1) and the stimulus of O<sub>2</sub><sup>-</sup> production after its *in vivo* exposure to mice (Fig. 7).

ARAGAL promoted several morphological alterations in macrophages, compatible with the cell activation irrespective to whether its administration was *in vivo* or following *in vitro* exposure. This can be deduced from the cell hypertrophy, vacuolation and the high number of ingested yeast particles, besides cytoplasmic granulation. The occurrence of activated cells reached the expressive proportion of ~75% after treatment with 200 or 500 mg/kg. Such findings have

also been described for a commercial preparation of a  $\beta$ -glucan designated as EcoActiva™ [54]. Interestingly, in spite of our concentrations of ARAGAL being considered as high, they nevertheless also demonstrate a low toxicity to animals, since not one died during the course of the experimentation. Low toxicity has also been demonstrated with another arabinogalactan from *Larix occidentalis*, which with the same doses also did not give rise to evidence for hepatic damage or alteration [25].

The endocytic index, now measured at different intervals during the internalization of yeasts, showed that the *in vitro* ARAGAL-treated macrophages were efficient phagocytes. The endocytic index obtained with ARAGAL was  $\sim 35$ – $66\%$  higher than that of the control, therefore giving a better result when compared with those observed for a weakly acidic arabinogalactan and pectic polysaccharides extracted from the intact plant and callus of *Silene vulgaris*, which gave a phagocytic index of 7– $17\%$  higher than that of the control [55]. In comparison with the galactomannan from *Trigonella foenum-graecum* L. (fenugreek), ARAGAL also had a better performance since the fenugreek polymer gave an endocytic index of  $\sim 8$ – $40\%$  [6]. Phagocytosis represents the final and most indispensable step of the immunological defense system [56]. Since phagocytes act as regulatory and effector cells in the immune system, an enhancement of the phagocyte function suggests an application for therapy of microbial infections and cancer [55].

Various polysaccharides, all described as BRM, have been tested in terms of their ability to trigger  $O_2^-$  and NO production by macrophages [40,57–61]. In the absence of PMA, macrophages from ARAGAL-treated animals were now shown to be activated, since during the time course of  $O_2^-$  production, starting from 30 min, this parameter was greater than that of macrophages from untreated mice. Macrophages from treated mice also responded to PMA, the effect being evident starting from 15 min (Fig. 7a). In addition, this effect was dose-dependent as can be seen in Fig. 7(b). The effects of ARAGAL on  $O_2^-$  production in the absence or presence of PMA, were dose and time-progressive increases in anion superoxide production by macrophages from ARAGAL-treated mice.

In relation to the respiratory burst, it is of interest that pre-incubation of macrophages with a low concentration of EcoActiva™, a commercial  $\beta$ -glucan preparation, for either 1 or 3 h, resulted in a significant increase in the subsequent respiratory burst induced by PMA [53].

ARAGAL also showed a similar behavior when compared with unsonicated zymosan [56] and unsonicated yeast glucan, which stimulated superoxide anion production by macrophages [57]. However, ARAGAL promoted effects that were quite different from those obtained for an  $\alpha$ -D-glucan from the lichen *Ramalina*

*celastri*, which interacted synergically with PMA [9], while with ARAGAL the effect seems to be cumulative with this agent. The effects of ARAGAL on  $O_2^-$  production were also different when compared with other types of polysaccharides that had inhibitory effects on the respiratory burst. An example is a lichen galactomannan and its complex with vanadium [43]. As distinct from LPS, ARAGAL had no effect on NO production, also not interfering with this pathway in the presence of LPS plus interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ). This therefore indicates a clear difference in signal transduction between ARAGAL and LPS including effects arising from mitogen activated protein kinases (MAPK), from stress-activated protein kinase (SAPK) and from c Jun NH<sub>2</sub> terminal kinase (JNK), all of which are strongly activated by LPS [62]. The results of the present study also appear to exclude ARAGAL interactions with LPS-binding protein and at least in part with CD14, which are involved in effects of LPS on macrophages [63–65]. This would be expected since ARAGAL is a strongly hydrophilic polymer, while LPS has a lipid chain that is recognized by LPS-binding proteins and CD14 [64]. Such lipid chains, together with negatively charged moieties, confer an amphiphilic pattern to LPS allowing an interaction with MD-2, a peptide fragment of a Toll-receptor accessory protein [65]. Nevertheless, a multimeric model has been proposed for the CD14 receptor [66], so that the possibility of the ARAGAL interaction with a domain other than that involved in LPS-binding cannot be ruled out.

Currently, we have no knowledge concerning the mechanism by which ARAGAL exerts its effects. An engaged receptor in the stimulus of phagocytic activity and superoxide anion production, besides production of interleukins, tumor necrosis factor (TNF), leukotrienes and prostaglandins, is the complement type three receptor, CR3 (CD11b, CD18). This is thought to be the receptor for  $\beta$ -glucans [67–69] and has been implicated in the stimulatory action promoted by a pectic polysaccharide [70,71], which is a structurally distinct polymer from the  $\beta$ -glucan.

Besides not interfering with NO production, the effects on the immune system of the polysaccharide ARAGAL, a structurally complex plant arabinogalactan, strongly suggest that it can be classified as a BRM. The activity of ARAGAL in increasing the percentage of activated macrophages *in vitro* (Figs. 2 and 3) and *in vivo* (Figs. 5 and 6) is in accord with the increase in superoxide anion production and phagocytic activity by macrophages from ARAGAL-treated mice.

*Anadenanthera colubrina* arabinogalactan has structural aspects in common with the larch arabinogalactan (*Larix occidentalis*), for which an effect on the immune system has also been described. The latter seems to enhance NK cytotoxicity [24] and has properties that make it suitable as a carrier for the delivery of diagnostic

or therapeutic agents to hepatocytes via the asialoglycoprotein receptor [25]. An interesting application for ARAGAL would be to see if this molecule could have similar activities. Studies arrived at identifying the secreted interleukins, as well as any possible antitumor activity induced by ARAGAL are currently being carried out in our laboratory.

### Acknowledgements

We thank the Brazilian agencies CAPES, FINEP (PRONEX-CARBOIDRATOS) and Conselho Nacional de Desenvolvimento e Tecnológico (CNPq) for financial support. The authors thank Dr Edith Fanta for use of her Olympus BHS microscope.

### References

- [1] E.R. Unanue, in: W.E. Paul (Ed.), *Fundamental Immunology: Macrophages, Antigen-Presenting Cells, and the Phenomena of Antigen Handling and Presentation* (Ser. Mol. Cell. Biol.), Raven Press, New York, 1989, pp. 95–115 (Ser. Mol. Cell. Biol).
- [2] C. Sunderkotter, K. Steinbrink, M. Goebeler, R. Bhardwaj, C. Sorg, *J. Leukoc. Biol.* 55 (1994) 410–422.
- [3] L.A. DiPietro, *Shock* 4 (1995) 233–240.
- [4] F. Morel, J. Doussiere, P.V. Vignais, *Eur. J. Biochem.* 201 (1991) 523–546.
- [5] C.J. Nathan, B.A. Arrick, H.W. Murray, N.M. De Santis, Z.A. Cohn, *J. Exp. Med.* 153 (1980) 766–782.
- [6] H.P. Ramesh, K. Yamaki, T. Tshuida, *Carbohydr. Polym.* 50 (2002) 79–83.
- [7] M. Ballow, R. Nelson, *J. Am. Med. Assoc.* 278 (1997) 2008–2017.
- [8] S.B. Han, S.H. Park, K.H. Lee, C.W. Lee, S.H. Lee, H.C. Kim, Y.S. Kim, H.S. Lee, H.M. Kim, *Immunopharmacology* 1 (2001) 1969–1978.
- [9] P.M. Stuelp-Campelo, M.B.M. Oliveira, A.M.A.C. Leão, E.R. Carbonero, P.A.J. Gorin, M. Iacomini, *Int. Immunopharmacol.* 2 (2002) 691–698.
- [10] T. Hashimoto, N. Ohno, T. Yadomae, *Drug Dev. Res.* 42 (1997) 35–40.
- [11] S.B. Han, C.W. Lee, Y.J. Jeon, N.D. Hong, I.D. Yoo, K.H. Yang, H.M. Kim, *Immunopharmacology* 41 (1999) 157–164.
- [12] V.E. Ooi, F. Liu, *Curr. Med. Chem.* 7 (2000) 715–729.
- [13] T. Mishima, J. Murata, M. Toyoshima, H. Fujii, M. Nakajima, T. Hayashi, T. Kato, I. Saiki, *Clin. Exp. Metastas.* 16 (1998) 541–550.
- [14] N. Markova, V. Kussovski, T. Radoucheva, K. Dilova, N. Georgieva, *Int. Immunopharmacol.* 2 (2002) 1641–1645.
- [15] C.Y. Choi, J.Y. Kim, Y.S. Kim, Y.C. Chung, K.S. Hahm, H.G. Jeong, *Cancer Lett.* 166 (2001) 17–25.
- [16] S. Kitamura, T. Hori, K. Kurita, C. Hara, W. Itoh, *Carbohydr. Res.* 263 (1994) 111–121.
- [17] J.A. Bohn, J.N. Be Miller, *Carbohydr. Polym.* 28 (1995) 3–14.
- [18] T. Kiho, M. Matsushita, S. Usui, S. Ukai, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 3 (1998) 570–572.
- [19] A.M. Carneiro-Leão, D.F. Buchi, M. Iacomini, P.A.J. Gorin, M.B.M. Oliveira, *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 29 (1997) 503–509.
- [20] M.L.M. Assef, A.M. Carneiro Leão, M.P. Moretão, A.P. Azambuja, M. Iacomini, D.F. Buchi, *Braz. J. Morphol. Sci.* 19 (2002) 49–54.
- [21] J. Beuth, H.L. Ko, G. Pulverer, K. Roszkowski, G. Uhlenbruck, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 113 (1987) 51–55.
- [22] D. Egert, N. Beuscher, *Planta Med.* 58 (1992) 163–165.
- [23] R. Gonda, M. Tomoda, N. Ohara, K. Takada, *Biol. Pharm. Bull.* 16 (1993) 235–238.
- [24] J. Hauer, F.A. Anderer, *Cancer Immunol. Immunother.* 36 (1993) 237–244.
- [25] E.V. Groman, P.M. Enriquez, C. Jung, L. Josephson, *Bioconjug. Chem.* 5 (1994) 547–556.
- [26] J.H. Prescott, P. Enriquez, C. Jung, E. Menz, E.V. Groman, *Carbohydr. Res.* 278 (1995) 113–128.
- [27] P. D'Adamo, *J. Naturopath. Med.* 4 (1996) 32–39.
- [28] H. Kiyohara, J.C. Cyong, H. Yamada, *Carbohydr. Res.* 193 (1989) 193–200.
- [29] P. Odonmazig, A. Ebringerova, E. Machova, J. Alfoldi, *Carbohydr. Res.* 252 (1994) 317–324.
- [30] C.L. Delgobo, P.A.J. Gorin, C. Jones, M. Iacomini, *Phytochemistry* 47 (1998) 1207–1214.
- [31] C.L. Delgobo, P.A.J. Gorin, C.A. Tischer, M. Iacomini, *Carbohydr. Res.* 320 (1999) 167–175.
- [32] C.L. Delgobo. Polissacarídeo e oligossacarídeos presentes no exsudato de *Anadenanthera colubrina* (ANGICO BRANCO). Curitiba, 1999. Thesis (Doctorate in Biochemistry) Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- [33] D.O. Adams, *Methods Enzymol.* 58 (1979) 494–506.
- [34] M.R. Piemonte, D.F. Buchi, *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 34 (2002) 255–263.
- [35] T. Kiho, Y. Shiose, K. Nagai, S. Ukai, *Chem. Pharm. Bull.* 40 (1992) 2110–2114.
- [36] T.P. Reilly, F.H. Bellevue, P.M. Woster, C.K. Svensson, *Biochem. Pharmacol.* 55 (1998) 803–810.
- [37] D.F. Buchi, W. Souza, *Cell Struct. Funct.* 18 (1993) 399–407.
- [38] R.B. Johnston, C.A. Godzik, Z.A. Cohn, *J. Exp. Med.* 48 (1978) 115–127.
- [39] L.C. Green, D.A. Wagner, J. Glogowski, P.L. Skipper, J.S. Wishnok, S.R. Tannenbaum, *Anal. Biochem.* 126 (1982) 131–138.
- [40] L. Ramamoorthy, M.C. Kemp, I.R. Tizard, *Mol. Pharmacol.* 50 (1996) 878–884.
- [41] D.C. Morrison, D.M. Jacobs, *Immunochemistry* 13 (1976) 813–816.
- [42] M.M. Bradford, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [43] G.R. Noleto, A.L.R. Mercê, M. Iacomini, P.A.J. Gorin, V.T. Soccol, M.B.M. Oliveira, *Mol. Cell. Biochem.* 233 (2002) 73–83.
- [44] C. Burgaleta, M. Territo, S.G. Quan, D.W. Golde, *J. Reticuloendothel. Soc.* 23 (1978) 195–204.
- [45] J.A. Cleary, G.E. Kelly, A.J. Husband, *Immunol. Cell Biol.* 77 (1999) 395–403.
- [46] M.J.P. Arthur, P. Jowalski-Saunders, R. Wright, *Gastroenterology* 91 (1986) 174–181.
- [47] A.W. Segal, A. Abo, *Trends Biochem. Sci.* 18 (1993) 43–47.
- [48] M. Olivier, B.J. Romero-Gallo, C. Matte, J. Blanchette, B.I. Posner, M.J. Tremblay, R. Faure, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 13944–13949.
- [49] F.Q. Cunha, J. Assreuy, S. Moncada, F.Y. Liew, *Immunology* 79 (1993) 408–411.
- [50] J. MacMicking, Q. Xie, C. Nathan, *Ann. Ver. Immunol.* 15 (1997) 323–350.
- [51] J.M. Cavaillon, *Biomed. Pharmacother.* 48 (1994) 445–453.
- [52] D.O. Adams, T.A. Hamilton, *Ann. Rev. Immunol.* 2 (1984) 283–318.
- [53] M.E. Murphy, H. Sies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (1991) 10860–10864.
- [54] M.T. Cook, P.J. Hayball, W. Hutchinson, B. Nowak, J. Hayball, *Fish Shellfish Immunol.* 11 (2001) 661–672.

- [55] S.V. Popov, S.V.G. Yu Popova, G.Y.R.G. Ovodova, O.A. Bushneva, Y.S. Ovodov, *Int. J. Immunopharmacol.* 21 (1999) 617–624.
- [56] C.J. van Oss, *Methods Enzymol.* 132 (1986) 3–15.
- [57] G. Berton, S. Gordon, *Immunology* 49 (1983) 705–715.
- [58] J.D. Williams, N. Topley, H.M. Alobaidi, M.J. Harber, *Immunology* 58 (1986) 117–125.
- [59] S.-W. Kim, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 27 (1998) 333–337.
- [60] P.Z. Jum, C. Yuan, Z. Mei, J. Wan, *Med. Sci. Res.* 27 (1999) 299–302.
- [61] H.-M. Deuk, L.E. Sook, K.Y. Kweon, J. Woo, J. Hoon, Y.K. Há, *Korean J. Mycol.* 26 (1998) 246–255.
- [62] R. Dziarski, Y.P. Jin, D. Gupta, *J. Infect. Diseases* 174 (1996) 777–785.
- [63] S.D. Wright, R.A. Ramos, P.S. Tobias, R.J. Ulevitch, J.C. Mathison, *Science* 249 (1990) 1431–1433.
- [64] E. Hailman, H.S. Lichentein, M.M. Wurfel, D.S. Miller, D.A. Johnson, M. Kelley, L.A. Busse, M.M. Zukowski, S.D. Wright, *J. Exp. Med.* 179 (1994) 269–277.
- [65] M. Mancek, P. Pristovsek, R. Jerala, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 292 (2002) 880–895.
- [66] R.J. Ulevich, P.S. Tobias, *Ann. Rev. Immunol.* 13 (1995) 437–457.
- [67] G.D. Ross, J.A. Cain, B.L. Myones, S.L. Newman, P.J. Lachmann, *Complement* 4 (1987) 61–74.
- [68] J. Czop, *Pathol. Immunol.* 5 (1986) 286–296.
- [69] Y. Xia, V. Vetvicka, J. Yan, M. Hanikyrova, T. Mayadas, G.D. Ross, *J. Immunol.* 162 (1999) 2281–2290.
- [70] S.B. Han, Y.H. Kim, C.W. Lee, S.M. Park, H.Y. Lee, K.S. Ahn, I.-H. Kim, H.M. Kim, *Immunopharmacology* 40 (1998) 39–48.
- [71] Y.J. Jeon, H.M. Kim, *Int. Immunopharmacol.* 1 (2001) 1331–1339.



## Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages activated by an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco)

Mariana Piemonte Moretão<sup>a</sup>, Aleksander Roberto Zamprônio<sup>b</sup>, Philip A.J. Gorin<sup>a</sup>,  
Marcello Iacomini<sup>a</sup>, Maria Benigna M. Oliveira<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, CP 19046, CEP 81531-990 Curitiba, Paraná, PR, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Paraná, Paraná, PR, Brazil

Received 3 December 2003; received in revised form 16 March 2004; accepted 17 March 2004

Available online 23 April 2004

### Abstract

The immunomodulatory and anti-tumoral effects of an acidic heteropolysaccharide containing mainly galactose and arabinose (ARAGAL), isolated from the gum of the leguminous tree *Anadenanthera colubrina* (Angico branco) native to Brazil, were studied. It has been demonstrated that activation of mice peritoneal macrophages both in vivo and in vitro, increases phagocytic ability and anion superoxide production. In order to obtain further insights on the biological effects of ARAGAL, the capacity of eliciting peritoneal macrophages and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) production, and anti-tumoral effect against Sarcoma 180 (S-180), are now evaluated. Cell eliciting activity was observed in ARAGAL-treated animals in a dose dependent manner. Treatment of animals with 50, 100 or 200 mg/kg of ARAGAL increased peritoneal exudate cell (PEC) numbers by  $\sim$ 18,  $\sim$ 44 and  $\sim$ 88%, respectively. ARAGAL also increased 26-fold TNF- $\alpha$  production by peritoneal macrophages. Macrophages, treated in vitro for 18 h with ARAGAL, were able to kill Sarcoma 180 cells, as observed by their structures inside the macrophage cytoplasm. ARAGAL (100 mg/kg) showed anti-tumoral activity against S-180 in ascites or solid tumors, the tumoral inhibition being 63 and 38%, respectively. The results suggest a possible role as a BRM for ARAGAL.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Macrophage; Plant arabinogalactan; TNF- $\alpha$

### 1. Introduction

Activated macrophages have a critical role in the immune response, since they can kill microorganisms and tumor cells. The activation process includes the production of a variety of cytokines such as interleukin (IL), interferon (IFN), tumor necrosis factor (TNF), active substances such as prostaglandins [1], besides the synthesis of superoxide anion ( $O_2^-$ ) and nitric oxide (NO), which are formed respectively by NADPH oxidase and nitric oxide synthase (iNOS) [2,3].

TNF- $\alpha$  has been recognized as an important host defense molecule that affects tumor cells [4,5]. The induction of endogenous TNF has been considered a possible alternative for anti-tumor therapy since it has been shown to be an effective

method to suppress the growth of certain tumors in experimental animals [6]. TNF exerts a wide range of biological activities in addition to its direct anti-tumor activity [5], which includes enhancement of both monocyte-mediated cytotoxicity [7] and cytolytic activity of natural killer cells [8]. The mechanism of tumor tissue-selective induction of TNF may be explained by the accumulation of macrophages and polymorphonuclear leukocytes, which have the ability to produce TNF, and the local concentration of regulatory cytokines with priming activity in TNF production [5].

Immune modulatory therapy, which can be either non-specific or cell cytokine specific, can be directed to enhance the individual's own immunity to favor a particular immunological response. Some agents, which are used in such a therapy modality, have been referred to as 'biological response modifiers' (BRMs) [9] and new discoveries involving their identification have become an important research goal in biomedical science. Extensive studies undertaken on

\* Corresponding author. Tel.: +55-41-361-1664;

fax: +55-41-266-2042.

E-mail address: mbmo@ufpr.br (M.B.M. Oliveira).



polysaccharides isolated from natural sources [10,11], have attracted attention due to their potential role as BRMs, in terms of immunomodulatory and anti-tumor effects [12,13]. Polysaccharides involved as biomulators in the immune response against tumors have been known to inhibit the growth of various transplantable tumors in experimental animals [5,12,14–23]. They are considered to exert their anti-tumor activity through potentiation of the host defense system rather than a direct inhibition of tumor cell growth [24]. Studies have demonstrated anti-tumor activity of some acidic polysaccharides through macrophage activation of host cells [25–27].

A class that has been receiving attention is the arabinogalactan [28–34], which consists of heavily branched high-molecular weight polysaccharides (mw 10,000–120,000) [31]. Arabinogalactans are found in several microbial systems and many plants, mostly in a glycopeptide form, bound to threonine, proline or serine and then to a peptide chain (arabinogalactan protein (AGP)) [34]. There is much evidence that arabinogalactans can interfere in the immune response [29,31], examples being those isolated from *Echinacea purpurea*, *Baptisia tinctoria*, *Thuja occidentalis* [29], *Angelica acutiloba* [35], and *Curcuma longa* [30]. Saima et al. [27], have isolated an anti-tumor acidic polysaccharide from the fruit of *Feronia limonia* (Linn.). In addition, an acidic arabinogalactan, highly purified from plant cell cultures of *E. purpurea*, was effective in activating macrophages against tumor cells and microorganisms [34].

Pretreatment of macrophages with the arabinogalactan from western larch (*Larix occidentalis*), a polymer that has unusual immunological properties and possesses minimal toxicity so that it was approved for food use [34], induced the release of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , interleukin-1  $\beta$  (IL-1  $\beta$ ) and interleukin-6 (IL-6), but only IFN- $\gamma$  was involved in enhancement of natural killer (NK) cytotoxicity [31].

Brazilian flora are a source of interesting polysaccharides which either, in their native state or after submission to structural modifications, might have potential applications as BRMs. The leguminous tree *Anadenanthera colubrina* (Angico branco), is native to South American rain forests, starting at high altitudes in the north of Colombia and northern Brazilian States to the southern State of Paraná, where it grows at altitudes greater than 400 m and produces an arabinogalactan-rich trunk exudate. This gum is reputed to be a medication for respiratory problems [36]. It is a complex branched high-arabinose heteropolysaccharide that forms an aqueous solution of low viscosity. It contains arabinose, manose, galactose, rhamnose and hexuronic acid in a 63:1:20:6:10 molar ratio, and consists of a (1 $\rightarrow$ 3)-linked  $\beta$ -galactopyranosyl main chain substituted at O-6 by a variety of side chains [36,37], the most complex of which is depicted in Fig. 1. Previous studies from our laboratory have shown that ARAGAL (Fig. 1) has effects on the immune system of mice, increasing the percentage of activated macrophages in vitro and in vivo, anion superoxide production by macrophages from ARAGAL-treated

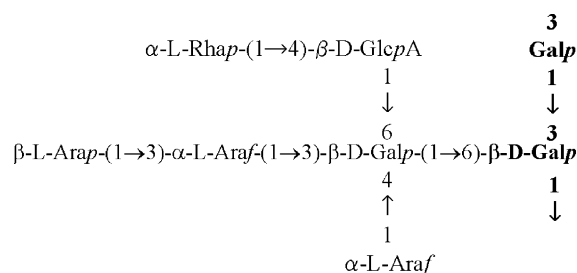


Fig. 1. ARAGAL structure. The heteropolysaccharide has a (1 $\rightarrow$ 3)-linked  $\beta$ -D-Galp main-chain (in bold) and many different side-chains, which are composed of oligosaccharide groups of two, three, five or seven units ( $\alpha$ -Araf,  $\alpha$ -Rhap and  $\beta$ -GlcpA) [37].

mice, and phagocytic activity [38]. The present study is to further investigate the effects of ARAGAL as a cell eliciting agent, the in vitro cytotoxicity against S-180 of ARAGAL pre-activated peritoneal macrophages, the in vivo anti-tumoral activity against S-180 cells, and TNF- $\alpha$  production in peritoneal fluid.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Lipopolysaccharide (LPS), *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N*-2-ethane-sulfonic acid (HEPES), (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT), were obtained from Sigma (St. Louis, MO). Eagle medium (MEM) was supplied by Flow Laboratories and fetal bovine serum was obtained from Cultiab (Campinas, Brazil). Anti-mouse TNF- $\alpha$  antibody, recombinant mouse TNF- $\alpha$ , biotinylated anti-mouse TNF- $\alpha$  antibody, rat recombinant TNF- $\alpha$ , streptavidin HRP solution, and a substrate solution were from R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN, USA). Other chemical reagents were obtained from Merck.

ARAGAL was dissolved in PBS solution, pre-filtered (paper filter TP10-INLAB), then filtered through a 0.45  $\mu$ m pore size membrane (Millipore<sup>®</sup>), and sterilized by filtration through a sterile membrane of 0.22  $\mu$ m pore size (Millipore<sup>®</sup>). ARAGAL was kindly donated by Delgobo et al. [37].

The polymer has been eluted as a homogeneous single peak from a Sepharose CL-4B column, the apparent molecular mass being  $1.6 \times 10^6$  Da. It contains ions ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  and  $\text{Na}^+$ ) [39]. Further analysis of ARAGAL by HPSEC-MALLS showed a homogeneous peak with a "shoulder" composed of a related structure. For control of eventual LPS contamination of ARAGAL, this polymer was incubated with polymyxin B (50  $\mu$ g/ml) for 1 h before use, according to the description of Ramamoorthy et al. [40]. Polymyxin is recognized as a LPS neutralizing agent, interacting with lipid A, the active moiety of LPS [41] and no alteration of results was observed by the pretreatment of ARAGAL by polymyxin.

## 2.2. Animals

Male albino Swiss mice (6–8-week-old) were used. They were housed at  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  under a 12:12 h light–dark cycle (lights on at 07:00 a.m.) and had free access to a standard laboratory diet (Purine®) and water ad libidum. All recommendations of the Brazilian National Law (no. 6.638,05 November 1979) for scientific management of animals were respected.

## 2.3. Peritoneal exudate cell (PEC) preparation

Peritoneal exudate cell preparation was obtained essentially as described elsewhere [38]. Briefly, PEC from mice were collected by infusing their peritoneal cavity with 10 ml of ice-cold sterile PBS. The animals were submitted to a vigorous massage of the peritoneal area, prior to collection of the cells. After centrifugation at  $1080 \times g$  for 6 min, the cell pellet was washed twice with cold sterile PBS and then resuspended in the same solution. The cells were counted using a Neubauer hemocytometer, and were plated so as to adhere on to a tissue culture plate. After 30 min at  $37^\circ\text{C}$  under a 5%  $\text{CO}_2$  atm, the cells were washed twice with warm sterile PBS to remove non-adherent cells. Adherent macrophages were then incubated in a standard medium consisting of MEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 50  $\mu\text{g/ml}$  penicillin and 100 U/ml gentamicin. Accordingly, >90% of adherent cells were macrophages [42,43] and the preparation was not further purified.

## 2.4. PEC eliciting activity

Mice of the treated group received a single intraperitoneal (i.p.) dose of ARAGAL (50–200 mg/kg). In the control group, animals were inoculated with sterile PBS, each group being composed of four animals. After 24 h, the mice were killed by ether anesthesia and the peritoneal exudate cells were harvested. After centrifugation at  $1080 \times g$  for 6 min, the cell pellet was washed twice with cold PBS and then resuspended in the same solution. The number of macrophages in the intraperitoneal fluid from animals of each group was counted using a Neubauer hemocytometer.

## 2.5. Sarcoma 180 (S-180) cells

Sarcoma 180 cells (ATCC) were maintained in the ascite form in male Swiss mice by weekly passage.

## 2.6. Trypan blue assay for S-180 cell viability

S-180 cells were plated on to a tissue culture plate (24 wells) and incubated in a standard medium at  $37^\circ\text{C}$  under a 5%  $\text{CO}_2$  atm for 1 h in the presence of ARAGAL (10–300  $\mu\text{g/ml}$ ). Cell viability was then evaluated by the trypan blue method [44].

## 2.7. In vitro Interaction of ARAGAL-treated macrophages with S-180 cells

Adherent macrophages on cover slips contained in a tissue culture plate of 24-wells ( $5 \times 10^5$  cells per well) were incubated in the standard medium in the presence or absence of ARAGAL (10–200  $\mu\text{g/ml}$ ). After 24 h at  $37^\circ\text{C}$  under 5%  $\text{CO}_2$ , the cover slips were washed twice with PBS pH 7.4 and incubated in MEM standard medium in the presence of S-180 cells ( $10^4$  cells per well) for 18 h. The cells were then fixed for 5 min in Bouin's fixative, stained with Giemsa for 2 h, dehydrated in acetone, and the slides then mounted with Entelan and observed using an Olympus BHS microscope.

## 2.8. In vivo ARAGAL activity against Sarcoma-180

S-180 cells ( $10^5$  cells per animal) were i.p. inoculated in mice on day zero. From days 1 to 3, the animals from treated groups were i.p. inoculated with 50 or 100 mg/kg of ARAGAL, animals from control group being inoculated with sterile PBS. On day 4, the animals were killed by ether anesthesia and S-180 cells were collected from the intraperitoneal fluid. Viable S-180 cells were identified by the trypan blue method [44]. The tumor inhibition ratio was calculated as inhibition ratio (%) =  $100(A - B)/A$ , where "A" is the number of S-180 cells of the control group, and "B" is the number of S-180 cells of the treated group [23,27]. Alternatively, S-180 cells ( $10^5$  cells per animal) were subcutaneously implanted in the inter-scapular region of mice. The animals were then intraperitoneally treated with a single dose of ARAGAL (100 mg/kg) 24 h after cell implantation, the control group being inoculated with sterile PBS. All mice were kept under observation for 21 days and then killed using ether anesthesia. Tumors were excised and their weights were determined. Inhibition of tumor growth was determined as previously described [45,46], and the inhibition ratio calculated as (%) =  $100(A - B)/A$ , where "A" is the average weight of the tumors from the control animals, and "B" is the average weight of the tumors from the treated animals.

## 2.9. TNF- $\alpha$ quantification

The animals from the treated group were inoculated with 100 mg/kg i.p. of ARAGAL. For comparison, mice inoculated with sterile PBS (control group) or 50  $\mu\text{g/kg}$  LPS (positive control) were also examined. One hour after inoculation, animals were killed by ether anesthesia and the PEC for each individual animal was collected by infusing its peritoneal cavity with 2 ml of ice-cold sterile PBS. After centrifugation at  $1080 \times g$  for 6 min, the cell pellet was discarded and the supernatant peritoneal fluid was maintained at  $-70^\circ\text{C}$  until utilization.

TNF- $\alpha$  levels in the peritoneal fluid were assayed by enzyme immunoassay (ELISA) (R&D Systems), as specified by the manufacturers. Briefly, plates (96 wells) were coated with 100  $\mu\text{l}$  of purified anti-mouse TNF- $\alpha$  antibody

(1  $\mu\text{g/ml}$ ) and incubated overnight at 25 °C. On the next day, PBS containing 1% BSA, 5% sucrose and 0.05%  $\text{NaN}_3$  was added to each well for 1 h and after three washes, the recombinant murine TNF- $\alpha$  standard (31.2–2000  $\text{pg/ml}$ ) and samples (diluted 1:2) were added to the wells following overnight incubation at 25 °C. After this period, 100  $\mu\text{l}$  per well of the biotinylated anti-mouse TNF- $\alpha$  (50  $\text{ng/ml}$ ) were added. The plates were then incubated for 2 h at room temperature. After removing the unbound antibody–enzyme reagent, 100  $\mu\text{l}$  of streptavidin HRP solution was added to the wells following incubation for 20 min and then 100  $\mu\text{l}$  of the substrate solution containing hydrogen peroxide and tetramethylbenzidine was added to the wells for color development. The enzyme reaction gave rise to a blue product that turned yellow when 50  $\mu\text{l}$  of the stop solution (1 M sulfuric acid) was added after 25 min to each well. The optical density was measured using a microplate reader (Sunrise Touchscreen, TECAN, Carbsteim, Germany, a generous gift from Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD)) at 450 nm of each well.

### 2.10. Statistical analysis

Statistical analysis of the *in vivo* experiment designed to detect the inhibition of solid S-180 growth was carried out using the Student's *t*-test. Mean  $\pm$  S.E.M. values were used, and significance was defined as  $P < 0.05$ .

The data obtained under others experimental conditions were submitted to analysis of variance (ANOVA) and the Tukey test for average comparison. Mean  $\pm$  S.D. values were used and significance was again defined as  $P < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. PEC eliciting activity

In order to check whether ARAGAL could be interfering in the PEC count, it was injected *i.p.* (50, 100 or 200  $\text{mg/kg}$ )

and the total number of PEC was determined 24 h after injection. The animals from the control group were injected with sterile PBS. Fig. 2 shows a dose-dependent effect of ARAGAL, which was efficient as an elicitor. In the presence of the polysaccharide, the cell number was  $\sim 18$ , 44 and 88% higher than that of the control group 24 h after its administration at 50, 100 and 200  $\text{mg/kg}$ , respectively.

### 3.2. Interaction of ARAGAL-treated macrophages with S-180 cells

ARAGAL has been recognized as activating macrophage, promoting an increase both the ability of production of  $\text{O}_2^-$  and phagocytosis, these effects having been detected following the *in vitro* or *in vivo* treatments [38]. Fig. 3 shows that following *in vitro* treatment of macrophages, these were able to kill S-180 tumor cells. Fig. 3a shows a representative image of the control. The general distribution of macrophages treated with different concentrations of ARAGAL for 24 h and incubated with S-180 cells for 18 h, is shown in Fig. 3b and c. Resident macrophages had small and dark nuclei, few cytoplasmic projections and showed poor spreading. Activated macrophages contained increased cytoplasm, bright and large nuclei and various cytoplasmic projections, and a spreading ability [47].

In the control group (Fig. 3a) resident macrophages (open arrow) and activated macrophages (closed arrow) can be observed. However, in the ARAGAL-treated groups the activated macrophages (closed arrow) had some structures of S-180 cells in the vacuole inside the cytoplasm (asterisk) (Fig. 3b and c). These results prompted us to evaluate the effect of ARAGAL on animals bearing S-180 cells. Animals with the ascitic form of S-180 ( $10^5$  cells per animal) were therefore treated *i.p.* with 50 or 100  $\text{mg/kg}$  of ARAGAL for 3 days. On day 4, the animals were killed, PEC was collected and viable S-180 cells were counted. The results, in Fig. 4 show that 50 and 100  $\text{mg/kg}$  of ARAGAL led to a growth inhibition of viable S-180 cells of  $\sim 33$  and 63% respectively.

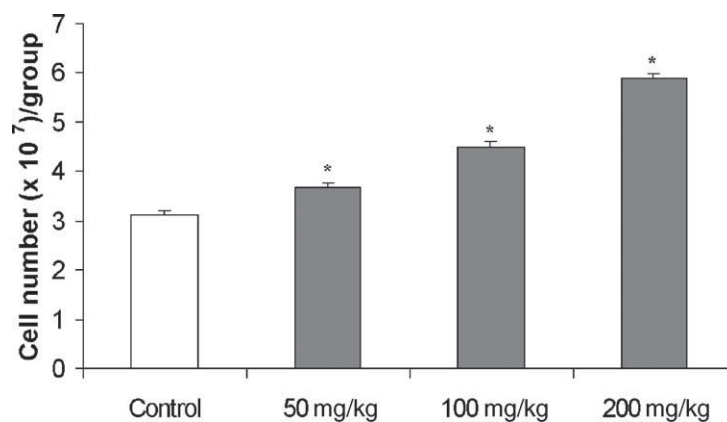


Fig. 2. Number of macrophages following intraperitoneal administration of ARAGAL. Mice ( $n = 4$ , for each group) were *i.p.* injected with 50, 100 or 200  $\text{mg/kg}$  of ARAGAL (■), or with sterile PBS (control group) (□). PECs were collected 24 h after inoculation. Cells in the intraperitoneal fluid from animals of each group were counted using a Neubauer hemocytometer and the results are expressed as mean  $\pm$  S.D. (\*) Significant difference from the control group by the Tukey test ( $P < 0.05$ ).



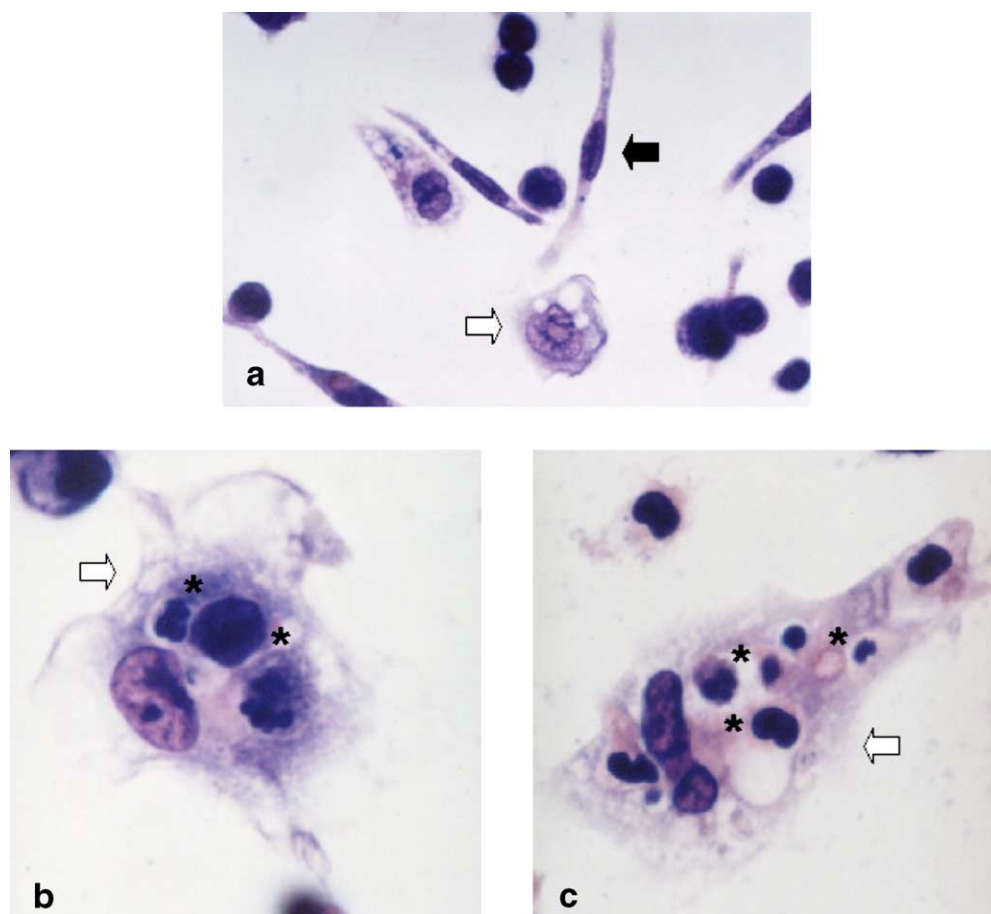


Fig. 3. Macrophages ( $5 \times 10^5$  cells per well) were incubated in the presence or absence of ARAGAL (10–200  $\mu\text{g/ml}$ ). After 24 h at  $37^\circ\text{C}$  under 5%  $\text{CO}_2$ , S-180 cells ( $10^4$  cells per well) were added followed by incubation for 18 h. In the control group (a) are shown representative images of the general distribution of resident (opened arrow) and activated macrophages (closed arrow). In ARAGAL-treated groups (b and c), the activated macrophages (closed arrow) have some structures of S-180 cells in the vacuole inside the cytoplasm (asterisk).

In order to evaluate the effect of ARAGAL in a tumor growing in elsewhere in the animal body, S-180 ( $10^5$  cells per animal) was therefore inoculated in to the inter-scapular region and 24 h later the animals were treated i.p. with 100 mg/kg

of ARAGAL. The control group received sterile PBS. At day 21 after cell inoculation, the mice were sacrificed and their tumors were excised and weighed. Fig. 5a shows representative tumors from the control group and Fig. 5b shows

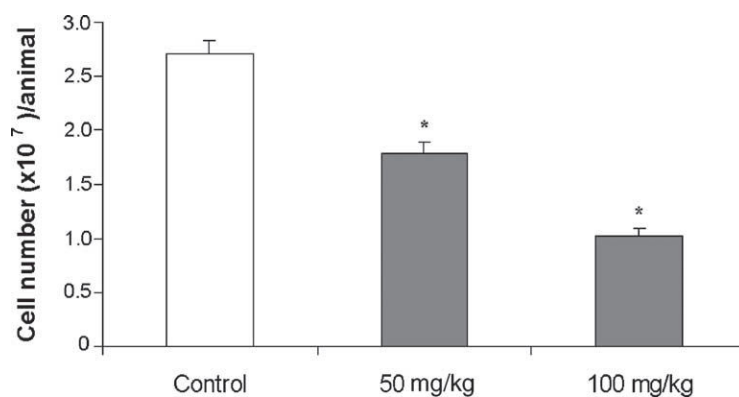


Fig. 4. Anti-tumor effect of ARAGAL following in vivo treatment. Animals were inoculated i.p. with  $10^5$  cells per mouse. The treatment started on day 1 and continued up to day 3. Animals were sacrificed on day 4; intraperitoneal S-180 cells were harvested with sterile PBS and counted using a Neubauer hemocytometer and the results are expressed as the mean  $\pm$  S.D. Viability judged by trypan blue. (\*) Significant difference from the control group by the Tukey test ( $P < 0.05$ ).

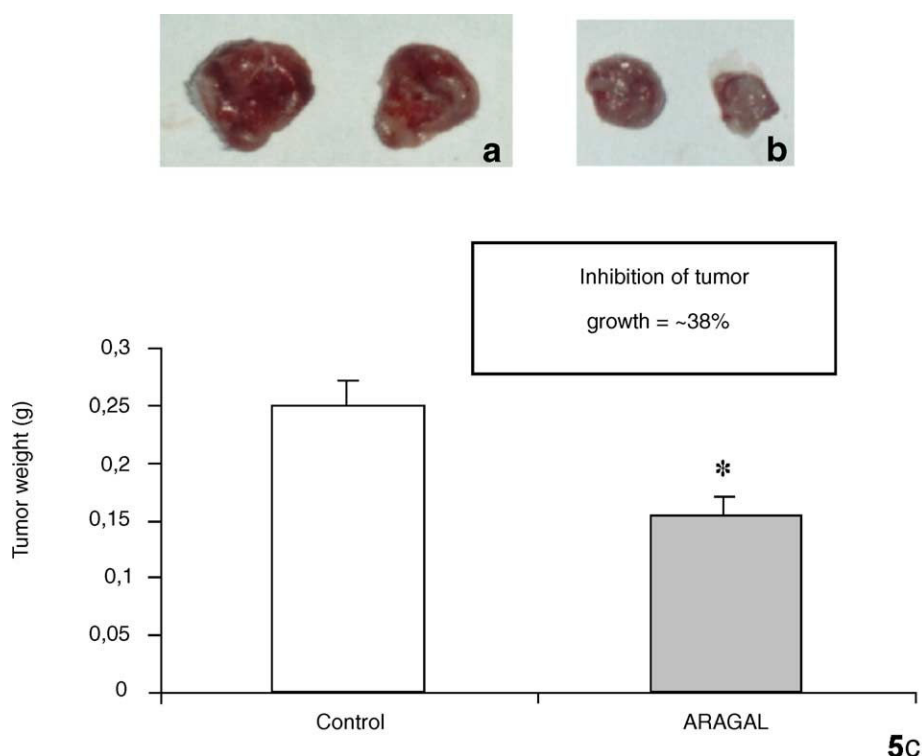


Fig. 5. Anti-tumor effect of ARAGAL following in vivo treatment. Animals were inoculated s.c. with  $10^5$  cells per mouse. The treatment with 100 mg/kg of ARAGAL was performed 24 h after tumor cells implantation. Animals were sacrificed 21 days after the cells inoculation, the tumors were excised and the weights were determined. (a) Representative tumors of control group; (b) representative tumors from ARAGAL treated group; (c) values given are the mean  $\pm$  S.E.M. (\*) Significant difference from the control group by Student's *t*-test ( $P < 0.05$ ).

representative tumors from the ARAGAL treated group. The mean weight of the tumors is shown in Fig. 5c. A growth inhibition of solid S-180 of  $\sim 38\%$  was observed when the animals were treated with 100 mg/kg of ARAGAL.

### 3.3. TNF- $\alpha$ quantification

Fig. 6 shows the production of TNF- $\alpha$  by peritoneal macrophages 1 h after ARAGAL administration (100 mg/kg,

i.p.). It can be seen that the ability of peritoneal macrophages to produce TNF- $\alpha$  was significantly increased ( $P < 0.001$ ). TNF- $\alpha$  production from the control group was  $\sim 2$  pg/ml, while that from the peritoneal fluid from ARAGAL treated animals was  $\sim 57$  pg/ml. As would be expected, a very high ( $\sim 174$  pg/ml) TNF- $\alpha$  production was detected in the peritoneal fluid from LPS-treated animals. When its production was measured in the peritoneal fluid from ARAGAL-treated animals, 24 h after administration, no TNF- $\alpha$  was detected.

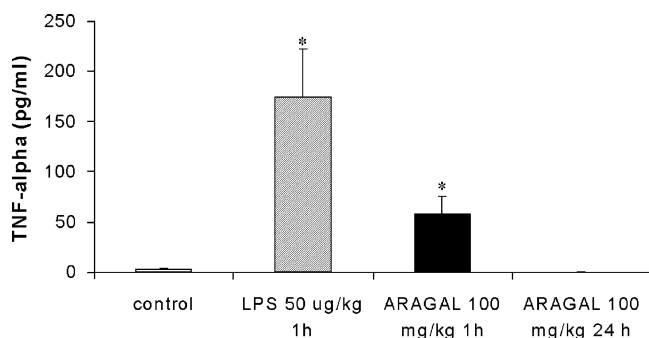


Fig. 6. TNF- $\alpha$  production by peritoneal macrophages from animals treated i.p. with 100 mg/kg of ARAGAL. TNF- $\alpha$  production was measured by ELISA, as described in Section 2, 1 h after ARAGAL i.p. administration. TNF- $\alpha$  production from the control group was  $\sim 2$  pg/ml, from ARAGAL treated animals it was  $\sim 57$  pg/ml, and from LPS treated animals it was  $\sim 174$  pg/ml. TNF- $\alpha$  production 24 h after the ARAGAL treatment was not detected.

## 4. Discussion

Polysaccharide ARAGAL, a structurally complex plant arabinogalactan isolated from the gum exudate of *A. colubrina* has been reported to have effects on the immune system, which strongly suggests that it can be classified as a BRM [38]. The results shown herein add experimental evidence that ARAGAL leads to a macrophage activation process.

When injected intraperitoneally, an ARAGAL (200 mg/kg) eliciting activity could be observed since the PEC number was 88% higher than that of the control group 24 h after administration. This has been also described for the pectic acidic polysaccharide FL-1a-I isolated from fruit of *F. limonia* (Linn.), which caused an increase of  $\sim 56\%$ , 24 h after inoculation of 100 mg/kg [27]. An  $\alpha$ -D-glucan from the lichen *Ramalina celastri* elicited 130% more macrophages

in peritoneal cavity than in a control group, 7 days after i.p. inoculation of 200 mg/kg [11]. Lentinan, a fungal polysaccharide [48] and a partially degraded polysaccharide fraction from a marine alga (*Graciliana vermicosa*), as well as a  $\beta$ -glucan of *Sclerotinia sclerotiorum* [49], have also been described as having PEC eliciting activity. The increase in the PEC number suggests that ARAGAL gives rise to an irritating action similar to that of thioglycollate. These elicited cells from ARAGAL treated animals were activated, as shown both by morphological and functional criteria [38].

Cytotoxicity against tumor cells, as well the expression of microbicidal mechanisms, are dependent on the activation of macrophages and are closely related with the pattern of expression of several inflammatory mediators [50]. The process of activation includes the generation of cytokines such as interleukins, interferons, and tumor necrosis factor, which are directly involved in macrophage-mediated tumor cell killing [51].

TNF- $\alpha$  induces lysis of malignant cells and causes regression of some animal tumors [52], so that one possible mechanism for the anti-tumoral effect of polysaccharides has been related to induction of TNF [53–58]. Now, TNF- $\alpha$  production induced by the acidic arabinogalactan ARAGAL (100 mg/kg), following treatment of animals, was increased 26-fold when compared with the control group. This is an important result considering the relation between this factor and anti-tumor activity.

It is meaningful that in vitro exposure (24 h) of macrophages to ARAGAL showed their ability to kill S-180 cells, as detected by the presence of structures from tumor cells inside the vacuole into the cytoplasm (Fig. 3). Moreover, when ARAGAL was used in an in vivo treatment, anti-tumor effects against the S-180 ascite form, was demonstrated since a recovery of viable S-180 cells was lowered by ~33 and 63%, when the animals were treated with triple dose of 50 or 100 mg/kg, respectively (Fig. 4). Such an effect allows us to classify the activity of ARAGAL, under the present experimental conditions, to be an effective anti-tumor agent in accord with the classification proposed by Mizuno et al. [23]. A similar result was found for ginsan-primed macrophages, whose enhanced tumoricidal activity against Yac-1 tumor cells was demonstrated as being 1.6-fold (~62%) higher than the control when 100  $\mu$ g/ml was used [51]. Other examples are the pectic acidic polysaccharide FL-1a-I, isolated from fruit of *F. limonia* (Linn.), which was able to promote 58–75% tumor growth inhibition of Ehrlich ascite carcinoma cells, when a triple dose of 50 or 100 mg/kg, respectively was used [27].

The experimental conditions used in present study allowed activation of macrophages in the same place where the tumoral cells were inoculated. However, in the mice-bearing solid S-180 tumor a decreased growth (~38%) was also demonstrated, when the animals were treated with a single dose of 100 mg/kg of ARAGAL (Fig. 5). A macrophage eliciting activity of ARAGAL and an induction of production of TNF- $\alpha$ , a monocyte/macrophage-derived cytokine [59] was

shown. It can therefore be concluded that these cells are the source of TNF- $\alpha$ . In addition, since ARAGAL by itself has no effect on S-180 cell viability (data not shown), it can be concluded that cell death occurs by intermediation of TNF- $\alpha$  and macrophages. Alleva et al. [60] suggested that tumors escape immunological surveillance by favoring macrophage suppressor activity and decreasing macrophage-induced cytotoxicity. It is widely recognized that TNF- $\alpha$  is cytotoxic to tumor cells [61] and attracts monocytes to the site. If so, it can be proposed that up regulation of the TNF- $\alpha$  production in macrophages by ARAGAL could contribute to an improvement of immunosuppression in the tumor-bearing state and the generation of anti-tumor effects. For this reason, some cytokines, and among them TNF- $\alpha$ , have been used for therapeutic purposes [62]. Despite that TNF- $\alpha$  was not determined in the lysed pellet, its detection following ARAGAL administration is certainly the result of synthesis and release of TNF- $\alpha$  by the macrophages and therefore consequence of the cell activation. It thus follows that a probable mechanism for the ARAGAL effect could be the activation of macrophages, which can inhibit tumor growth by a direct cytotoxic, cell-cell activity, but also by increasing the TNF- $\alpha$  concentration. An important question arising from the TNF- $\alpha$  production is its drastic side effects, since it has been described as a mediator of catabolic states such as cachexia when present at high levels [59]. However, ARAGAL is a less powerful inducer of TNF- $\alpha$  when compared with LPS (Fig. 6). ARAGAL did not demonstrate any toxicity to animals, since not one died nor showed symptoms of catabolic diseases during the course of the experiments; a low toxicity has also been found for the arabinogalactan from *L. occidentalis*, which at the same ARAGAL doses also did not evidence hepatic damage or alteration [32]. It remains to be clarified, however, if ARAGAL could modulate other known host anti-tumor immune mechanisms in vivo, such as activation of natural killer cells and tumor infiltration lymphocytes, as well as its effects on the production of cytokines such as IFN- $\gamma$  and the colony stimulating factor. Studies either with ARAGAL alone or in combination with chemotherapeutic anticancer agents could be relevant in revealing its the potential application as an anticancer immunotherapy agent.

### Acknowledgements

We thank the Brazilian agencies CAPES, FINEP and CNPq (PRONEX-CARBOIDRATOS), and the Conselho Nacional de Desenvolvimento e Tecnológico (CNPq) for financial support.

### References

- [1] Ramesh HP, Yamaki K, Tshuida T. Effect of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) galactomannan fractions on phagocytosis in rat

- macrophages and on proliferation and IgM secretion in HB4C5 cells. *Carbohydr Polym* 2002;50:79–83.
- [2] Morel F, Doussiere J, Vignais PV. The superoxide-generating oxidase of phagocytic-cells—physiological, molecular and pathological aspects. *Eur J Biochem* 1991;201:523–46.
- [3] Nathan CF, Arrick BA, Murray HW, De Santis NM, Cohn ZA. Tumor-cell anti-oxidant defenses—inhibition of the glutathione redox cycle enhances macrophage-mediated cytotoxicity. *J Exp Med* 1980;153:767–82.
- [4] Mizuno M, Shiomi Y, Minato K, Kawakami S, Ashida H, Tsuchida H. Fucogalactan isolated from *Sarcodon aspratus* elicits release of tumor necrosis factor- $\alpha$  and nitric oxide from murine macrophages. *Immunopharmacology* 2000;46:113–21.
- [5] Arinaga S, Karimine N, Takamuku K, Nanbara S, Nagamatsu M, Ueo H, Akiyoshi T. Enhanced production of interleukin 1 and tumor necrosis factor by peripheral monocytes after lentinan administration in patients with gastric carcinoma. *Int J Immunopharmacol* 1992;14:43–7.
- [6] Wong CK, Leung KN, Fung KP, Choy YM. The immunostimulating activities of anti-tumor polysaccharides from *Pseudostellaria heterophylla*. *Immunopharmacology* 1994;28:47–54.
- [7] Smith DM, Lackides GA, Epstein LB. Coordinated induction of autocrine tumor necrosis factor and interleukin 1 in normal human monocytes and the implications for monocyte-mediated cytotoxicity. *Cancer Res* 1990;44:3146–53.
- [8] Ostensen ME, Thiele DL, Lipsky PE. Tumor necrosis factor- $\alpha$  enhances cytolytic activity of human natural killer cells. *J Immunol* 1987;138:4185–91.
- [9] Ballou M, Nelson R. *Immunopharmacology: immunomodulation and immunotherapy*. JAMA 1997;278:2008–17.
- [10] Han SB, Park SH, Lee KH, Lee CW, Lee SH, Kim HC, Kim YS, Lee HS, Kim HM. Polysaccharide isolated from radix of *Platycodon grandiflorum* selectively activates B cells and macrophages but not T cells. *Immunopharmacology* 2001;1:1969–78.
- [11] Stuelp-Campelo PM, Oliveira MBM, Leão AMAC, Carbonero ER, Gorin PAJ, Iacomini M. Effect of a soluble  $\alpha$ -D-glucan from the lichenized fungus *Ramalina celastri* on macrophage activity. *Int Immunopharmacol* 2002;2:691–8.
- [12] Han SB, Lee CW, Jeon YJ, Hong ND, Yoo ID, Yang KH, Kim HM. The inhibitory effect of polysaccharides isolated from *Phellinus linteus* on tumor growth and metastasis. *Immunopharmacology* 1999;41:157–64.
- [13] Ooi VE, Liu F. Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes. *Curr Med Chem* 2000;7:715–29.
- [14] Mishima T, Murata J, Toyoshima M, Fujii H, Nakajima M, Hayashi T, Kato T, Saiki I. Inhibition of tumor invasion and metastasis by calcium spirulan (Ca-SP), a novel sulfated polysaccharide derived from a blue-green alga, *Spirulina platensis*. *Clin Exp Metastasis* 1998;16:541–50.
- [15] Markova N, Kussovski V, Radoucheva T, Dilova K, Georgieva N. Effects of intraperitoneal and intranasal application of Lentinan on cellular response in rats. *Int Immunopharmacol* 2002;2:1641–5.
- [16] Choi CY, Kim JY, Kim YS, Chung YC, Hahn KS, Jeong HG. Augmentation of macrophage functions by an aqueous extract isolated from *Platycodon grandiflorum*. *Cancer Lett* 2001;166:17–25.
- [17] Kitamura S, Hori T, Kurita K, Hara C, Itoh W. An anti-tumor, branched (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucan from a water extract of fruiting bodies of *Cryptoporus volvatus*. *Carbohydr Res* 1994;263:111–21.
- [18] Bohn JA, BeMiller JN. (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucans as biological response modifiers: a review of structure–functional activity relationships. *Carbohydr Polym* 1995;28:3–14.
- [19] Kiho T, Matsushita M, Usui S, Ukai S. Biological activities of (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucans with reducing glucose side chains. *Biosci Biotechnol Biochem* 1998;32:570–2.
- [20] Carneiro-Leão AM, Buchi DF, Iacomini M, Gorin PAJ, Oliveira MBM. Cytotoxic effect against HeLa cells of polysaccharides from the lichen *Ramalina celastri*. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1997;29:503–9.
- [21] Asséf MLM, Carneiro Leão AM, Moretão MP, Azambuja AP, Iacomini M, Buchi DF. Evaluation of the state of sarcoma 180 in mice after treatment with an  $\alpha$ -D-glucan from the lichen *Ramalina celastri*. *Braz J Morphol Sci* 2002;19:49–54.
- [22] Chiara G, Suga T, Hamuro J, Takasuka N, Maeda YY, Sasaki T, Shio T. Anti-tumor and metastasis-inhibitory activities of lentinan as an immunomodulator: an overview. *Cancer Detect Prevent Suppl* 1987;1:423–43.
- [23] Mizuno T, Ohsawa K, Hagiwara N, Kuboyama R. Fractionation and characterization of anti-tumor polysaccharides from *Maitake Grifola frondosa*. *Agric Biol Chem* 1986;50:1679–88.
- [24] Liu M, Li J, Kong F, Lin J, Gao Y. Induction of immunomodulating cytokines by a new polysaccharide-peptide complex from culture mycelia of *Lentinus edodes*. *Immunopharmacology* 1998;40:187–98.
- [25] Tokuzen R, Nakahara W. Suppression of autochthonous grafts of spontaneous mammary tumor by induced allogeneic graft rejection mechanism. *Cancer Res* 1973;33:645–7.
- [26] Potier P. Rhone-Poulenc lecture: search and discovery of new anti-tumor compounds. *Chem Soc Rev* 1992;113–9.
- [27] Saima Y, Das AK, Sarkar KK, Sen AK, Sur P. An anti-tumor pectic polysaccharide from *Feronia limonia*. *Int J Biol Macromol* 2000;27:333–5.
- [28] Beuth J, Ko HL, Pulverer G, Roszkowski K, Uhlenbruck G. Inhibition of liver metastasis in mice by blocking hepatocyte lectins with arabinogalactan infusions and D-galactose. *J Cancer Res Clin Oncol* 1987;113:51–5.
- [29] Egert D, Beuscher N. Studies on antigen specificity of immunoreactive arabinogalactan proteins extracted from *Baptisia tinctoria* and *Echinacea purpurea*. *Planta Med* 1992;58:163–5.
- [30] Gonda R, Tomoda M, Ohara N, Takada K. Arabinogalactan core structure and immunological activities of ukonan C, an acidic polysaccharide from the rhizome of *Curcuma longa*. *Biol Pharm Bull* 1993;16:235–8.
- [31] Hauer J, Anderer FA. Mechanism of stimulation of human natural killer cytotoxicity by arabinogalactan from *Larix occidentalis*. *Cancer Immunol Immunother* 1993;36:237–44.
- [32] Groman EV, Enriquez PM, Jung C, Josephson L. Arabinogalactan for hepatic drug delivery. *Bioconj Chem* 1994;5:547–56.
- [33] Prescott JH, Enriquez P, Jung C, Menz E, Groman EV. Larch arabinogalactan for hepatic drug delivery: isolation and characterization of a 9 kDa arabinogalactan fragment. *Carbohydr Res* 1995;278:113–28.
- [34] D'Adamo P. Larch arabinogalactan is a novel immune modulator. *J Naturopath Med* 1996;4:32–9.
- [35] Kiyohara H, Cyong JC, Yamada H. Relationship between structure and activity of an anti-complementary arabinogalactan from the roots of *Angelica acutiloba Kitagawa*. *Carbohydr Res* 1989;193:193–200.
- [36] Delgobo CL, Gorin PAJ, Jones C, Iacomini M. Gum heteropolysaccharide and free reducing mono- and oligosaccharide of *Anadenanthera colubrina*. *Phytochemistry* 1998;47:1207–14.
- [37] Delgobo CL, Gorin PAJ, Tischer CA, Iacomini M. The free reducing oligosaccharides of angico branco (*Anadenanthera colubrina*) gum exudate: na aid for structural assignments in the heteropolysaccharide. *Carbohydr Res* 1999;320:167–75.
- [38] Moretão MP, Buchi DF, Gorin PAJ, Iacomini M, Oliveira MBM. Effect of an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco) on peritoneal macrophage functions. *Immunol Lett* 2003;89:175–85.
- [39] Delgobo CL. Polissacarídeo e oligossacarídeos presentes no exsudato de *Anadenanthera colubrina* (Angico branco). Curitiba, 1999. Thesis (doctorate in biochemistry) Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Brazil.
- [40] Ramamoorthy L, Kemp MC, Tizard IR. Acemannan, a  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  4)-acetylated mannan, induces nitric oxide production in macrophages cell line raw 264.7. *Mol Pharmacol* 1996;50:878–84.

- [41] Morrison DC, Jacobs DM. Binding of polymyxin B to the lipid portion of bacterial polysaccharides. *Immunochemistry* 1976;13:813–8.
- [42] Adams DO. Macrophages. *Methods Enzymology* 1979;58:494–506.
- [43] Piemonte MR, Buchi DF. Analysis of IL-2, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  production,  $\alpha_5\beta_1$  integrins and actin filaments distribution in peritoneal mouse macrophages treated with homeopathic medicament. *J Submicrosc Cytol Pathol* 2002;34:255–63.
- [44] Philips HJ. Dye exclusion test for viability. In: Kruse Jr. PF, Patterson Jr. MH, editors. *Tissue culture: methods and application*. New York: Academic Press; 1973. p. 406–8.
- [45] Blaschek W, Käsbauer J, Kraus J, Franz G. *Pythium aphanidermatum*: culture, cell wall composition, isolation and structure of anti-tumor storage and solubilised cell-wall (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucans. *Carbohydr Res* 1992;231:293–307.
- [46] Ren DL, Wang JZ, Noda H, Amano H, Ogawa S. The effects of an algal polysaccharide from *Gloiopeltis tenax* on transplantable tumors and immune activities in mice. *Planta Med* 1995;61:120–5.
- [47] Cleary JA, Kelly GE, Husband AJ. The effect of molar weight and beta-1,6-linkages on priming of macrophages function in mice by (1,3)-beta-D-glucan. *Immunol Cell Biol* 1999;77:395–403.
- [48] Suga T, Maeda YY, Chihara G. Anti-tumor activity of lentian in murine syngeneic and autochthonous hosts and its suppressive effect on 3-methylcholanthrene-induced carcinogenesis. *Cancer Res* 1984;44:5132–7.
- [49] Sakurai T, Ohno N, Yodamae T. Intravenously administered (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucan, SSG, obtained from *Sclerotinia sclerotiorum* IFO 9395 augments murine peritoneal macrophages function in vivo. *Chem Pharm Bull* 1992;40:2120–4.
- [50] Martin JH, Edwards SW. Changes in mechanisms of monocyte/macrophages-mediated cytotoxicity during culture. Reactive oxygen intermediates are involved in monocyte-mediated cytotoxicity, whereas reactive nitrogen intermediates are employed by macrophages in tumor cell killing. *J Immunol* 1993;150:3478–86.
- [51] Song JY, Han SK, Son EH, Pyo SN, Yun YS, Yi SY. Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages by ginsan. *Int Immunopharmacol* 2002;2:857–65.
- [52] Callard RE. *Cytokines and B lymphocytes*. London: Academic Press; 1990.
- [53] Takahashi K, Watanuki Y, Yamazaki M, Abe S. Local induction of a cytotoxic factor in a murine tumor by systemic administration of an anti-tumor polysaccharide. *MGA Br J Cancer* 1988;57:170–3.
- [54] Takahashi K, Yamazaki M, Abe S. Local induction of a tumor necrosis factor (TNF)-like cytotoxic factor in murine tissues with tumorous and nontumorous inflammation after systemic administration of anti-tumor polysaccharides. *J Pharmacobiodynam* 1988;11:472–8.
- [55] Luettig B, Steinmuller C, Gifford GE, Wagner H, Lohmann-Matthes ML. Macrophages activation by the polysaccharide arabinogalactan isolated from plant cell cultures of *Echinacea purpurea*. *J Natl Cancer Inst* 1989;81:669–75.
- [56] Mori H, Itoh N, Yamada Y, Tamaya T. Induction of endogenous tumor necrosis factor by OK-432 in ovarian cancer patients with ascites. *Biotherapy* 1989;1:123–31.
- [57] Usami H, Yamamoto A, Yamashita W, Sugawara Y, Hamada S, Yamamoto T, Kato K, Koikeguchi S, Ohokuni H, Kotani S. Anti-tumor effects of streptococcal lipoteichoic acids on meth A fibrosarcoma. *Br J Cancer* 1988;57:70–3.
- [58] Wong CK, Leung KN, Fung KP, Pang PKT, Choy YM. Tumor necrosis factor eliciting fractions separated from *Pseudostellaria heterophylla*. *Int J Immunopharmacol* 1994;16:271–7.
- [59] Tracey KJ, Cerami A. Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. *Annu Rev Cell Biol* 1993;9:317–43.
- [60] Alleva J, Burger CJ, Elgert KD. Tumor-induced regulation of suppressor macrophage nitric oxide and TNF $\alpha$  production. *J Immunol* 1994;153:1674–86.
- [61] Larrick JW, Wright SC. Cytotoxic mechanism of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *FASEB J* 1990;4:3215–23.
- [62] Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Natl Rev Cancer* 2004;4:11–22.