



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO**

RENATA LAYNE PAIXÃO VIEIRA

EFEITO DA CARBOXIMETIL-GLUCANA EXTRAÍDA DA *Saccharomyces cerevisiae* NA FUNÇÃO CARDÍACA E VASCULAR DE RATOS

**JOÃO PESSOA
2017**

RENATA LAYNE PAIXÃO VIEIRA

EFEITO DA CARBOXIMETIL-GLUCANA EXTRAÍDA DA *Saccharomyces cerevisiae* NA FUNÇÃO CARDÍACA E VASCULAR DE RATOS

**JOÃO PESSOA
2017**

RENATA LAYNE PAIXÃO VIEIRA

EFEITO DA CARBOXIMETIL-GLUCANA EXTRAÍDA DA *Saccharomyces cerevisiae* NA FUNÇÃO CARDÍACA E VASCULAR DE RATOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Nutrição.

Área de concentração: Clínica e Epidemiologia aplicada à Nutrição

Orientador: Prof. Dr. Robson Cavalcante Veras

**JOÃO PESSOA
2017**

V658e Vieira, Renata Layne Paixão.
 Efeito da Carboximetil-glucana extraída da *Saccharomyces cerevisiae* na função cardíaca e vascular de ratos / Renata Layne Paixão Vieira. - João Pessoa, 2017.
 96 f. : il. -

 Orientador: Robson Cavalcante Veras.
 Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS

 1. Nutrição. 2. β -D-glucana. 3. *Saccharomyces cerevisiae*.
 4. Carboximetil-glucana. 5. Reatividade vascular. 6. Efeito inotrópico negativo. 7. Infarto. I. Título.

UFPB/BC

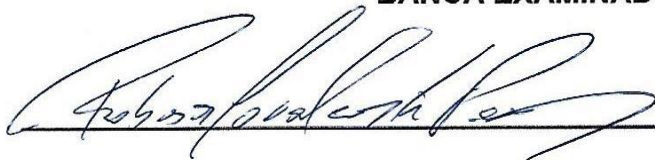
CDU: 612.39(043)

RENATA LAYNE PAIXÃO VIEIRA

EFEITO DA CARBOXIMETIL-GLUCANA EXTRAÍDA DA *Saccharomyces cerevisiae* NA FUNÇÃO CARDÍACA E VASCULAR DE RATOS

Dissertação de Mestrado aprovada em 28/03/2017

BANCA EXAMINADORA



**Prof. Dr. Robson Cavalcante Veras – Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Nutrição/CCS/UFPB
Coordenador da Banca Examinadora**

**Alexandre Sérgio Silva - Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Nutrição/CCS/UFPB
Prof. Dr. Examinador Interno**



**Eneas Ricardo de Moraes Gomes – Programa de Pós-graduação em
biotecnologia RENORBIO/UFPB
Prof. Dr. Examinador Externo**



**Prof. Dr. Hemerson Yuri Ferreira Magalhães - Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Nutrição/CCS/UFPB
Examinador Suplente Interno**

**Profa. Dr. Islania Giselia Albuquerque Gonçalves – Programa de Pós-
Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos/CCS/UFPB
Examinador Suplente Externo**

“Que a força do medo que tenho não me impeça de ver o que anseio... pois metade de mim é o que penso... e a outra metade também”.

Oswaldo Montenegro

AGRADECIMENTOS

À Deus por fazer dos meus sonhos uma realização, por sempre estar ao meu lado nos momentos de dificuldade, não permitindo que eu desistisse, mas segurando minhas mãos para superar todos os obstáculos.

A minha família, especialmente meu pai Lindomar da Silva, minha mãe Iris Vieira e irmã Rakel Vieira, que sempre estiveram ao meu lado, apoiando-me em minhas decisões e escolhas.

Ao professor orientador Robson Cavalcante Veras pela paciência e tranquilidade ao me orientar na execução desse projeto.

Ao professor Eneas Gomes pela paciência e por estar disponível sempre que precisei, pelos ensinamentos e também momentos de descontração.

À Andreza por me auxiliar em experimentos que não poderia ter feito sem sua ajuda, pelas experiências compartilhadas e pela humildade.

Às companheiras de laboratório e amigas que conquistei ao longo dessa caminhada, em especial Natália Tabosa, Lorena Soares, Luciana Toscano, Priscila Maciel, Kívia Sales, Tays Amanda, pela presteza em ajudar, pelos ensinamentos e pelos momentos que vivemos juntas.

À Manuela Freire e Júlio Gonçalves pelas caronas e paciência em escutar minhas frustrações ou realizações em dias de experimento.

À Fátima Azevedo pelo apoio, incentivo e torcida durante essa jornada.

À Crispim pela paciência, disponibilidade e auxílio nas questões referentes ao biotério.

Às minhas amigas Cleina Silva e Denise Oliveira pela força e apoio, por não medirem esforços para me ajudar sempre que precisei, mesmo aos sábados e domingos corridos arranjavam um tempinho para ir comigo ao laboratório, pela amizade sincera.

Às colegas e amigas do Programa de Pós-graduação em Ciências da Nutrição por compartilhar experiências e pelo aprendizado.

RESUMO

A carboximetil-glucana (CM-G) é um derivado obtido da (1→3) (1→6) β -D-glucana de *Saccharomyces cerevisiae*, caracterizando-se por ser modificador da resposta biológica, apresentando ação antioxidante, antiagregante plaquetária e hipolipemiante. Estas propriedades apontam para o potencial desse derivado como protetor do sistema cardiovascular, entretanto, as pesquisas nesse campo ainda são escassas. Assim, esse trabalho objetivou investigar a atuação da CM-G sobre a reatividade vascular, contratilidade atrial e de cardiomiócitos ventriculares, bem como a prevenção de dano cardíaco em modelo animal de infarto agudo do miocárdio (IAM). Todos os protocolos desenvolvidos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPB sob parecer nº 006/2016. Inicialmente foi estudado o efeito direto da CM-G sobre a reatividade vascular, contratilidade atrial e transiente de cálcio em cardiomiócitos ventriculares. Posteriormente foram delineados experimentos com animais saudáveis, os quais foram tratados por via oral com CM-G na dose de 50 mg/kg, diariamente, durante 21 dias, comparados com um grupo controle. Depois foram realizados experimentos utilizando modelo animal de IAM induzido por isoproterenol, em que no 20º e 21º dias de experimento foram administrados 85 mg/Kg/dia de isoproterenol por via subcutânea. No 22º dia, 48 h após a administração da primeira dose de isoproterenol foram feitos os ensaios experimentais. A CM-G provocou efeito relaxante de forma dependente de concentração mais pronunciado em vasos com endotélio funcional ($E_{max} = 69,13 \pm 8,18\%$) em comparação com aqueles sem endotélio ($E_{max} = 35,26 \pm 5,86\%$, $p < 0,05$). A eficácia do relaxamento dependente de endotélio induzido pela CM-G foi significativamente reduzida nos anéis pré-incubados com L-NAME ($E_{max} = 30,91 \pm 3,66\%$) ou ODQ ($E_{max} = 19,57 \pm 4,08\%$) ou carboxi-PTIO ($E_{max} = 21,19 \pm 3,42\%$) em comparação com o controle ($E_{max} = 69,13 \pm 8,18\%$, $p < 0,05$). O tratamento com CM-G promoveu redução na potência de contração ($pD_2 = 7,103 \pm 0,06$, $E_{max} = 111,55 \pm 1,99\%$) em resposta às concentrações crescentes de PHE quando comparados com o grupo controle ($pD_2 = 6,85 \pm 0,09$, $n=8$; $p < 0,05$, $E_{max} = 150,9 \pm 3,67\%$). O relaxamento induzido pela ACH teve sua eficácia aumentada nos anéis de aorta do grupo CM-G ($pD_2 = 5,56 \pm 0,14$ e $E_{max} = 90,10 \pm 3,71\%$, $n=11$) em comparação com o grupo controle ($pD_2 = 4,18 \pm 0,35$, $n=9$, $E_{max} = 69,87 \pm 4,27\%$, $p < 0,05$). Foi constatado um efeito inotrópico negativo em átrio esquerdo isolado de ratos induzido pela CM-G, o qual esteve associado à redução significativa da eficácia máxima do $CaCl_2$ em aumentar a contratilidade atrial ($E_{max} = 100\%$ CM-G vs $73,41\%$ $CaCl_2$, $p < 0,05$, $n=5$). Esse efeito foi acompanhado pela redução no transiente intracelular de Ca^{2+} em cardiomiócitos ventriculares de ratos, tanto de maneira direta quanto após a suplementação. Não foi evidenciado prevenção no dano cardíaco em modelo animal de IAM causado por isoproterenol, quando se avaliou altura do segmento ST e índice de massa do coração. Os resultados desse estudo são inéditos em demonstrar que a CM-G induz o relaxamento em aorta de ratos com participação do endotélio, aumentando a síntese e/ou biodisponibilidade de NO pela via NOS/NO/sCG. Além disso, atua sobre o miocárdio, induzindo efeito inotrópico negativo, por meio da modulação da homeostase do Ca^{2+} . Esses achados fornecem novas evidências que apontam os efeitos benéficos da CM-G sobre o sistema cardiovascular.

Palavras-chave: β -D-glucana, *Saccharomyces cerevisiae*, carboximetil-glucana, reatividade vascular, efeito inotrópico negativo, infarto.

ABSTRACT

Carboxymethyl-glucan (CM-G) is a derivative obtained from (1→3) (1→6) β -D-glucan of *Saccharomyces cerevisiae*, characterized as being a biological response modifier, presenting antioxidant action, antiplatelet agent and hypolipidemic. These properties point to the potential of this derivative as protector of the cardiovascular system, however, research in this field is still scarce. The aim of this work was to investigate the role of CM-G on vascular reactivity, contractility of atrial and ventricular cardiomyocytes, and prevention of cardiac damage in an acute myocardial infarction (AMI) animal model. All the protocols developed were approved by the Ethical Committee on the Use of Animals (CEUA) of the UFPB under opinion n° 006/2016. Initially, the direct effect of CM-G on vascular reactivity, atrial and transient calcium contractility in ventricular cardiomyocytes was studied. Subsequently, experiments were performed on healthy animals, which were orally treated with CM-G at the dose of 50 mg / kg, daily for 21 days, compared to a control group. Experiments were then performed using an isoproterenol-induced animal model of AMI, in which, on the 20th and 21st days of the experiment, 85 mg / kg / day of isoproterenol was administered subcutaneously. On the 22nd day, 48 hours after the administration of the first dose of isoproterenol, the experimental tests were performed. CM-G induced a more pronounced concentration-dependent relaxing effect in vessels with functional endothelium ($E_{max}=69.13 \pm 8.18\%$) compared to those without endothelium ($E_{max} = 35.26 \pm 5.86\%$, $p<0.05$). The efficacy of CM-G-induced endothelium-dependent relaxation was significantly reduced in the pre-incubated rings with L-NAME ($E_{max} = 30.91 \pm 3.66\%$) or ODQ ($E_{max} = 19.57 \pm 4.08\%$) or carboxy-PTIO ($E_{max} = 21.19 \pm 3.42\%$) compared to the control ($E_{max} = 69.13 \pm 8.18\%$, $p<0.05$). Treatment with CM-G promoted a reduction in contraction potency ($pD_2=7.103 \pm 0.06$, $E_{max} = 111.55 \pm 1.99\%$) in response to increasing concentrations of PHE when compared to the control group ($pD_2 = 6$, 85 ± 0.09 , $n = 8$, $p < 0.05$, $E_{max} = 150.9 \pm 3.67\%$). ACH-induced relaxation had its efficacy increased in the aortic rings of the CM-G group ($pD_2 = 5.56 \pm 0.14$ and $E_{max} = 90.10 \pm 3.71\%$, $n = 11$) compared to the control group ($pD_2 = 4.18 \pm 0.35$, $n = 9$, $E_{max} = 69.87 \pm 4.27\%$, $p < 0.05$). A negative inotropic effect was observed in the left atrium isolated from rats induced by CM-G, which was associated with a significant reduction of the maximum effectiveness of $CaCl_2$ in increasing atrial contractility ($E_{max} = 100\%$ CM-G vs 73.41% $CaCl_2$, $P < 0.05$, $n=5$). This effect was accompanied by the reduction in intracellular Ca^{2+} transient in ventricular cardiomyocytes of rats, both directly and after supplementation. There was no evidence of cardiac damage in an animal model of AMI caused by isoproterenol, when ST segment height and heart mass index were evaluated. The results of this study are unprecedented in demonstrating that CM-G induces relaxation in the aorta of rats with endothelium participation, increasing the synthesis and / or bioavailability of NO by NOS/NO/SCG pathway. In addition, it acts on the myocardium, inducing negative inotropic effect, through the modulation of Ca^{2+} handling. These findings provide new evidence pointing to the beneficial effects of CM-G on the cardiovascular system.

Keywords: β -D-glucan, *Saccharomyces cerevisiae*, carboxymethyl-glucan, vascular reactivity, negative inotropic effect, infarction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Dissertação

Figura 1- Estrutura da β (1 $\rightarrow$ 3) (1 $\rightarrow$ 6) glucana da parede celular de levedura	18
Figura 2- Representação estrutural da cadeia lateral da CM-G	19
Figura 3 - Mecanismo imunestimulatório induzido pela (1 $\rightarrow$ 3) (1 $\rightarrow$ 6) β -glucana	23
Figura 4 - Cascatas de sinalização pelas quais as β -glucanas induzem a cardioproteção.....	25
Figura 5 - Acoplamento excitação-contração em cardiomiócitos	27
Figura 6 - Ilustração síntese e atuação do Óxido Nítrico.....	32
Figura 7 - Possível mecanismo de atuação da CMG no endotélio vascular via TLR/NOS/sCG.....	34
Figura 8 - Desenho experimental do estudo (modelo Infarto induzido por isoproterenol)	41
Figura 9 - Ilustração esquemática sistema de Langendorff adaptado para isolamento de cardiomiócitos ventriculares	42
Figura 10 - Ilustração banho de órgãos para montagem de artéria aorta isolada de ratos	46
Figura 11 - Ilustração experimentos de reatividade vascular em artéria aorta de rato	47
Figura 12 - Ilustração dos experimentos de participação do endotélio no efeito induzido pela CM-G	48
Figura 13 - Representação esquemática do eletrocardiograma em ratos.....	49

Artigo

Figura 1 - Curvas concentração-resposta do efeito vasorelaxante induzido pela CM-G sob anéis de aorta isolada de rato pré-contraídos com PHE (1 μ M) na ausência ou na presença de endotélio funcional.....	71
Figura 2 - Curvas concentração-resposta para PHE (10^{-9} - 10^{-6}) e ACH (10^{-10} - 10^{-5}) do efeito vasorelaxante induzido pela ACH (10^{-10} - 10^{-5} M) em anéis de aorta isolada de rato	72
Figura 3 - Curvas concentração-resposta do efeito vasorelaxante induzido pela ACH (10^{-10} - 10^{-5} M) sob anéis de aorta isolada de rato na ausência ou na presença de L-NAME 100 μ M ou ODQ 10 μ M.....	73

Figura 4 - Efeito de concentrações crescentes de CM-G sob a força de contração do átrio esquerdo de rato. Curva concentração-resposta do efeito inotrópico negativo da CM-G. Resposta inotrópica positiva do CaCl_2 na ausência e presença de CM-G (3000 $\mu\text{g/mL}$) 75

Figura 5 - Efeito *in vitro* direto e do tratamento com CM-G sobre a amplitude do transiente de Ca^{2+} em cardiomiócitos ventriculares isolados de rato e sobre a contratilidade de cardiomiócitos ventriculares isolados de rato.....76

Figura 6 - Efeito do tratamento com CM-G (50 mg/Kg/dia) sobre o índice de massa do coração e elevação do segmento ST em modelo animal de Infarto Agudo do Miocárdio induzido por isoproterenol.....77

LISTA DE TABELAS

Dissertação

Tabela 1 - Tyrode modificado.....	37
Tabela 2 - Solução base Digestion Buffer (DB).....	37
Tabela 3 - HEPES + EGTA	37
Tabela 4 - Composição da solução de Krebs para aorta torácica isolada de rato.....	38
Tabela 5 - Composição da solução de Krebs Henseleit (pH=7,4).....	39
Tabela 6 - Composição da solução de Krebs Henseleit com baixa concentração de cálcio	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACH – Acetilcolina
AMPc – Adenosina monofosfato cíclico
ADP – Adenina difosfato
ATP – Adenosina trifosfato
 $C_6H_{12}O_6$ - Glicose
 $CaCl_2$ - Cloreto de cálcio
CaMKII - Cinase dependente de calmodulina II
CK-MB - Isoenzima MB da creatina quinase
CM-G – Carboximetil-glucana de *Saccharomyces cerevisiae*
COX - Cicloxigenase
CR-3 – Receptor do complemento 3
DCV – Doenças Cardiovasculares
ECG – Eletrocardiograma
EDH – Hiperpolarização dependente de endotélio
EDRF - Fatores relaxantes derivados do endotélio
Emax – Efeito máximo
EPM - Erro padrão da média
EROs – Espécies Reativas de Oxigênio
FE – Fração de ejeção
FEN – Fenilefrina
FHDE – Fator hiperpolarizante derivado de endotélio
GALT - Tecido Linfoide Associado ao Intestino
sCG – Enzima guanilato ciclase solúvel
GMPc - Monofosfato-3,5-guanosina cíclica
HAS – Hipertensão Arterial Sistêmica
IAM – Infarto Agudo do Miocárdio
IL - Interleucina
IMC – Índice de massa do coração
KCl - Cloreto de potássio
 KH_2PO_4 - Fosfato de potássio monobásico
LacCer: lactosil-ceramida
L-NAME – N-Nitro-L-Arginina-Metil-Éster

LPS – Lipopolissacarídeo
LTCC - Canais de Ca^{2+} Tipo-L
 MgSO_4 - Sulfato de magnésio
MyD88 – Gene 88 de resposta primária de diferenciação mielóide
NaCl - Cloreto de sódio
 NaHCO_3 - Bicarbonato de sódio
NF- κ B - Fator nuclear kappa B
NO – Óxido nítrico
NOS – Óxido nítrico sintase
NK – *Natural killers*
ODQ - *1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one*
PAMPs – Padrão molecular associado a patógenos
 PD_2 – Potência
PGI₂ - Prostaciclina
PDE - Fosfodiesterase
PHE - Fenilefrina
PI3K - Fosfoinositídeo 3 quinase
PKA – Proteína cinase A
PKC - Proteína cinase C
PKG – Proteína cinase G
RRPs- Receptores de Reconhecimento Padrão
RyR - Receptor de rianodina
SERCA - ATPase de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático
TLR – Receptor *Toll-like*
 TXA_2 – Tromboxano A₂

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
3.1 CARACTERIZAÇÃO E BIOATIVIDADE DA CARBOXIMETIL-GLUCANA (CM-G) OBTIDA DA <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
3.2 FISIOLOGIA DO MÚSCULO CARDÍACO E DOENÇAS CARDIOVASCULARES	25
3.3 ENDOTÉLIO VASCULAR, REGULAÇÃO DO TÔNUS VASCULAR E DOENÇAS CARDIOVASCULARES	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 TIPO DE ESTUDO E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	35
4.2 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO	35
4.3 OBTENÇÃO DA CM-G	35
4.4 SOLUÇÕES NUTRITIVAS	37
4.4.1 Soluções para dissociação enzimática do miocárdio	37
4.4.2 Soluções para experimentos com anéis de aorta torácica	38
4.4.3 Soluções para experimentos com átrio isolado	39
4.5 ENSAIOS EXPERIMENTAIS	39
4.5.1 Isolamento dos cardiomiócitos	41
4.5.1.2 Medida de transiente de cálcio e contratilidade de cardiomiócitos ventriculares	43
4.5.2 Preparação de átrio isolado de ratos	44
4.5.2.1 Estudo dos efeitos inotrópico e cronotrópico da CM-G em átrio isolado de ratos	44
4.5.2.2 Avaliação do efeito da CM-G sobre resposta inotrópica positiva do cálcio	44
4.5.3 Estudo da reatividade vascular	45
4.5.3.1 Preparação de anéis de aorta torácica de rato	45
4.5.3.2 Estudo da participação do endotélio vascular no relaxamento induzido pela CM-G	46
4.5.3.3 Análise da participação da via do óxido nítrico e guanilato ciclase solúvel no efeito vasorrelaxante da CM-G em anéis de aorta	47
4.6.1 Eletrocardiograma (ECG)	48
4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	49
5 REFERÊNCIAS	51
APÊNDICES	60
ANEXOS	61

1 INTRODUÇÃO

As β -D-glucanas são polímeros de glicose encontrados principalmente na parede celular de leveduras como a *Saccharomyces cerevisiae*, sendo um subproduto das indústrias de panificação e cervejaria, as quais fornecem uma fonte sustentável desse polímero, com baixo custo de obtenção. Nessa levedura, a β -D-glucana apresenta unidades de glicose organizadas em torno de um esqueleto central, através de ligações glicosídicas na posição β (1 $\rightarrow$ 3) e cadeias laterais unidas em β (1 $\rightarrow$ 6) (ARAUJO et al., 2015; MAGNANI et al., 2011; WALACHOWSKI, 2016.; XU, 2012.). Essas substâncias têm se destacado por serem moléculas biologicamente ativas, sendo amplamente estudadas as suas propriedades medicinais, sobretudo a sua ação imunomoduladora e antioxidante (ARAUJO et al., 2015; ZHU; DU; XU, 2016).

Em virtude da sua insolubilidade, esses polissacarídeos apresentam utilização limitada, tendo sido desenvolvidos derivados modificados quimicamente, com melhoria de suas qualidades farmacocinéticas, potencialização da bioatividade e consequente aplicação terapêutica (ARAUJO et al., 2015; SHIN et al., 2007; ZHU et al., 2016). Dentre os derivados solúveis obtidos da (1 $\rightarrow$ 3) (1 $\rightarrow$ 6) β -D-glucana de *S. cerevisiae*, a carboximetil-glucana (CM-G) destaca-se como um dos mais estudados, apresentando propriedades bioprotetoras, tais quais: ação antimutagênica, antígeno tóxica, anticancerígena, imunomoduladora e antioxidante, tendo como vantagens a baixa toxicidade e efeitos adversos não relatados (ARAUJO et al., 2015; MAGNANI et al., 2011).

Além dos efeitos imunomoduladores das β -D-glucanas, uma vertente de pesquisas tem se destinado à investigação de suas propriedades sobre o sistema cardiovascular. Estudos executados em nosso laboratório demonstram que a CM-G apresenta atividade antiagregante plaquetária *in vitro* e melhora a responsividade do vaso a agonistas vasoativos (BEZERRA et al., 2017). Isso revela o potencial desse polímero no que diz respeito à prevenção de Doenças Cardiovasculares (DCV), já que a hiperagregação plaquetária e a disfunção endotelial são fatores associados ao desenvolvimento de eventos trombóticos, infarto e falência cardíaca (MONTECUCCO; CARBONE; SCHINDLER, 2016; VISSERS et al., 2016).

Pesquisa realizada com humanos demonstrou potencial cardioprotetor da suplementação de β (1 $\rightarrow$ 3) (1 $\rightarrow$ 6) glucana isolada de *S. cerevisiae* por 5 dias

consecutivos em pacientes com programação para revascularização do miocárdio, tendo em vista a menor concentração de enzimas marcadoras de dano cardíaco após a cirurgia nos pacientes tratados com o polímero em comparação com os controles (AARSAETHER et al., 2006).

Li et al. (2004) demonstraram que administração intraperitoneal de 40 mg/Kg/dia da forma fosforilada da (1→3) β -D-glucana em modelo animal de infarto por isquemia e reperfusão reduziu a área infartada em 47% e 50% após reperfusão de 4h e 2h respectivamente. Em estudo posterior feito com modelo de infarto por isquemia e reperfusão em porcos, a suplementação com 50 mg/Kg/dia de β (1→3) (1→6) β -glucana isolada de *S. cerevisiae* por dez dias consecutivos, foi hábil em reduzir a área infartada em 37% (AARSAETHER et al., 2012).

Entretanto, ainda existe uma lacuna no que diz respeito a atuação desse polímero sobre o sistema cardiovascular, tendo em vista a escassez de estudos e que as pesquisas apresentam limitações e diferenças metodológicas no que se refere à via de administração, aos modelos animais, à dose, ao tipo e fonte da β -D-glucana utilizada.

Assim, considerando que recomendações atuais para promoção da saúde se pautam na mudança do estilo de vida, com destaque para a adoção de um padrão alimentar saudável, é relevante o estudo de produtos naturais, como as β -D-glucanas, as quais, por apresentarem propriedades antioxidantes, antiagregante plaquetária e hipolipemiante têm potencial para atuar como adjuvantes na prevenção e/ou no tratamento de DCV. Nesse contexto, esse trabalho visou aprofundar a investigação das propriedades vasoativas da CM-G, bem como sua atuação direta sobre o coração, elucidando os possíveis mecanismos de ação envolvidos, além de estudar o efeito da suplementação de CM-G na prevenção do dano cardíaco decorrente do IAM.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a atuação da CM-G sobre a função vascular e cardíaca, bem como os mecanismos celulares que determinam seu funcionamento normal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o efeito direto de diferentes concentrações de CM-G sobre a reatividade vascular em artéria aorta isolada de ratos;
- Investigar o efeito da suplementação de CM-G sobre a reatividade vascular em artéria aorta isolada de ratos;
- Averiguar a influência do endotélio na resposta induzida pela CM-G em artéria aorta isolada de rato;
- Caracterizar, em átrio esquerdo isolado de ratos, o efeito inotrópico CM-G;
- Descrever a atuação da CM-G sobre o efeito inotrópico positivo do cálcio em átrio esquerdo isolado de ratos;
- Analisar o efeito da suplementação com CM-G na contratilidade de cardiomiócitos ventriculares isolados de ratos saudáveis;
- Investigar o efeito direto e da suplementação com CM-G sobre o transiente intracelular de cálcio em cardiomiócitos ventriculares de ratos saudáveis;
- Avaliar o efeito da administração oral de CM-G sobre a prevenção do dano cardíaco em animais com IAM induzido por isoproterenol.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

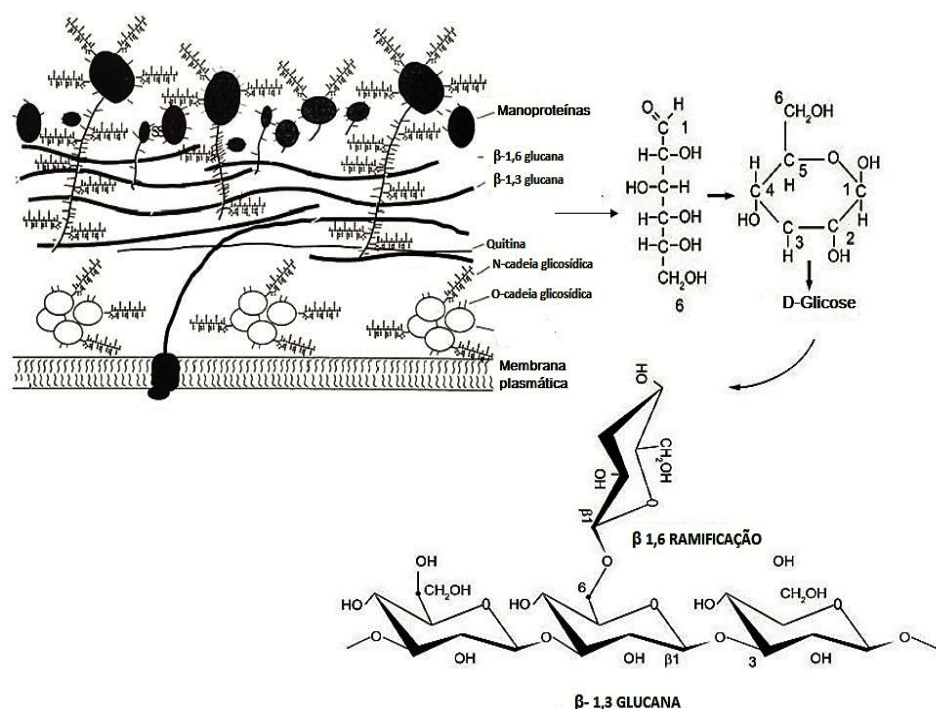
3.1 CARACTERIZAÇÃO E BIOATIVIDADE DA CARBOXIMETIL-GLUCANA (CM-G) OBTIDA DA *Saccharomyces cerevisiae*

As β -D-glucanas são polissacarídeos que constituem o componente estrutural principal da parede celular de leveduras, fungos, algas, bactérias e alguns cereais como cevada e aveia, nos quais, esses polímeros se diferenciam pelo tipo de ligação entre as unidades de glicose da cadeia principal e suas ramificações. Essas substâncias têm despertado atenção da comunidade científica pelos seus potenciais efeitos biológicos, mais especificamente sobre o sistema imune, sendo descritas como moléculas biologicamente ativas ou modificadoras da resposta biológica (KHAN et al., 2016; KUSMIATI; DHEWANTARA, 2016; SALUK-JUSZCZAK; KROLEWSKA; WACHOWICZ, 2010; VOLMAN et al., 2010; WANG et al., 2014; WU et al., 2016; XU et al., 2012).

Embora possam ser extraídas de diversas fontes, as β -D-glucanas com propriedades medicinais são encontradas principalmente na parede celular de fungos (SALUK-JUSZCZAK; KROLEWSKA; WACHOWICZ, 2011). Dentre estes destaca-se a *Saccharomyces cerevisiae*, também conhecida como levedura da fermentação, amplamente empregada na indústria de panificação, sucroalcooleira e cervejaria (MAGNANI; CASTRO-GOMÉZ, 2008). Após esse processo industrial, é gerado um grande excedente de biomassa de levedura, o qual, apesar de apresentar potencial para aplicação na indústria alimentícia e farmacêutica, é descartado, levando à poluição de fontes de água naturais com material orgânico, gerando impacto ambiental e altos custos de tratamento de resíduo-efluentes industriais (COSTA; MAGNANI; CASTRO-GOMEZ, 2011; ZECHER-KRPAN et al., 2010). Dessa forma, o reaproveitamento desse subproduto implica em benefício no que diz respeito ao impacto ambiental e à saúde dos indivíduos.

A β -D-glucana extraída da parede celular de *S. cerevisiae* é um polímero composto por repetidas unidades de glicose, estando dispostas em torno de uma cadeia central, unidas a esta por ligações glicosídicas do tipo β (1 $\rightarrow$ 3), com cadeias laterais de tamanhos variáveis unidas através de ligações β (1 $\rightarrow$ 6) (Figura 1) (DALONSO; GOLDMAN; GERN, 2015; MAGNANI et al., 2011).

Figura 1- Estrutura da β (1 $\rightarrow$ 3) (1 $\rightarrow$ 6) glucana da parede celular de levedura



Representação esquemática da estrutura básica da (1 $\rightarrow$ 3) (1 $\rightarrow$ 6) β -glucana da parede celular de levedura, mostrando as subunidades básicas do polímero (D-glicose), unidas entre si por ligações glicosídicas na posição β (1 $\rightarrow$ 3), com cadeias laterais unidas em β (1 $\rightarrow$ 6). Fonte: adaptado CHAN; CHAN; SZE, 2009.

Há pesquisas que demonstram a atividade biológica das β -D-glucanas lineares (CHEN; SEVIOUR, 2007; JAMOIS et al., 2005), entretanto, as formas ramificadas têm demonstrado maior variedade de efeitos biológicos, maior potência e eficácia farmacológica (EL ENSHASY; HATTI-KAUL, 2013).

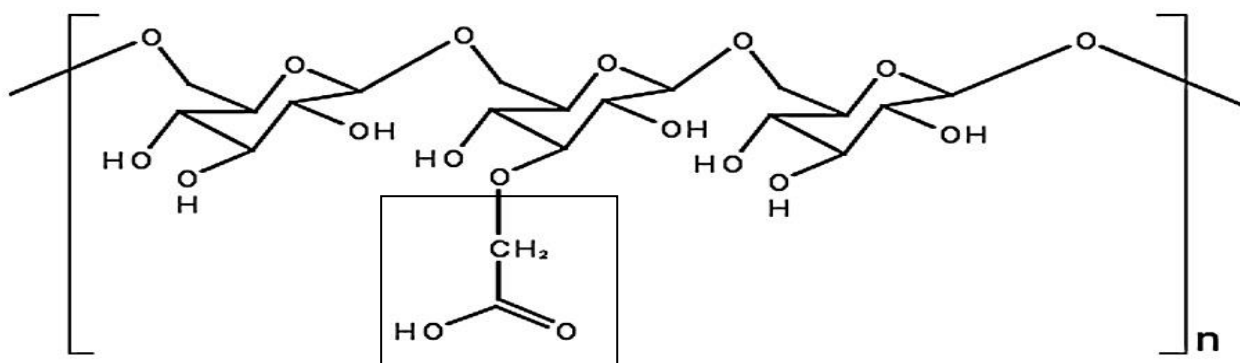
Na parede celular da *S. cerevisiae*, são encontradas duas frações de β -D-glucana, sendo uma solúvel e outra insolúvel em meio aquoso. Esta representa o maior componente, contendo de 3 a 6% de ramificações unidas em β (1 $\rightarrow$ 6), já aquela, representa de 15 a 20%, contendo maior número de ramificações (MAGNANI; CASTRO-GÓMEZ, 2008). Esse aspecto é relevante, tendo em vista que a atividade biológica é fortemente influenciada pela solubilidade, a qual está associada a características da molécula tais como estrutura química e peso molecular, sendo esse aspecto um dos principais obstáculos para utilização desse polissacarídeo para fins de pesquisa e prática clínica (ARAUJO et al., 2015; DING et al., 2013; MAGNANI et al., 2011).

Nesse contexto, para ampliar a utilização desses polímeros, têm sido propostas modificações químicas na estrutura molecular das β -D-glucanas a fim de melhorar a solubilidade dessas moléculas. Os métodos utilizados consistem na incorporação de grupos hidrofílicos, através da fosforilação, aminação, sulfonação e carboximetilação. Além disso, é importante ressaltar que a solubilidade desses derivados é proporcional ao grau de substituição no polímero (DALONSO et al., 2015; KAGIMURA et al., 2015; SHIN et al., 2007).

Os métodos utilizados para melhorar a solubilidade dessas moléculas, especialmente a carboximetilação, resultam em melhora da absorção, distribuição e biodisponibilidade, ampliando o espectro de atuação nos diversos sistemas biológicos e consequentemente suas aplicações terapêuticas. Assim, nesse estudo foi utilizada a forma carboximetilada (~220KDa), com um grau de substituição de 0,8, o que lhe garante boa solubilidade em água (MAGNANI et al., 2009; ŠANDULA et al., 1999).

A CM-G (figura 2) é um dos derivados mais estudados, seja por seu potencial imunoestimulante ou por ser sequestradora de radicais livres (DING et al., 2013; MAGNANI et al., 2011). De fato, a introdução de grupos carboximetil na estrutura das β -D-glucanas aumenta o potencial antioxidante e melhora o contato destes homopolímeros com os receptores celulares responsáveis pela modulação da atividade imunológica, gerando uma potente ação imunoestimuladora (EL ENSHASY; HATTI-KAUL, 2013; MACHOVÁ, 2014; WANG et al., 2015).

Figura 2- Representação estrutural da cadeia lateral da CM-G



Representação estrutural da glucana modificada através da carboximetilação, em que o grupo carboxila (CH_2COOH) é adicionado ao grupo hidroxila no monossacárido. Fonte: adaptado de KAGIMURA et al., 2014.

Estudos de toxicidade com β -(1 $\rightarrow$ 3) (1 $\rightarrow$ 6) D-glucana demonstraram que não foram observados efeitos adversos ou tóxicos após período de 13 dias de administração até a dose oral máxima testada de 100mg/kg/dia (BABICEK et al., 2007). Além disso, esse polímero se mostrou bem tolerado em pesquisas feitas com humanos. Assim, o uso de seus derivados solúveis, como a CM-G têm sido amplamente estudados por suas propriedades antioxidante, antitumoral, anticoagulante e imunomoduladora, apresentando vantagens em comparação a fármacos sintéticos, os quais, embora eficazes, revelam atividades citotóxicas (KOGAN et al., 2002).

Kogan et al. (2002), ao realizarem um estudo experimental demonstraram que administração de 25 mg/Kg/dia de CM-G juntamente com ciclofosfamida teve maior efeito inibitório (75% - 90%) sobre o crescimento de células tumorais de carcinoma pulmonar de Lewis do que quando a medicação foi administrada isoladamente (57%), mostrando que o derivado carboximetilado da β -D-glucana da *S. cerevisiae* atua como adjuvante na atividade antitumoral e antimetastática. Pesquisa realizada com a forma carboximetilada do polissacarídeo extraído do *Phellinus linteus* demonstrou efeito inibitório *in vitro* sobre o crescimento de fibrosarcoma humano de células HT1080, suprimindo o crescimento de células tumorais. Além disso, foi verificado aumento de 1,8 vezes na síntese de Óxido Nítrico (NO) em células broncoalveolares em comparação com a β -D-glucana insolúvel (SHIN et al., 2007).

Consistentemente, a suplementação de 20 mg de CM-G por dia, durante um período de 28 dias, em pacientes com câncer de próstata avançado mostrou efeito protetor contra o dano causado ao DNA de linfócitos periféricos, melhorando a sobrevivência a curto prazo destes pacientes (MAGNANI et al., 2011). Pesquisa recente com três derivados solúveis confirmou evidente atividade antioxidante e antitumoral, especialmente da forma carboximetil-sulfatada, a qual demonstrou alta taxa de inibição de células tumorais HepG2 em ratos (WANG et al., 2015).

As pesquisas também revelam o potencial antioxidante dos derivados solúveis de β -D-glucanas, atuando como adjuvante na prevenção dos danos oxidativos tanto em indivíduos saudáveis, quanto naqueles com doenças que predispõem o estresse oxidativo. Adicionalmente, esses foram capazes de combater o estresse oxidativo causado por lipopolissacarídeos em plaquetas de sangue humano (ARAUJO et al., 2015; MAGNANI et al., 2011; SALUK et al., 2013).

No que diz respeito aos efeitos cardiovasculares da CM-G de *S. cerevisiae* poucos são os dados e estes, por vezes, são conflitantes, tendo em vista a heterogeneidade das metodologias utilizadas como: dose, tempo de tratamento, vias de administração, fonte e estrutura desse polímero, destacando-se as formas fosforiladas das β -D-glucanas de estrutura linear ou as insolúveis. Basicamente, as pesquisas concentram-se em estudos de atividade hipolipemiante, antiagregante plaquetária e preventiva do dano cardíaco causado por infarto agudo do miocárdio em modelos experimentais de isquemia e reperfusão (AARSAETHER et al., 2006; AARSAETHER et al., 2012; DE ARAUJO et al., 2016).

A administração intraperitoneal de 25 mg/Kg/dia da forma carboximetilada da β (1 $\rightarrow$ 3) glucana de *S. cerevisiae*, em camundongos com dislipidemia aguda induzida por Poloxamer (P-407) induziu efeito redutor de colesterol e triglicerídeos plasmáticos (KOROLENKO et al., 2012; PISAREVA et al., 2014). A suplementação oral de diferentes doses de β -D-glucana de *S. cerevisiae* mostrou-se efetiva em reduzir o colesterol e triglicerídeos plasmáticos em animais alimentados com dietas com elevado teor de gorduras (ARAUJO et al., 2016; KUSMIATI; DHEWANTARA, 2016). Adicionalmente, a β -D-glucana de *Aerobasidium pullans* reduziu a LDL oxidada no sangue e o acúmulo de macrófagos na parede vascular de ratos com aterosclerose induzida por dieta (AOKI et al., 2015).

Evidências mostram que tanto a (1 $\rightarrow$ 3) (1 $\rightarrow$ 6) β -glucana isolada de *S. cerevisiae* quanto a sua forma carboximetilada apresentam efeito antiagregante plaquetário (SALUK-JUSZCZAK et al., 2010). Estudo feito por Bezerra et al. (2017) demonstrou que a CM-G em diferentes concentrações (100 μ g/mL e 300 μ g/mL) inibiu a agregação plaquetária induzida por ADP *in vitro* com efeito semelhante ao do ácido acetilsalicílico, um agente antiplaquetário clássico. Também, o tratamento de animais, com 20 mg/Kg/dia da β -D-glucana oriunda da *S. cerevisiae* ou da CM-G, durante 8 dias, inibiu a agregação plaquetária *in vitro* induzida por adenina difosfato (ADP). Nesse mesmo estudo, demonstrou-se que a CM-G potencializou o efeito relaxante induzido por um doador de NO, ratificando o seu efeito benéfico no sistema cardiovascular.

A administração intraperitoneal de 40 mg/Kg/dia da forma fosforilada da (1 $\rightarrow$ 3) β -D-glucana em modelo animal de infarto por isquemia e reperfusão reduziu a área infartada em 47% e 50% após reperfusão de 4h e 2h, respectivamente (LI et

al., 2004). Um ensaio clínico feito com pacientes com infarto do miocárdio submetidos a *Bypass* cardiopulmonar mostrou que o pré-tratamento oral com (1→3) (1→6) β -glucana nas doses de 350 e 700 mg/2x/dia por 5 dias consecutivos (>20 mg/Kg/dia) foi bem tolerado, além de reduzir, no pós-operatório, os marcadores de dano cardíaco (creatina-cinase/CK-MB e troponina-1) em comparação com o grupo controle, de maneira dose-dependente (AARSAETHER et al., 2006). Em estudo posterior com modelo animal de infarto por isquemia e reperfusão, a suplementação com 50 mg/Kg/dia de (1→3) (1→6) β -glucana isolada de *S. cerevisiae* por dez dias consecutivos, foi hábil em reduzir a área infartada em 37% no grupo suplementado em comparação com o grupo controle (AARSAETHER et al., 2012).

Os mecanismos de atuação dessa substância ainda são controversos, mas acredita-se que, a sua fermentação no intestino seja um importante fator contribuinte para seus benefícios à saúde. No que diz respeito à ação hipolipemiante acredita-se que, por serem fibras e, portanto, não digeridas no trato gastrointestinal, as β -D-glucanas lineares ligam-se ao colesterol e aos sais biliares aumentando sua excreção pelas fezes e, conseqüentemente, diminuindo a absorção intestinal, mantendo o perfil lipídico sérico em níveis considerados normais (GIAVASIS, 2014).

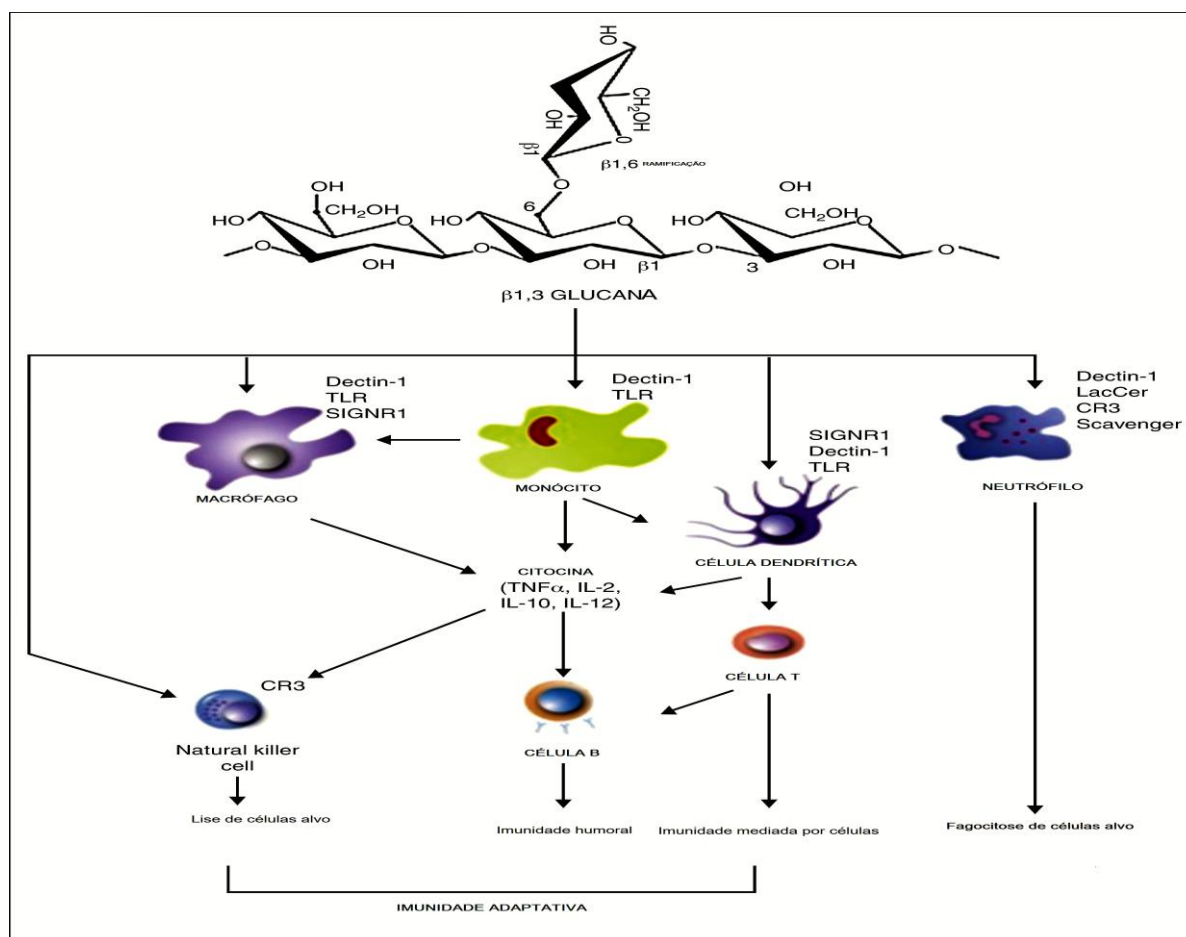
A agregação plaquetária excessiva e o dano endotelial são eventos centrais no desenvolvimento de complicações isquêmicas, tanto em eventos agudos como a sepse, quanto em quadros crônicos como os fenômenos trombóticos, principais causas DCV, cuja patogênese está associada à ativação plaquetária, com posterior adesão e liberação de conteúdos granulares em resposta a agonistas. Nesse sentido, a literatura sugere que a via do ácido araquidônico e a geração de tromboxano A_2 é inibida pela β -D-glucana nas plaquetas. Esse polissacarídeo pode afetar as enzimas envolvidas nesta via ou a geração de espécies reativas de oxigênio, quando o ácido araquidônico é metabolizado pela cicloxigenase (GURBEL et al., 2004; SALUK-JUSZCZAK et al., 2010).

Em relação às ações sobre o sistema imune, sabe-se que esses polímeros não são sintetizados nem são componentes do organismo humano e isso faz com que o sistema imune não reconheça esse biopolímero como auto-moléculas, induzindo a resposta imune inata e adaptativa. A captação intestinal dessas moléculas pode ocorrer via células membranáceas nas placas de *Peyer* no intestino, através do Tecido Linfoide Associado ao Intestino (GALT), com posterior fagocitose

pelos macrófagos e transporte para órgãos linfoides, fígado, rins, nódulos linfáticos e medula óssea (RAHAR et al., 2011; SAMUELSEN; SCHREZENMEIR; KNUTSEN, 2014).

A ativação da resposta imune é mediada através de Receptores de Reconhecimento Padrão (RRPs), os quais reconhecem Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs), estes incluem o ácido lipoteicóico (bactérias Gram positivas); Lipopolissacarídeos (bactérias Gram negativas) e β -D-glucana (fungos) (Figura 3).

Figura 3 - Mecanismo imunestimulatório induzido pela (1 $\rightarrow$ 3) (1 $\rightarrow$ 6) β -glucana



Representação esquemática dos mecanismos imunoestimulantes das β -D-glucanas fúngicas, as quais podem se ligar a receptores de membrana (DECTIN-1, TLR, CR-3), nas células do sistema imune, ativando vias de sinalização que podem envolver macrófagos, monócitos, neutrófilos, células dendríticas, células T, células B e *natural Killer*. Essa resposta resulta na liberação de citocinas como TNF- α e interleucinas. A imunomodulação pode ser uma resposta inata ou adaptativa. TLR: receptor *Toll like*; CR3: receptor do sistema complemento-3; LacCer: lactosil-ceramida; TNF- α : Fator de necrose tumoral. Fonte: Adaptado GIAVASIS, 2014.

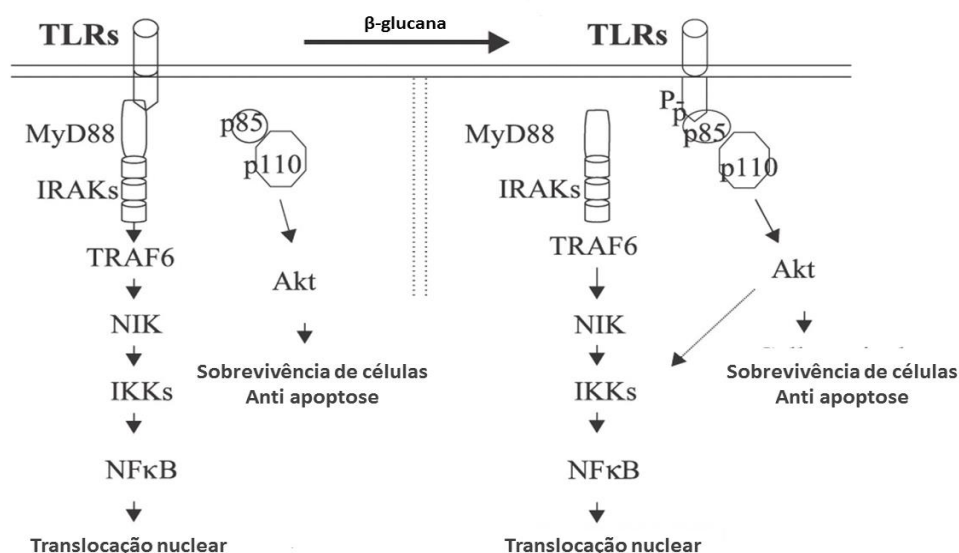
Acredita-se que a indução de respostas celulares pelas β -D-glucanas envolve sua interação com um ou mais receptores de superfície celular, destacando-se o receptor *Toll-like* 2 e 4 (TLR2 e TLR4), receptor do complemento 3 (CR3); *Scavengers* - grupo heterogêneo de moléculas; *Lactosil-Ceramida* (LacCer) e Dectin-1. As atividades antimicrobiana e anti-inflamatória são desencadeadas por mecanismos dependentes destes receptores, os quais deflagram respostas celulares como aumento da fagocitose, síntese de lisozima, espécies reativas de oxigênio, de intermediários de nitrogênio reativo, radicais livres, de citocinas pró-inflamatórias e de quimiocinas (AKRAMIENE et al., 2007; EL ENSHASY; HATTI-KAUL, 2013; KAGIMURA et al., 2015; THOMPSON; OYSTON; WILLIAMSON, 2010).

Sabe-se que as células cardíacas expressam uma grande variedade de receptores, em especial os TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR9 e parece haver um ponto de encontro entre as adaptações à lesão cardíaca e respostas imunológicas, visto que cardiomiócitos podem responder a sinais de dano com uma complexa resposta inflamatória, envolvendo a liberação de citocinas (IL-6), quimiocinas e moléculas de adesão (AVLAS et al., 2011; BOYD et al., 2006). Além disso, os mecanismos envolvidos no IAM estão intrinsecamente associados a uma ação imune e resposta inflamatória aguda exagerada, com consequente ativação da cascata do complemento e estimulação dos receptores *toll-like* (TLR), os quais exercem papel essencial tanto na imunidade inata quanto na adaptativa. Isso resulta na ativação de fator nuclear kappa B (NF- κ B), indução de citocinas, quimiocinas, bem como de moléculas de adesão. A interação entre estes culmina com o extravasamento e recrutamento de neutrófilos e monócitos no miocárdio, que agrava a aterosclerose e leva ao IAM (FANG et al., 2015).

Acredita-se que a ação cardioprotetora das β -D-glucanas deve-se a sua habilidade em alterar o processo de sinalização celular no músculo cardíaco lesado, através da ativação dos TLR, com inibição da ativação da via NF- κ B/MyD88, acompanhado pela estimulação da ativação da via fosfatidilinositol-3-quinase PI3K/Akt, o que promove a sobrevivência de cardiomiócitos após dano cardíaco, inibe a apoptose de células cardíacas e limita a expressão de mediadores inflamatórios (Figura 4). Ademais, pode-se atribuir essa ação protetora à capacidade das glucanas em sequestrar radicais livres, culminando com menor dano oxidativo

pós isquemia (AARSAETHER et al., 2006; AARSAETHER et al., 2012; LI et al., 2004.).

Figura 4 - Cascatas de sinalização pelas quais as β -glucanas induzem a cardioproteção



Representação esquemática ilustrando que o tratamento com a forma fosforilada da β -glucana (GP) desloca o sinal de ativação mediado por TLR de uma via predominante de NFκB para uma via de sinalização TLR/PI3K/Akt. Após a estimulação de GP, o domínio citoplasmático de TLR é fosforilado pela tirosina quinase e subsequentemente desassociado de MyD88. A fosfotirosina de TLR recrutará a subunidade PI3K p85, resultando na ativação da via alternativa PI3K/Akt. A principal função da Akt ativada é promover a sobrevivência celular e inibir a apoptose. Akt ativado também fosforila IKKs. Fonte: Adaptado LI et al., 2004.

3.2 FISIOLÓGIA DO MÚSCULO CARDÍACO E DOENÇAS CARDIOVASCULARES

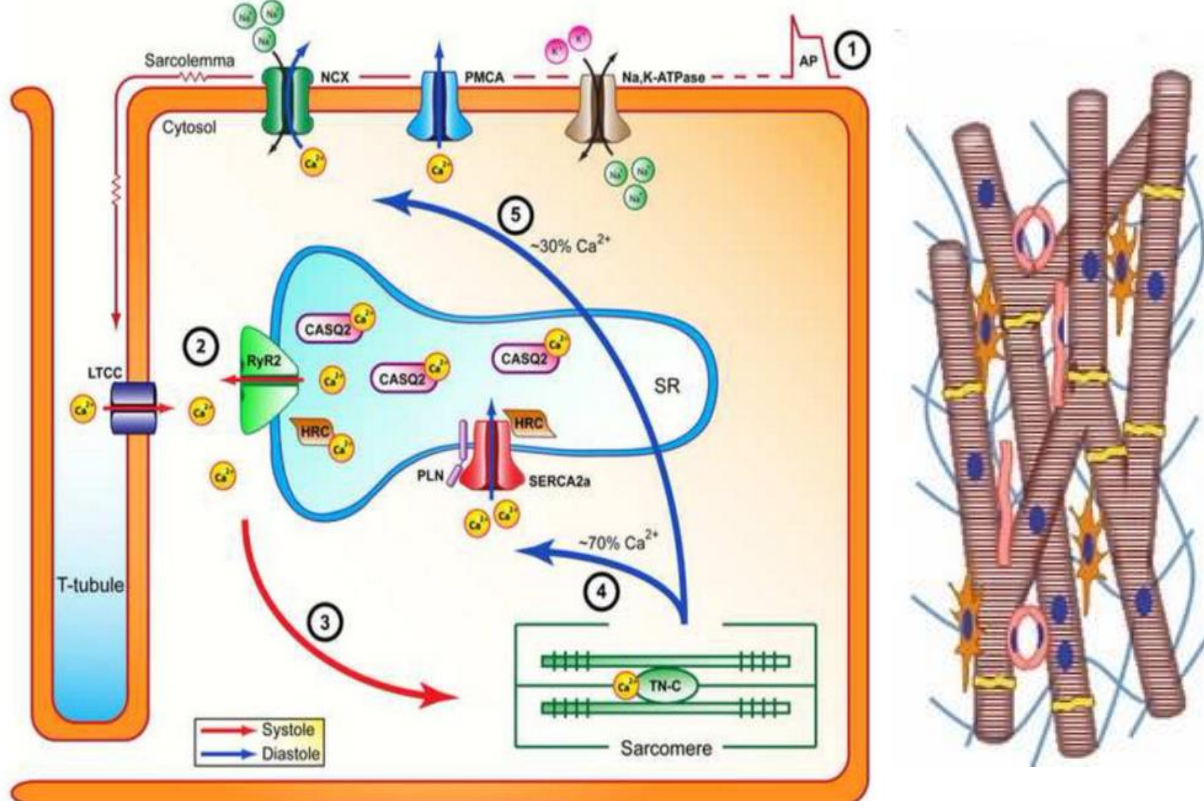
A atividade mecânica do coração é controlada por estímulos elétricos que se propagam ordenadamente através do miocárdio. O nodo sino-atrial, localizado em uma discreta área do átrio direito, próximo à veia cava inferior é o marcapasso primário do coração e é determinante para a automaticidade e geração do batimento cardíaco. Isso porque esse tecido é formado por células especializadas dotadas da capacidade de se despolarizar espontaneamente, gerando potenciais de ação. Os impulsos elétricos gerados são transmitidos ao nodo átrio-ventricular e partem para os ventrículos através do feixe de HIS (MERINO; QUESADA; HERNANDEZ-CASCALES, 2015). O período compreendido entre o início de um batimento

cardíaco até o início do seguinte é denominado ciclo cardíaco. Este consiste de um período de relaxamento, denominado diástole, durante o qual o coração se enche de sangue, seguido por um período de contração chamado sístole (WILCKEN, 2014).

A avaliação da atividade elétrica do coração é feita pelo eletrocardiograma (ECG), que é o registro gráfico da projeção dos vetores de ativação elétrica do coração nas diferentes linhas de derivações durante um período de tempo, utilizando eletrodos colocados no corpo. Esses detectam pequenas correntes elétricas que surgem a partir da despolarização e repolarização do músculo cardíaco durante cada ciclo cardíaco. O ECG normal apresenta ondas características denominadas P (despolarização elétrica dos átrios), QRS (despolarização dos ventrículos), T (repolarização dos ventrículos). Alterações no padrão eletrocardiográfico podem ser sugestivos e diagnósticos de doenças cardíacas como o supradesnívelamento do seguimento ST, que indica o Infarto do miocárdio (WILCKEN, 2014).

O acoplamento excitação-contração (AEC) do músculo cardíaco é o processo que compreende desde a excitação elétrica dos cardiomiócitos até a contração do coração. Esse processo está diretamente associado à homeostase do íon Ca^{2+} . Durante a sístole, um potencial de ação causa despolarização do sarcolema, resultando na entrada de pequena quantidade de Ca^{2+} extracelular no citosol através dos canais de Ca^{2+} Tipo-L (LTCC). Estes canais estão situados próximos ao receptor de rianodina (RyR), localizado na membrana no retículo sarcoplasmático. O discreto aumento nas concentrações de cálcio decorrentes da abertura dos canais LTCC desencadeia a liberação de massiva quantidade de cálcio do retículo através dos RyR para o citosol. Esse processo culmina com a ativação de proteínas contráteis sensíveis ao cálcio (troponina C) e posterior contração celular (figura 5).

Figura 5 - Acoplamento excitação-contracção em cardiomiócitos



Representação esquemática da estrutura do cardiomiócito ventricular e processo de acoplamento excitação-contracção. Durante a sístole, um potencial de ação despolariza o sarcolema e induz a abertura do LTCC, permitindo que uma pequena quantidade de cálcio (Ca^{2+}) extracelular entre no citosol (1). Por sua vez, isto inicia a libertação maciça de cálcio a partir do retículo sarcoplasmático, através dos receptores de rianodina RyR2 (2). Este aumento súbito na concentração de Ca^{2+} citosólico resulta na ligação do mesmo à troponina-C e início da contracção muscular (3). A remoção rápida do cálcio citosólico durante a diástole é facilitada principalmente pelo SERCA2a (4). A diminuição do Ca^{2+} intracelular leva à dissociação do cálcio da TN-C e relaxamento muscular. Fonte: Adaptado GORSKI; CEHOISKI; HAJJAR, 2015; SHADRIN; KHODABUKUS; BURSAC, 2016.

Tem sido descrito, também, que a liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático, através dos RyR é fundamental na geração dos impulsos elétricos espontâneos do nodo sino-atrial, pela ativação de correntes na bomba $\text{Na}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ que aceleram o disparo do marcapasso. Esse processo é dependente da fosforilação de RyR tanto pela Proteína Cinase A (PKA) quanto pela cinase dependente de calmodulina II (CaMKII). Ademais, a atividade da fosfodiesterase (PDE), regula os níveis basais de monofosfato de adenosina (AMPc), que por sua vez regulam a frequência de potenciais de ação no nodo sino-atrial (MERINO et al., 2015).

Alterações na homeostase do Ca^{2+} são a causa central para as disfunções contráteis gerando eventos arrítmicos que estão diretamente relacionadas com a fisiopatologia das doenças cardíacas, em especial falência cardíaca e doença isquêmica do coração. Dessa maneira, pacientes com esses agravos apresentam defeitos na função sistólica e diastólica, os quais decorrem de adaptações fisiológicas como mudanças na morfologia do cardiomiócito, incluindo aumento no tamanho, desorganização sarcomérica e miofibrilar. Na falência cardíaca, uma das mais pronunciadas mudanças celulares é um aumento dos níveis de Ca^{2+} citosólico no final da diástole, com prolongamento do transiente de cálcio. Isso pode ser decorrente da entrada excessiva desse íon, redução do estoque de Ca^{2+} para o retículo sarcoplasmático ou do seu efluxo. Existem várias suposições para esse acúmulo excessivo, destacando-se defeitos nos LTCC, no trocador $\text{Na}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ (localizada na membrana plasmática – NCX) ou pela bomba Ca^{2+} ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA) (GORSKI; CEHOLSKI; HAJJAR, 2015; SADREDINI et al., 2016).

Além disso, a geração excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs), resultante do metabolismo alterado de oxigênio está envolvida nas adaptações fisiopatológicas ao estresse cardíaco, de maneira que o estado redução/oxidação (redox) torna-se importante tanto em adaptações agudas quanto no remodelamento cardíaco. Algumas proteínas envolvidas no processo de acoplamento excitação-contracção como RyRs são alvos diretos das EROS. É descrito que em estados patológicos, altos níveis de EROs são capazes de modificar e danificar as proteínas, causando “vazamento” de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático, resultando em arritmia e disfunção contrátil (SANTOS; RAZA; SHAH, 2016; ZIMA; BLATTER, 2006).

Nesse sentido, o desenvolvimento de modelos experimentais que simulem o estado fisiopatológico de DCV que ocorrem em humanos é um artifício importante para um melhor conhecimento da etiologia e do estudo de estratégias terapêuticas mais adequadas à prevenção e tratamento dessas doenças. Nesse contexto, a indução farmacológica do IAM por administração subcutânea de altas doses de isoproterenol é um dos modelos experimentais mais comumente usados para estudar os efeitos de drogas na função cardíaca. O isoproterenol é uma catecolamina sintética e um agonista β -adrenérgico, que, em altas doses produz hipóxia e focos de necrose miocárdica, com consequente redução da capacidade

funcional do coração, tendo sido usado para induzir IAM em ratos. Esses desfechos são causados dentre outras hipóteses, pela geração excessiva de radicais livres (GARG, 2014; NAKAMURA et al., 2011).

Esse modelo apresenta como vantagens, quando comparado com os modelos cirúrgicos, a simplicidade da técnica, a relativa baixa mortalidade e ausências de infecções decorrentes de procedimentos cirúrgicos. Além disso, o desenvolvimento de alterações eletrofisiológicas, bioquímicas, fisiopatológicas, histológicas e moleculares são semelhantes às identificadas em humanos como aumento no estresse oxidativo, inflamação do miocárdio, trombose e sobrecarga de Ca^{2+} (AKILA; VENNILA, 2016; KUMAR et al., 2016; SAEED, 2006; SUCHAL et al., 2016).

No que tange à terapia farmacológica podem ser citadas as drogas que interferem no relaxamento, na contração (inotrópico) ou na frequência cardíaca (cronotrópicos). A escolha da terapia deve levar em consideração o tipo de doença cardíaca que se deseja tratar, tendo em vista que fármacos inotrópicos positivos ou negativos podem ser lesivos a depender do paciente. Nesse sentido, drogas como os agonistas β -adrenérgicos (ex. dobutamina) e inibidores da PDE (ex. milrinona) aumentam os níveis intracelulares de Ca^{2+} e melhoram a contratilidade com resultados temporariamente favoráveis, entretanto, estão associados, em longo prazo, a consequências deletérias, como elevado consumo de oxigênio pelo miocárdio, arritmias e aumento na mortalidade. Por outro lado, os bloqueadores dos canais de cálcio (ex. nifedipino), juntamente com β -bloqueadores exercem efeito inotrópico negativo, diminuindo a sobrecarga intracitoplasmática de cálcio, a frequência e contratilidade cardíaca, com consequente redução no consumo de oxigênio, pressão nos vasos, tendo benefícios no tratamento da HAS, angina, infarto e arritmias, mas são contraindicados para pacientes com falência cardíaca sistólica (DAVLOUROS et al., 2016; GAO et al., 2014; WALLIS; GHARANEI; MADDOCK, 2015).

A terapia farmacológica dispensada nos casos de doenças cardíacas apresenta um limiar bastante tênue entre o tratamento e o surgimento de efeitos adversos. Nesse sentido, pesquisas sobre o estudo de produtos naturais com potencial terapêutico para prevenir ou tratar as DCV com efeitos colaterais mínimos têm sido realizadas. Investigações feitas com a *Salvia miltiorrhiza*, ácido tânico e

com flavonas isoladas de *Acanthopanax senticosus* demonstraram efeito inibitório sobre os canais LTCC, com diminuição do transiente de Ca^{2+} , $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e a contratilidade de cardiomiócitos ventriculares isolados de ratos, fatores estes que associados com menor consumo de oxigênio pelo miocárdio parece ser o mecanismo celular mais importante para o tratamento clínico da isquemia, como a cardiomiopatia isquêmica (GAO et al., 2014; GUAN et al., 2015; ZHU et al., 2016).

As β -D-glucanas fúngicas são fibras derivadas de fontes naturais e têm se mostrado promissoras por seus diversos benefícios à saúde. Muitos estudos tem explorado suas propriedades medicinais como antimutagênicas (MAGNANI, 2011; WANG et al., 2015), imunomoduladora, antioxidante (ARAUJO et al., 2015) e, apesar de terem sido feitos ensaios que demonstraram o seu efeito cardioprotetor (AARSAETHER et al., 2012; AOKI et al., 2015; KUSMIATI; DHEWANTARA, 2016) não existem até o momento, pesquisas científicas que busquem investigar a atuação desses polímeros, nem tampouco de seu derivado carboximetilado, sobre os mecanismos celulares que determinam o funcionamento normal do coração, quais sejam homeostase do Ca^{2+} , contratilidade celular e atrial.

3.3 ENDOTÉLIO VASCULAR, REGULAÇÃO DO TÔNUS VASCULAR E DOENÇAS CARDIOVASCULARES

O endotélio vascular é uma fina camada de células que reveste a superfície luminal dos vasos sanguíneos, sendo uma barreira física para regular o fluxo dos componentes do sangue. Além disso, é fundamental para a função vascular e está intimamente relacionado com a manutenção da homeostase, pois regula diversos processos como coagulação, fluxo sanguíneo, remodelamento e tônus vascular. Este é regulado através da produção de potentes mediadores vasoativos como catecolaminas, angiotensina, bradicinina e prostaciclina e fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRF - Óxido Nítrico, prostaciclina, hiperpolarização dependente de endotélio - EDH) (AUGER et al., 2016; FISH; MARSDEN, 2006; RAJENDRAN et al., 2013).

As respostas mediadas por EDHF contribuem para relaxamento dependente do endotélio, sendo a prostaciclina (PGI_2) o principal metabólito produzido pela via do ácido araquidônico sob ação da ciclooxigenase (COX) em células endoteliais.

Essa molécula liga-se com um receptor de membrana acoplado à proteína G, o receptor PGI₂ tipo 1 (IP), ativando a adenilil ciclase e gerando AMPc. Este atua como um segundo mensageiro para ativar a proteína cinase A (PKA), resultando no relaxamento das células musculares lisas vasculares e inibição da ativação plaquetária (CHU; LIOU; WU, 2015). Já a EDH gera hiperpolarização das membranas celulares, impedindo a ativação dos canais de Ca²⁺ dependentes de voltagem, gerando a redução da concentração citosólica desse íon e consequente vasodilatação (KOBUCHI et al., 2015).

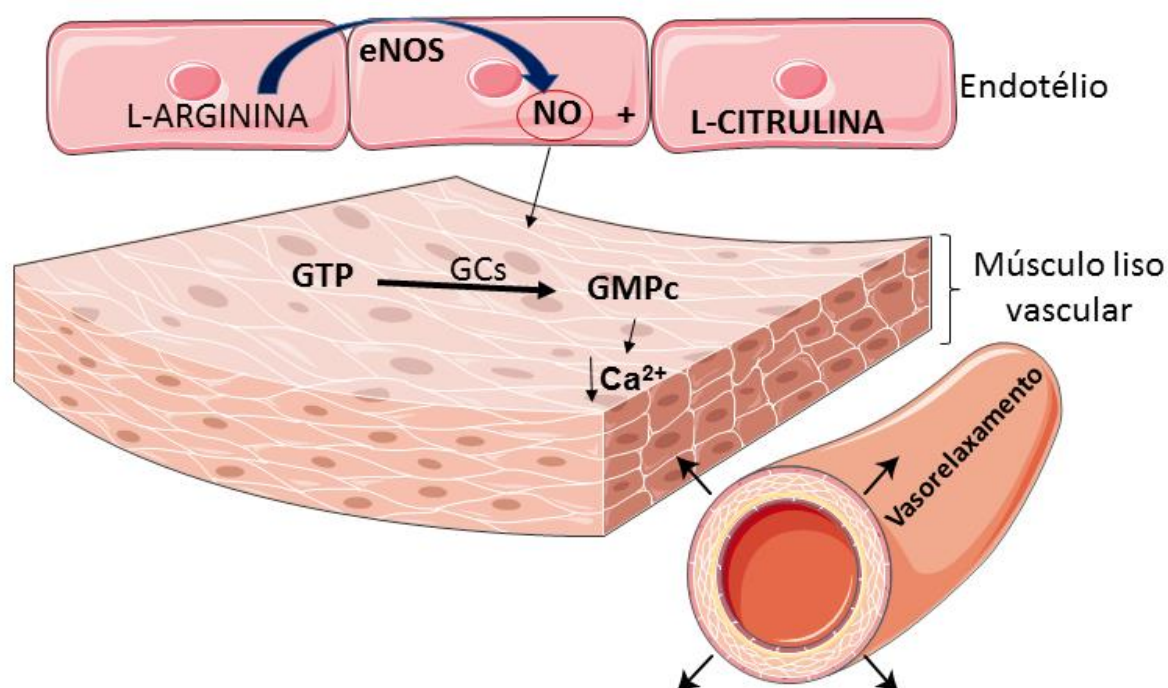
Um dos EDRF mais estudados é o NO, um radical livre, gasoso, inorgânico e incolor, extremamente lábil, com meia vida curta (1 a 2 segundos) e está envolvido na fisiopatologia de diversas condições clínicas. É sintetizado a partir do aminoácido L-arginina, por meio da enzima Óxido Nítrico Sintase (NOS), a qual se apresenta em três diferentes isoformas: NOS induzível, (iNOS), NOS neuronal (nNOS) e NOS endotelial (eNOS). Esta é expressa em cardiomiócitos, plaquetas, neurônios e mais especificamente em células endoteliais, as quais sintetizam NO em resposta a estímulos mecânicos e bioquímicos, os quais induzem a liberação de Ca²⁺ dos estoques intracelulares, com posterior ativação da eNOS e síntese de NO pelo endotélio (BONDONNO et al., 2015; MONCADA, 2006; NAVA; LLORENS, 2016).

Uma vez sintetizado, o NO difunde-se rapidamente para as células do músculo liso vascular, causando a produção de guanina monofosfato cíclico (GMPc) através da ligação ao complexo heme presente na enzima guanilato ciclase solúvel (sCG), a qual ativa a proteína cinase G (PKG). Esta, por sua vez, reduz os níveis de cálcio intracelular, com dessensibilização do aparato contrátil ao cálcio, culminando com consequentemente relaxamento da musculatura lisa vascular e vasodilatação (figura 6) (QU et al., 2015; RAMESHRAD et al., 2016).

O NO é um importante regulador metabólico e vascular, desempenhando papel importante na regulação de diversas funções fisiológicas, incluindo metabolismo celular, sinalização e secreção de insulina, inflamação, neurotransmissão, resposta imune mediada por células e vasodilatação dependente de endotélio (DE CASTRO BARBOSA et al., 2013; SENBEL et al., 2014). É descrito que indivíduos com fatores de risco cardiovascular como dislipidemia, diabetes, tabagismo e aqueles pacientes com DCV instalada apresentam um excesso de radicais livres, bem como um desequilíbrio entre a produção de mediadores

contracturantes e relaxantes, condição que caracteriza a disfunção endotelial, culminado com vasoconstrição, acúmulo de lipídeos, aumento da adesão leucocitária, proliferação de células do músculo liso vascular, agregação plaquetária, trombose, entre outros. Essa condição está associada a uma redução na biodisponibilidade do NO, descrita por ter íntima relação com a fisiopatologia das DCV, como a HAS, aterosclerose e acidente vascular cerebral (RAJENDRAN et al., 2013).

Figura 6 - Ilustração síntese e atuação do Óxido Nítrico



Representação esquemática da síntese e atuação do óxido nítrico (NO) em vaso. A síntese de NO resulta da oxidação da L-arginina, a qual é convertida em L-citrulina, sendo esta reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). Uma vez produzido o NO difunde-se através da célula endotelial e penetra nas células musculares lisas do vaso, ativando a enzima guanilato ciclase solúvel (sCG), a qual catalisa a saída de dois grupamentos fosfato da molécula de guanosina trifosfato (GTP), resultando na formação de guanosina monofosfato cíclica (GMPc). O aumento na concentração de GMPc na célula muscular resulta na diminuição do Ca^{2+} e consequente relaxamento.

Estudos recentes têm demonstrado que a liberação de NO pela célula endotelial pode ser regulada positivamente por fatores dietéticos, tendo sido descrito que os mecanismos pelos quais produtos naturais e extratos de plantas induzem o vasorelaxamento tem íntima relação com a via NO/sCG/GMPc (AUGER et al., 2016; BONDONNO et al., 2015; QU et al., 2015).

Há evidências de que as β -D-glucanas ao serem reconhecidas por receptores específicos presentes na membrana dos macrófagos (ex. Dectin-1 e TLR) exercem efeito sobre a produção de NO, através da ativação da iNOS, resultando em efeito citotóxico em células tumorais (HASHIMOTO et al., 1997; LEHTOVAARA; GU, 2011; NOVAK; VETVICKA, 2008; VOLMAN et al., 2010; WANG et al., 2014). Estudo realizado por Shin et al. (2007) demonstrou que o polissacarídeo carboximetilado derivado de *Phellinus linteus* melhorou a produção de NO de maneira concentração dependente em lavado de células broncoalveolares em comparação com a forma nativa, efeito decorrente possivelmente da adição de grupos carboximetil, os quais melhoram a solubilidade do polissacarídeo, permitindo a sua interação com receptores específicos, estimulando efetivamente a produção de NO pelos macrófagos.

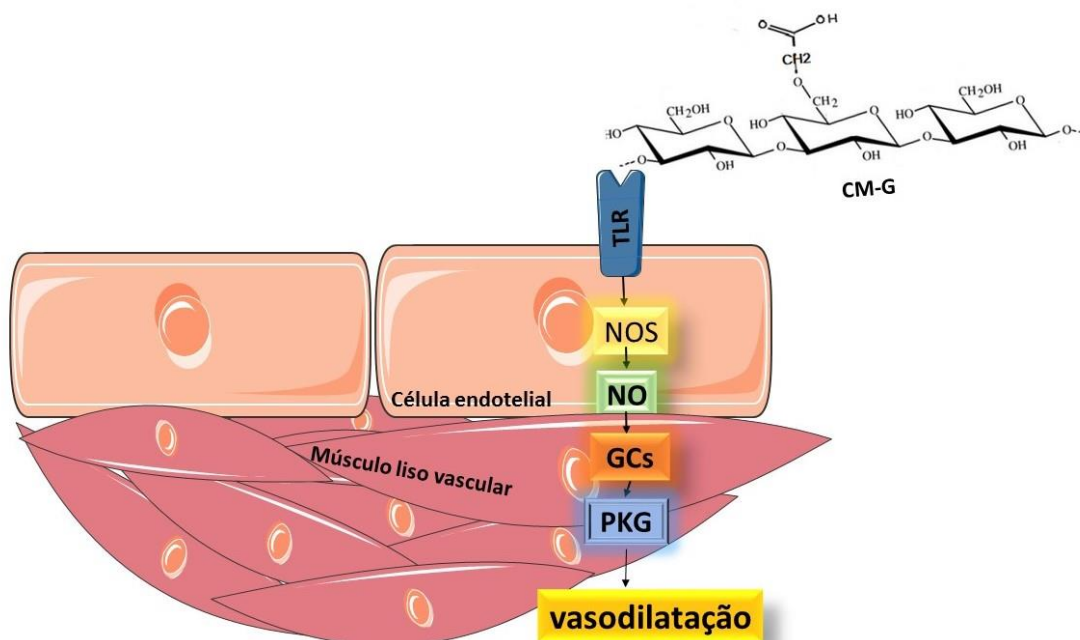
Assim como os macrófagos, as células endoteliais expressam Receptores de Reconhecimento Padrão (RRPs), dentre eles os TLR. Os leitos vasculares humanos, incluindo artéria aorta, subclávia carótida e mesentérica expressam TLR2 e TLR4. Tem sido descrito, recentemente, que estes exercem papel cardioprotetor relacionado à homeostase vascular, de maneira que a vasodilatação mediada através da síntese de NO pelo endotélio é significativamente reduzida em ratos sem os TLR4 (HARRINGTON et al., 2011; SALVADOR et al., 2016). Esse fato torna-se relevante, tendo vista que as β -D-glucanas fúngicas atuam como um PAMP, ligando-se a RRP, como os TLR, iniciando respostas imunológicas, como a liberação de citocinas (DALONSO et al., 2015), sendo possível levantar a hipótese de que esse polissacarídeo pode atuar sobre o endotélio vascular, induzindo vasodilatação por mecanismos relacionados com a ligação a RRP, mais especificamente aumentando a síntese de NO via TLR4/NO/sCG.

Nesse contexto, hipotetizamos que a CM-G de *S. cerevisiae* por suas propriedades já descritas anteriormente apresenta potencial propriedade moduladora da produção de NO pelo endotélio. De fato, o endotélio parece ser um alvo para atuação das β -D-glucanas, já que estas são modificadores da atividade biológica, especialmente atuando ativamente sobre a resposta imunológica, inclusive modulando a produção de NO (figura 7).

Tem sido descrito também que o NO, além de modular a função endotelial também tem efeitos importantes na função miocárdica, incluindo modulação na

função contrátil, energética, crescimento celular e sobrevivência. O coração é capaz de gerar NO via NOS, sendo a eNOS e a nNOS (neuronal) expressas em diferentes compartimentos subcelulares dos cardiomiócitos. Entretanto, no cardiomiócito a síntese de NO é compartimentada pelas diferentes localizações subcelulares das isoformas da NOS: a nNOS localiza-se no retículo sarcoplasmático, enquanto a iNOS é expressa principalmente no coração em falência como proteína citosólica. Além disso, a atividade dessas isoformas tem sido associada com efeitos inotrópicos opostos. Nesse sentido, tem sido postulado que a eNOS regula negativamente a corrente de cálcio através dos LTCC, pela ativação da via GMPc/PKG, enquanto nNOS pode afetar diretamente a maquinaria de reciclagem do Ca^{2+} através da nitrosilação dos RyR. Porém, a atuação do NO na contratilidade miocárdica ainda permanece controversa (GONANO et al., 2014; JANG et al., 2015; SEDDON; SHAH; CASADEI, 2007; VIELMA et al., 2016; WEGENER, 2002; ZIOLO, 2008).

Figura 7 - Possível mecanismo de atuação da CM-G no endotélio vascular via TLR/NOS/sCG



Representação esquemática do provável mecanismo de ação da CM-G em artéria aorta isolada de rato. A CM-G liga-se a receptores Toll like (TLR) expressos nas células endoteliais de vasos, desencadeando a ativação da enzima óxido nítrico sintase, a qual induz a síntese de NO na célula endotelial. Uma vez produzido o NO difunde-se através da célula endotelial e penetra nas células musculares lisas do vaso, ativando a enzima guanilato ciclase solúvel (sCG), resultando na ativação da PKG e consequente vasodilatação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 TIPO DE ESTUDO E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Farmacologia Cardiovascular, no Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarm) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Campus I, João Pessoa. Tratou-se de um estudo experimental com ensaios farmacológicos e moleculares utilizando técnicas *in vivo* e *in vitro*. Todos os protocolos desenvolvidos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPB sob parecer nº 006/2016 (anexo 1).

4.2 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), machos, com idade entre 10 e 12 semanas, pesando entre 250 e 300g, provenientes da Unidade de Produção de Animais do Instituto de Pesquisa em Medicamentos da Universidade Federal da Paraíba (IPeFarm/UFPB), onde foram mantidos sob condição controlada de temperatura de $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$, em um ciclo claro-escuro de 12 horas, alimentados com ração balanceada e água *ad libitum*. Os animais foram acomodados em gaiolas plásticas micro-isoladoras de dimensão 49x34x16 (CxLxA, em cm), contendo cada uma 4 animais no máximo.

4.3 OBTENÇÃO DA CM-G

A CM-G foi obtida a partir de creme de levedura descartado em cervejaria conforme procedimentos descritos por Magnani et al. (2009). As células de levedura foram submetidas à autólise em uma suspensão aquosa 20 % (v/v) com adição de 3 % NaCl (p/v), em pH 5.0 a 55°C em banho-maria com agitação branda (120 rpm) durante 24 horas. Em seguida, o material foi aquecido até 85°C , mantido durante 15 minutos, resfriado até 25°C e centrifugado a 4500 g, durante 10 minutos. O precipitado foi coletado e ajustado para 30 % de sólidos totais em tampão fosfato de

sódio 0,02 M, pH 7.5. A suspensão obtida foi aquecida até 121°C em autoclave, mantida durante 4 horas, resfriada a 25 °C e centrifugada a 5000g durante 10 minutos a 4 °C. O precipitado coletado foi ressuspenso em água destilada estéril (15 %) e sonificado (20 KHz, 150 W) durante 6 minutos em banho de gelo para posterior centrifugação a 4500 g durante 15 minutos a 10 °C. Feito isso, o precipitado foi coletado e submetido à extração de lipídeos em Soxhlet durante 2 horas sob refluxo, utilizando éter de petróleo como solvente. Em seguida, o material foi lavado por centrifugação três vezes com acetona 1:1 (p/v), a 4500 g durante 5 minutos. Posteriormente, foi realizado tratamento enzimático com a enzima Protemax® N200 durante 5 horas a 55 °C, pH 7,5 (0,4 U por grama de parede celular de uma suspensão aquosa a 20%). Após a proteólise foram realizadas cinco lavagens por centrifugação (4500 g por 5 minutos) com água destilada para retirada total da protease e obtenção da β -D-glucana insolúvel.

Para obter a CM-G foram adicionados 28 mL isopropanol por grama de β -D-glucana insolúvel (base seca) e o material foi mantido 30 minutos a temperatura ambiente sob agitação branda. Posteriormente, foi adicionado gota a gota 3,0 mL de hidróxido de sódio 30% por grama de sólidos secos e a mistura mantida sob agitação de 70 rpm durante 60 minutos e, em seguida, por mais 90 minutos a 140 rpm. Na sequência, foram adicionados 1,3g de ácido monocloroacético por grama de sólidos secos e o material foi mantido sob agitação de 70 rpm durante 5 horas a 65°C. Após este período, a solução foi filtrada em papel filtro 21 com metanol: ácido cético (7:3 v/v); metanol: água (4:1 v/v); metanol; acetona. O controle da derivatização da CM-G foi realizado por titulação potenciométrica (ŠANDULA, J. et al., 1999). A CM-G obtida foi dializada contra água destilada sob agitação branda, com trocas frequentes da água durante 24 e 72 horas, respectivamente, antes da liofilização. Os produtos liofilizados foram utilizados para realização dos experimentos propostos.

O material foi fornecido pelo laboratório de Processos Microbianos em Alimentos e de Bioquímica de Alimentos do Departamento de Engenharia de Alimentos, da Universidade Federal da Paraíba, para ser utilizado durante o período do estudo.

4.4 SOLUÇÕES NUTRITIVAS

4.4.1 Soluções para dissociação enzimática do miocárdio

Tabela 1 - Tyrode modificado

Sais	Concentração mM
NaCl	140,0
KCl	1,00
Glicose	10,0
MgCl ₂	1
HEPES	10,0
CaCl ₂	1,8
NaH ₂ PO ₄	0,33

Fonte: GANDHI et al., 2013

Tabela 2 - Solução base Digestion Buffer (DB)

Sais	Concentração mM
NaCl	130,0
KCl	5,4
HEPES	25,0
MgCl ₂	0,5
Glicose	22,0
NaH ₂ PO ₄	0,33

Fonte: PRÍMOLA-GOMEZ et al., 2009.

(a) pH ajustado para 7,4 com NaOH (1M).

(b) A partir da solução especificada nesta tabela, foram feitas soluções de I a IV abaixo mencionadas.

Tabela 3 - HEPES + EGTA

Sais	Concentração mM
EGTA	400,0
HEPES	25,0

Fonte: PRÍMOLA-GOMEZ et al., 2009.

(a) pH ajustado para 7,2 com NaOH (1M).

Solução I

Adicionou-se para cada 100 mL de DB 300µL de HEPES/EGTA.

Solução II

Adicionou-se para cada 25 mL de DB 20 mg de collagenase tipo II e 1,2 µL de CaCl_2 (1M), para se obter uma concentração de cálcio na solução de 0,0625 mM.

Solução III

Adicionou-se para cada 6,25 mL de DB 5 mg de collagenase tipo II e 0,6 µL de CaCl_2 a 1M, para se obter uma concentração de cálcio na solução de 0,125 mM.

Solução IV

Adicionou-se para cada 12,5 mL de DB e 3,2 µL de CaCl_2 a 1M, para se obter uma concentração de cálcio na solução de 0,25 mM.

Solução V

Adicionou-se para cada 12,5 mL de DB e 6,25 µL de CaCl_2 a 1M, para se obter uma concentração de cálcio na solução de 0,5 mM.

4.4.2 Soluções para experimentos com anéis de aorta torácica

Tabela 4 - Composição da solução de Krebs para aorta torácica isolada de rato

Sais	Concentração (mM)
NaCl	118
KCl	4,6
CaCl_2	2,5
MgSO_4	5,7
KH_2PO_4	1,1
NaHCO_3	25
Glicose	11

Fonte: GUEDES et al., 2004.

4.4.3 Soluções para experimentos com átrio isolado

Tabela 5 - Composição da solução de Krebs Henseleit (pH=7,4)

Sais	Concentração mM
NaCl	118,4
KCl	4,7
CaCl ₂	2,5
MgSO ₄	1,2
KH ₂ PO ₄	25
NaHCO ₃	1,2
Glicose	10

Fonte: NASA et al., 1992

Tabela 6 - Composição da solução de Krebs Henseleit com baixa concentração de cálcio

Sais	Concentração mM
NaCl	118,4
KCl	4,7
CaCl ₂	0,5
MgSO ₄	1,2
KH ₂ PO ₄	25
NaHCO ₃	1,2
Glicose	10

Fonte: SOUZA, 2016

4.5 ENSAIOS EXPERIMENTAIS

Os protocolos experimentais foram definidos tendo como base três blocos de testes, um primeiro em que se estudou o efeito direto da CM-G sobre a contratilidade cardíaca atrial, transiente de cálcio em cardiomiócitos ventriculares e vasorelaxamento em artéria aorta isolada de ratos. Posteriormente, foram feitos experimentos com animais sem nenhum tipo de alteração fisiopatológica, com o intuito de investigar se a suplementação com CM-G de alguma maneira condiciona o organismo de maneira protetora frente a um dano subsequente. Além disso, adição

de alimentos com alegação de propriedades funcionais ou nutracêuticos no padrão alimentar vem ganhando força, tendo em vista a sua atividade na manutenção da saúde e redução do risco de doenças crônicas (BROWN, 2015; HENRY, 2010).

Foram formados dois grupos experimentais (n=6): um controle, que recebeu solução salina como placebo por gavagem uma vez ao dia, durante 21 dias e o Carboximetil-Glucana (CM-G 50 mg/Kg/dia), suplementado com 50 mg/Kg/dia de CM-G com igual frequência e período.

Essa dose foi escolhida tendo como base a atividade protetora cardíaca da β -D-glucana, cuja suplementação com 50 mg/kg/dia foi hábil em reduzir a área infartada em modelo animal de infarto por isquemia e reperfusão (AARSAETHER, 2012).

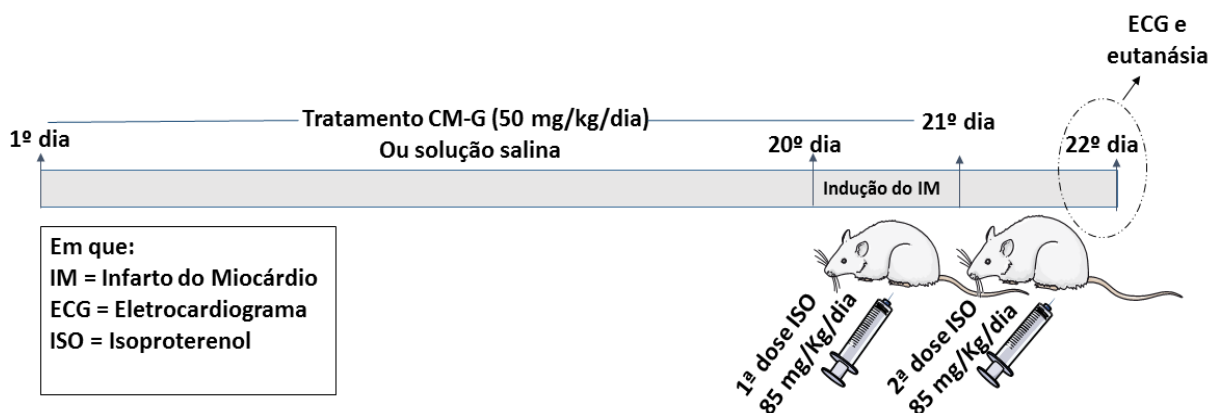
Com vistas a investigar a atuação da CM-G na prevenção de doenças cardíacas utilizou-se um modelo experimental de infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol (figura 8), no qual os animais foram randomizados em três grupos de 10 animais cada: (I) Grupo controle (C) – recebeu solução salina (via oral) uma vez o dia, durante 21 dias; (II) Grupo infartado (I); (III) Grupo infartado com suplementação de CMG (ICM-G). Estes foram suplementados com 50 mg/Kg/dia de CM-G, por gavagem, uma vez ao dia, sempre nos mesmos horários, durante 21 dias. No 20º e 21º dias de experimento foram administrados 85 mg/Kg/dia de isoproterenol por via subcutânea, com o intuito de induzir o IAM. No 22º dia, 48 h após a administração da primeira dose de isoproterenol, foi realizado o Eletrocardiograma (ECG), com posterior eutanásia e excisão do coração, em seguida, o coração removido, limpo em solução fisiológica e pesado imediatamente, para a determinação do índice de massa do coração (MARQUES et al., 2011):

$$IMC = M.\text{coração}/M.\text{corporal}$$

Em que: IMC = índice de massa do coração/ M. coração = massa do coração (mg)/ M. corporal = massa corporal total (g).

Os animais tiveram o peso corporal monitorado semanalmente, a cada três dias, nos mesmos horários, utilizando balança digital, durante todo o período de tratamento.

Figura 8 - Desenho experimental do estudo (modelo Infarto induzido por isoproterenol)



Representação esquemática do desenho experimental do estudo, demonstrando a indução do infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol em ratos. Os animais foram tratados durante 21 dias ou com CM-G (50 mg/Kg/dia) ou com solução salina. No 21º e 22º dias de experimento foram administrados 85 mg/kg de isoproterenol por via subcutânea. No 22º dia, 48 horas após a injeção da 1ª dose de isoproterenol, foi feito ECG e os animais foram eutanasiados com vistas à realização dos testes experimentais.

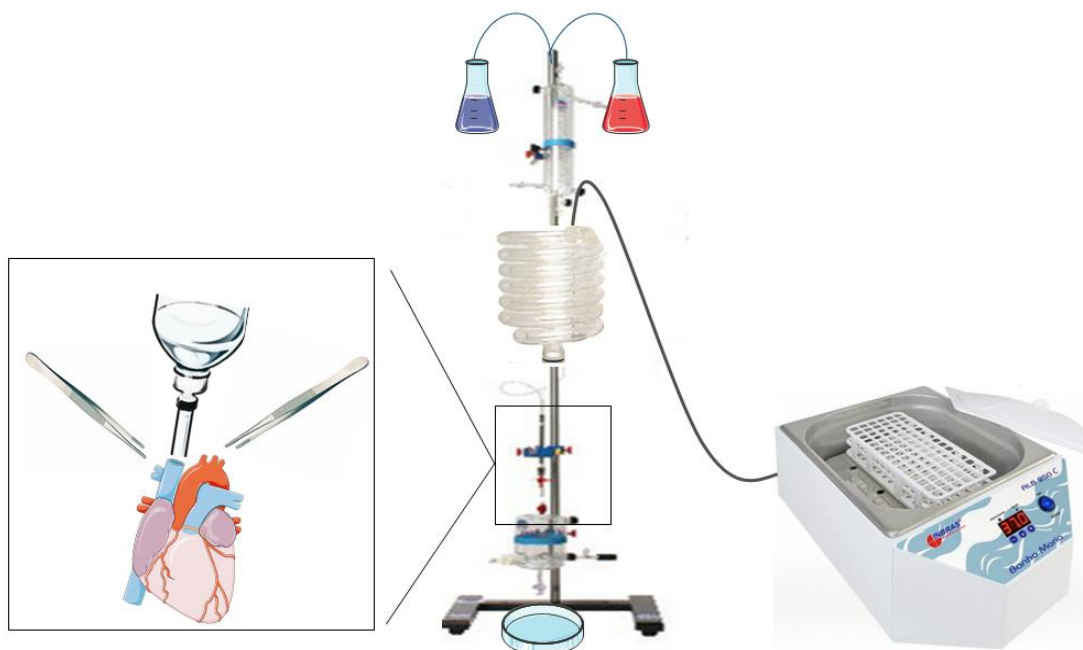
Experimentos in vitro

4.5.1 Isolamento dos cardiomiócitos

O isolamento dos cardiomiócitos foi realizado de acordo com os procedimentos descritos por Primola-Gomez et al. (2009). Após a eutanásia, o coração foi excisado por toracotomia e transferido para uma placa de vidro contendo Tyrode, onde a artéria aorta ascendente foi seccionada na altura do tronco braquicefálico e através desta o coração foi fixado com um fio de sutura a uma agulha de aço inoxidável (cânula) e acoplada a uma seringa de 1 mL contendo solução (HEPES+EGTA – solução I) necessária para remoção do sangue das coronárias. A seguir, o coração foi transferido para um sistema de Langendorff adaptado (figura 1) e perfundido com solução de isolamento (*Digestion buffer* + EGTA, tabela 3) a 37°C e em um fluxo constante, a fim de remover o sangue contido nas coronárias, reduzir a concentração extracelular de cálcio, interromper as atividades do marcapasso cardíaco e cessar a contratilidade do órgão, com vistas à dissociação das células com mais facilidade.

Em seguida, iniciou-se o processo de digestão enzimática, perfundindo o órgão com solução II contendo collagenase por cerca de 10 a 20 minutos para destruição das fibras colágenas extracelulares. Após esse período, separaram-se os átrios dos ventrículos e estes foram repicados (embebidos em solução contendo collagenase) e a eles adicionada a solução III. Esta mistura foi homogeneizada durante 3 minutos em banho-maria a uma temperatura de 37°C, filtrada e levada à centrífuga (1 minuto, 600 rpm, temperatura ambiente). Após a centrifugação descartou-se o sobrenadante e as células foram ressuspensas em solução IV, contida em tubo falcon. Após três minutos, o material foi recentrifugado, o sobrenadante foi removido e as células ressuspensas em solução V, as quais foram levadas à centrífuga, o sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas em Tyrode (tabela 1), permanecendo aí até serem utilizadas. Durante os experimentos somente as células com formato bem definido (bordas direita e esquerda), relaxadas em repouso e sem apresentar contrações involuntárias foram utilizadas. Os registros foram sempre feitos entre uma e quatro horas após o isolamento.

Figura 9 - Ilustração esquemática sistema de Langendorff adaptado para isolamento de cardiomiócitos ventriculares



Representação esquemática do aparato adaptado para isolamento dos cardiomiócitos ventriculares isolados de ratos, onde o coração, após cuidadosamente removido foi fixado a uma agulha de aço inoxidável para perfusão e limpeza, com subsequente digestão enzimática.

4.5.1.2 Medida de transiente de cálcio e contratilidade de cardiomiócitos ventriculares

A obtenção das medidas de transiente de cálcio e contratilidade cardíaca foram feitas de acordo com Wisloff et al. (2001). Inicialmente as células foram colocadas em uma placa de acrílico adaptada posicionada em microscópio de fluorescência (Nikon-eclipse Ti-S, Nikon, Japão) equipado com câmera de aquisição de imagens (Nikon DS- U3 Digital câmera control, Japão) e fonte de luz ultravioleta (Nikon intensilight C-HGFI). Para medida das propriedades mecânicas dos cardiomiócitos ventriculares, esses foram estimulados eletricamente (pulsos de 5ms de duração, 1Hz e temperatura ambiente), através de eletrodos posicionados em ambos os lados da câmara, sendo possível acompanhar a variação da distância entre as bordas, medida pelo *software NIS-Elements* e expressa pelo índice de contratilidade (% de encurtamento celular). Todas as medidas foram feitas utilizando lentes/objetivas 40x/0.60 (Nikon S Plan Fluor, Japão). Em um mesmo dia foram utilizadas células controle e células incubadas durante 30 minutos com diferentes concentrações de CM-G (10 µg/mL; 100 µg/mL e 300 µg/mL) ou células de animais tratados com CM-G (50 mg/Kg/dia) ou solução salina.

Para medida do transiente de cálcio, utilizou-se um indicador fluorescente de cálcio (Ca^{2+}), o Fluo-4 acetoximetil-ester (Fluo-4 AM, Molecular Probes, MO, Estados Unidos). Os cardiomiócitos isolados foram marcados durante 35 minutos com 5µM de Flúor-4 em temperatura ambiente e sob agitação constante. Em seguida, para que o excesso da sonda fosse removido, as células foram centrifugadas (1 minuto, 600 rpm, temperatura ambiente) e ressuspensas em solução Tyrode a 1,8 mM de Ca^{2+} (tabela 1). O Flúor-4 foi excitado com comprimento de onda de 488nm e a intensidade de emissão foi medida a 510 nm. As variações na intensidade de fluorescência foram expressas pela razão F/F_0 , em que F_0 representa a média da medida de fluorescência basal entre as contrações celulares, na fase diastólica cardíaca e F a média da fluorescência máxima após os estímulos, na fase sistólica. As imagens foram analisadas no software ImageJInk.

4.5.2 Preparação de átrio isolado de ratos

Após eutanásia, o átrio esquerdo foi cuidadosamente removido, suspenso verticalmente em hastes metálicas e mantido em cubas contendo 10 mL de solução Krebs-Henseleit (tabela 5), mantidos a temperatura de 37° C, aerados com uma mistura de 95% de O₂ e 5% de CO₂ (carbogênio; White Martins, Brasil) e acoplado a um transdutor de força (MLT020, ADInstruments, Austrália). Cada átrio foi submetido a uma tensão inicial de 0,55g, por um período de pelo menos 30 minutos, durante o qual a solução nutritiva era trocada a cada 10 minutos, para evitar o acúmulo de metabólitos (MERINO et al., 2015).

O átrio esquerdo, por não apresentar o nodo sino-atrial, foi estimulado eletricamente por meio de eletrodos de platina, por pulsos retangulares a uma frequência de 3Hz, duração de 3ms e voltagem de 1,5 vezes o limiar de excitação (Panlab, Harvard, EUA). O efeito inotrópico foi registrado por um transdutor de força conectado ao sistema de aquisição de dados LabChart (ML870/P, versão 7.0, AD Instruments, Austrália).

4.5.2.1 Estudo dos efeitos inotrópico da CM-G em átrio isolado de ratos

Após o período de estabilização, foram adicionadas ao banho concentrações cumulativas de CM-G (1µg/mL – 3000 µg/mL), com vistas ao estudo do efeito inotrópico, o qual foi calculado a partir da amplitude de contração do átrio esquerdo, respectivamente, antes (controle) e após a adição da CM-G. A frequência controle foi registrada no início do experimento e considerada como 100%.

4.5.2.2 Avaliação do efeito da CM-G sobre resposta inotrópica positiva do cálcio

Para avaliar a resposta da CM-G sobre o efeito inotrópico positivo causado pelo cálcio nas células do miocárdio atrial, foram levantadas curvas concentração-resposta adicionando-se cumulativamente o CaCl₂ ao banho de forma a atingir os níveis extracelulares desejados (0,5 a 7,0 mM). Para aumentar o efeito inotrópico positivo do Ca⁺², a concentração de CaCl₂ na solução de Krebs-Henseleit foi

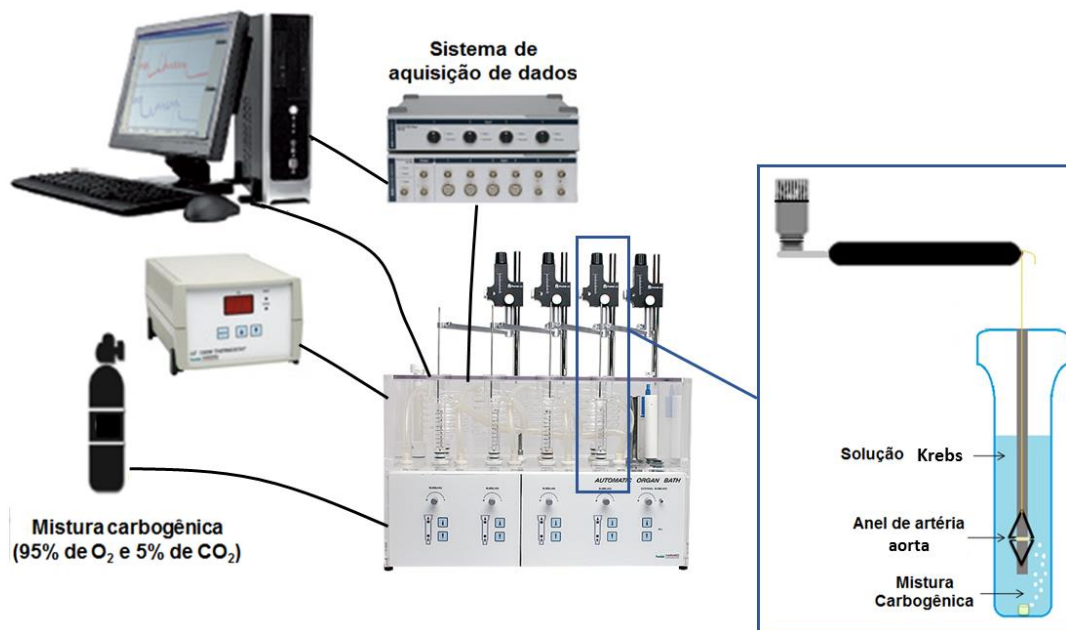
reduzida para 0,5 mM (tabela 6). A força atrial foi medida em situação controle e após 30 minutos de incubação com CM-G (3000 µg/mL). Para cada situação, foi levantada a curva da resposta inotrópica em função do logaritmo da concentração extracelular de CaCl_2 .

4.5.3 Estudo da reatividade vascular

4.5.3.1 Preparação de anéis de aorta torácica de rato

Os animais foram eutanasiados e, por meio toracotomia, a artéria aórtica torácica foi identificada, cuidadosamente removida e imediatamente posta em placa de petri contendo solução de Krebs (tabela 4) a 4°C. Posteriormente, todo o tecido conectivo perivascular foi removido e a aorta foi segmentada em anéis de 1 a 2 milímetros de comprimento. Duas hastes metálicas foram transpassadas na luz do vaso, suspensas verticalmente por linhas de algodão, as quais foram fixadas a um transdutor de força (MLT020, AD Instruments, Austrália) e imersas em cubas contendo 10 mL de solução Krebs, a 37 °C, aeradas com uma mistura de 95% de O_2 e 5% de CO_2 (carbogênio; White Martins, Brasil). As variações na tensão das preparações foram obtidas através de polígrafo digital modelo PowerLab (AD Instruments, Austrália), e registrados através do software LabChart versão 7.0 (AD Instruments, Austrália) (Figura 10). Todos os anéis foram submetidos a uma tensão basal de aproximadamente 1,0 g, por um período de estabilização de 60 minutos (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980), com troca da solução nutritiva a cada 15 minutos e ajuste da linha de base, quando necessário (ALTURA; ALTURA, 1970).

Figura 10 - Ilustração banho de órgãos para montagem de artéria aorta isolada de ratos



Representação esquemática de sistema de banho de órgãos para montagem de aortas isoladas de ratos. Estas foram fixadas a transdutores de força e imersas em cubas com solução nutritora, aeradas com mistura carbogênica. As variações na tensão eram obtidas por polígrafo digital e registradas por meio de *software* específico. Fonte: adaptado MACHADO-CALZERRA, 2016.

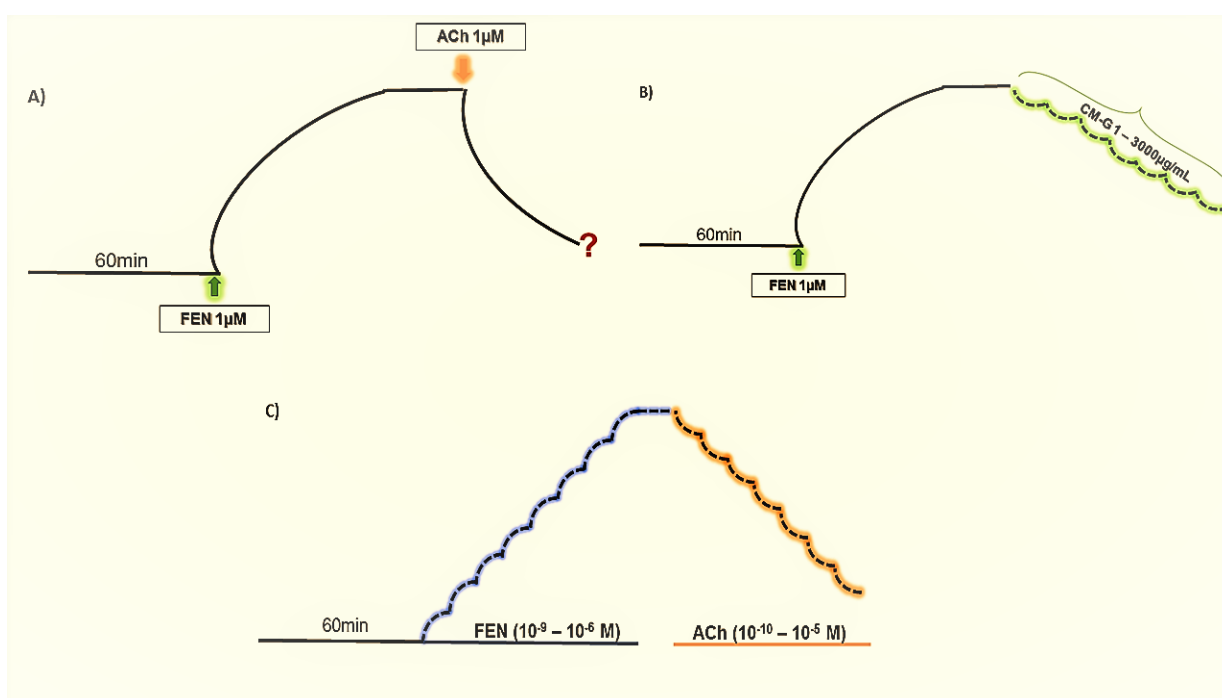
Para verificar a viabilidade do tecido e presença da funcionalidade do endotélio, após o período de estabilização, foi obtida uma contração com PHE (1 μ M). Na fase tônica da contração, a ACH (1 μ M) foi adicionada à cuba para avaliar a integridade do endotélio vascular. Anéis sem endotélio funcional foram obtidos pela remoção mecânica da camada endotelial através de fricção mecânica entre a haste e a parede interna do vaso. O endotélio vascular foi considerado íntegro quando os anéis aórticos apresentaram relaxamento induzido pela ACH superior a 70% sobre a pré-contração com 1 μ M de PHE e a retirada do endotélio foi confirmada quando o relaxamento foi inferior a 10% (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980) (figura 11A).

4.5.3.2 Estudo da participação do endotélio vascular no relaxamento induzido pela CM-G

Para verificar o efeito da CM-G em anéis de aorta utilizaram-se anéis com e sem endotélio funcional. Após a adição de fenilefrina (1 μ M) às preparações,

aguardou-se a formação do platô contrátil induzido por esse vasoconstritor, adicionando-se ao banho concentrações crescentes e cumulativas CM-G (1, 3, 10, 30, 100, 300, 500, 1000 e 3000 $\mu\text{g/ml}$). O tempo entre a adição de uma concentração e outra variou conforme a estabilização da resposta vascular ao polímero, com intervalo máximo de 30 minutos (figura 11B). Nos vasos isolados de animais tratados com CM-G ou salina foram obtidas curvas concentração-resposta para PHE (10^{-9} - 10^{-6}M) e para ACh (10^{-10} - 10^{-5}M) (figura 11C).

Figura 11 - Ilustração experimentos de reatividade vascular em artéria aorta de rato



(A) Verificação da viabilidade do tecido e integridade do endotélio vascular. (B) efeito de concentrações crescentes de CM-G sobre a reatividade vascular. (C) Efeito do tratamento com CM-G por 21 dias (50 mg/Kg/dia) sobre a reatividade vascular.

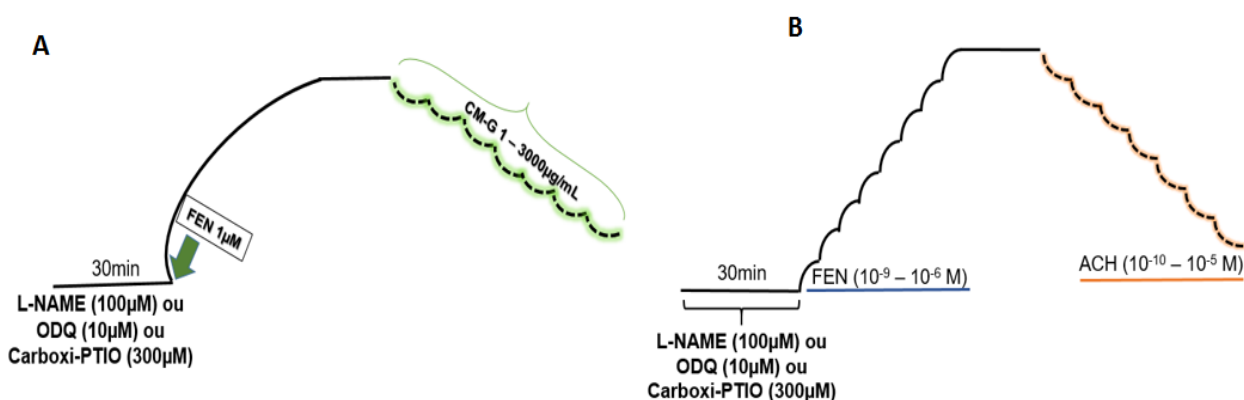
4.5.3.3 Análise da participação da via do óxido nítrico e guanilato ciclase solúvel no efeito vasorelaxante da CM-G em anéis de aorta

Foram obtidas curvas concentração-efeito para a CM-G em anéis de aorta com endotélio funcional, a fim de identificar o envolvimento da via do óxido nítrico no vasorelaxamento induzido por esse polímero. Para tanto, cada anel foi incubado separadamente, durante 30 minutos com o inibidor não seletivo da enzima óxido nítrico sintase, L-NAME (100 μM), ou carboxi-PTIO (300 μM), um sequestrador de

NO exógeno, ou o inibidor seletivo da guanilato ciclase solúvel ODQ (10 μ M). Feito isto, foi promovida uma contração com fenilefrina (1 μ M), ainda na presença destas substâncias e, sobre o platô contrátil, foram adicionadas concentrações crescentes e cumulativas de CM-G (1, 3, 10, 30, 100, 300, 500, 1000 e 3000 μ g/ml), sendo os efeitos relaxantes obtidos na presença e ausência destas drogas comparados.

Do mesmo modo, foram obtidas curvas concentração-resposta para PHE (10^{-9} - 10^{-6} M) e para ACH (10^{-10} - 10^{-5} M) na presença e na ausência de L-NAME (100 μ M) ou carboxi-PTIO (300 μ M) ou ODQ (10 μ M) nos vasos isolados de animais tratados com CM-G ou com solução salina (figura 12A a 12C).

Figure 12 - Ilustração dos experimentos de participação do endotélio no efeito induzido pela CM-G



(A) Estudo da participação da via óxido nítrico (NOS/NO/cGS) no efeito direto induzido pela CM-G em artéria aorta isolada de ratos. (B) Estudo da participação da via óxido nítrico (NOS/NO/cGS) induzido pela CM-G (50 mg/Kg/dia) após tratamento por 21 dias.

Experimentos in vivo

4.6.1 Eletrocardiograma (ECG)

Após um período de 48h da primeira dose de isoproterenol, com jejum noturno de 12h, os ratos foram anestesiados com cetamina (75mg/kg) e xilasina (15mg/Kg) via intraperitoneal. Para realização do registro do ECG foram implantados eletrodos subcutaneamente (OLIVARES et al., 2007), nos membros superiores e

inferiores do animal, utilizando a derivação DII do eletrocardiógrafo BIOAMP (AD instruments®, Austrália) para obtenção da altura do segmento ST e frequência cardíaca. Os registros digitais foram avaliados com utilização de software Labchart (AD instruments®, Austrália).

Figura 13 - Representação esquemática do eletrocardiograma em ratos

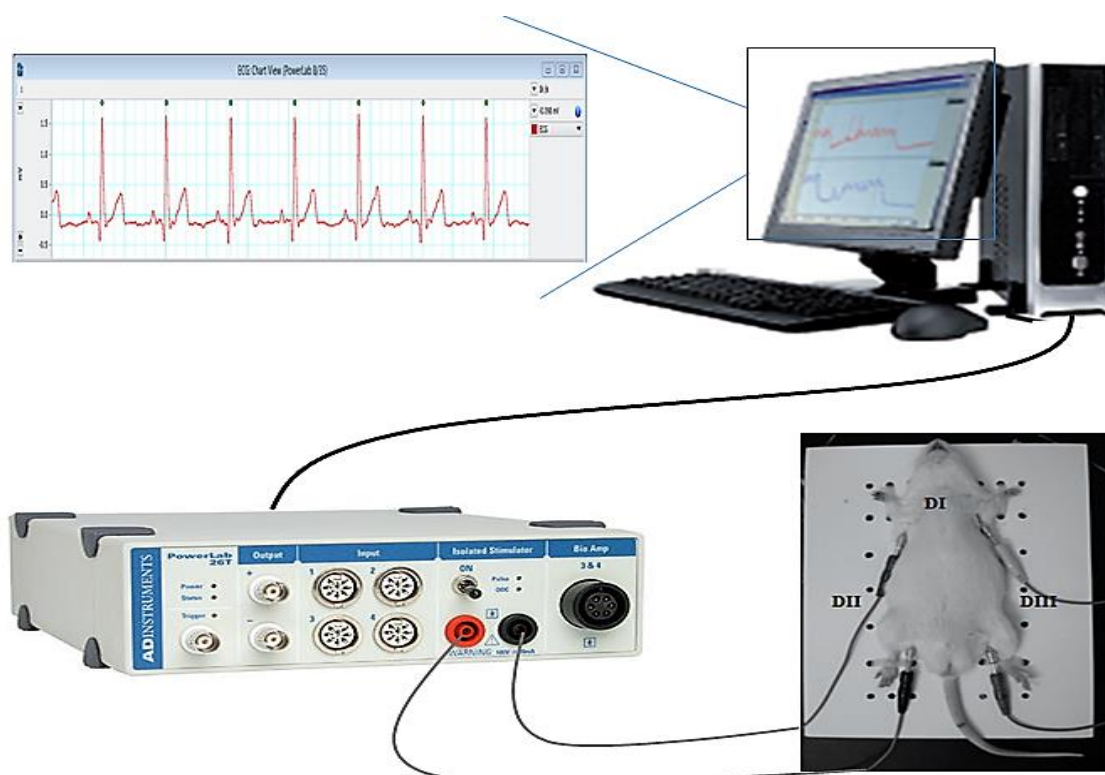


Ilustração do eletrocardiograma (ECG) ratos. Utilizou-se o registro do ECG na derivação DII para calcular voltagem do seguimento ST (PowerLab, ADInstruments, Austrália). Eletrodos foram implantados subcutaneamente nos membros superiores e inferiores dos animais e conectados a um amplificador Bioamp (ADInstruments, Austrália) e digitalizados com um conversor A/D PowerLab (ADInstruments, Austrália). Os registros digitais foram analisados com o programa Chart para Windows (ADInstruments, Austrália).

4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram expressos como média $\pm$ E.P.M (Erro Padrão da Média). Os testes t de Student não pareado e a análise de variância ordinária (ANOVA) foram utilizados para avaliar a diferença entre as médias quando comparados dois grupos e três ou mais grupos, respectivamente. Os valores foram considerados

estatisticamente significantes quando $p < 0,05$. Os valores de pD_2 (logaritmo negativo da concentração capaz de produzir 50% de efeito da resposta máxima) foram obtidos através de regressões não lineares das curvas traçadas a partir dos valores percentuais das respostas induzidas em cada experimento *in vitro*. Os valores de resposta máxima ($E_{m\acute{a}x}$) para cada experimento foram expressos como percentagem do relaxamento máximo do tônus induzido por PHE (100%). Todas as análises estatísticas foram feitas usando o software Graphpad Prism 6.0®.

5 REFERÊNCIAS

AARSAETHER, E. et al. Cardioprotective effect of pretreatment with beta-glucan in coronary artery bypass grafting. **Scandinavian Cardiovascular Journal**, v. 40, n. 5, p. 298-304, Oct 2006.

AARSAETHER, E. et al. Oral beta-glucan reduces infarction size and improves regional contractile function in a porcine ischaemia/reperfusion model. **European Journal Cardiothorac Surgery**, v. 41, n. 4, p. 919-25, Apr 2012.

AKILA, P.; VENNILA, L. Chlorogenic acid a dietary polyphenol attenuates isoproterenol induced myocardial oxidative stress in rat myocardium: An in vivo study. **Biomedicine Pharmacotherapy**, v. 84, p. 208-214, Sep 19 2016.

AKRAMIENE, D. et al. Effects of beta-glucans on the immune system. **Medicina (Kaunas)**, v. 43, n. 8, p. 597-606, 2007.

ALTURA, B. M.; ALTURA, B. T. Differential effects of substrate depletion on drug-induced contractions of rabbit aorta. **American Journal Physiology**, v. 219, p. 1698-1705, 1970.

AOKI, S. et al. Oral administration of the β -glucan produced by *Aureobasidium pullulans* ameliorates development of atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 22-27, 2015.

ARAUJO, V. B. et al. Oral Intake of Carboxymethyl-Glucan (CM-G) from Yeast (*Saccharomyces uvarum*) Reduces Malondialdehyde Levels in Healthy Men. **Molecules**, v. 20, n. 8, p. 14950-8, Aug 14 2015.

AUGER, C. et al. Potential of Food and Natural Products to Promote Endothelial and Vascular Health. **Journal Cardiovascular Pharmacology**, v. 68, n. 1, p. 11-8, Jul 2016.

AVLAS, O. et al. Toll-like receptor 4 stimulation initiates an inflammatory response that decreases cardiomyocyte contractility. **Antioxidant Redox Signal**, v. 15, n. 7, p. 1895-909, Oct 01 2011.

BERS, D. M. Cardiac Excitation-contraction coupling **Nature**, v. 415, n. 10, p. 198-204, 2002.

BEZERRA, L. S. M. et al. Modulation of vascular function and anti-aggregation effect induced by (1 $\rightarrow$ 3) (1 $\rightarrow$ 6)- β -d-glucan of *Saccharomyces cerevisiae* and its carboxymethylated derivative in rats **Pharmacological Reports**, 2017.

BONDONNO, C. P. et al. Dietary flavonoids and nitrate: effects on nitric oxide and vascular function. **Nutre Review**, v. 73, n. 4, p. 216-35, Apr 2015.

BORCHANI, C. et al. Structural Characterization, Technological Functionality, and Physiological Aspects of Fungal beta-D-glucans: A Review. **Critical Reviews Food Science Nutrition**, v. 56, n. 10, p. 1746-52, Jul 26 2016.

BOYD, J. H. et al. Toll-like receptor stimulation in cardiomyocytes decreases contractility and initiates an NF-kappaB dependent inflammatory response. **Cardiovascular Research**, v. 72, n. 3, p. 384-93, Dec 01 2006.

CHAN, G. C; CHAN, W. K.; SZE, D. M. The effects of β -glucan on human immune and cancer cells. **Journal of hematology & oncology**, v. 2, n. 1, p. 1-11, 2009.

CHEN, J.; SEVIOUR, R. Medicinal importance of fungal beta-(1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6)-glucans. **Mycological Research**, v. 111, n. Pt 6, p. 635-52, Jun 2007.

CHU, L.-Y.; LIOU, J.-Y.; WU, K. K. Prostacyclin protects vascular integrity via PPAR/14-3-3 pathway. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 118–119, p. 19-27, 2015.

COSTA, A. G.; MAGNANI, M.; CASTRO-GOMEZ, R. J. H. Obtenção e caracterização de extrato contendo manoproteínas da parede celular de levedura descartada em cervejaria. **Acta Scientiarum - Biological Science**, v. 34, n. 1, 2011.

DALONSO, N.; GOLDMAN, G. H.; GERN, R. M. beta-(1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-Glucans: medicinal activities, characterization, biosynthesis and new horizons. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 99, n. 19, p. 7893-906, Oct 2015.

DAVLOUROS, P. A. et al. Calcium Homeostasis and Kinetics in Heart Failure. **Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 2, p. 151-61, 2016.

DE CASTRO BARBOSA, T. et al. L-Arginine enhances glucose and lipid metabolism in rat L6 myotubes via the NO/ c-GMP pathway. **Metabolism**, v. 62, n. 1, p. 79-89, Jan 2013.

DERBALI, A. et al. Cardioprotective effect of linseed oil against isoproterenol-induced myocardial infarction in Wistar rats: a biochemical and electrocardiographic study. **Journal of Physiology Biochemistry**, v. 71, n. 2, p. 281-8, Jun 2015.

DING, J. et al. Optimised methodology for carboxymethylation of (1 $\rightarrow$ 3)- β -d-glucan from Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and promotion of mechanical activation. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 48, n. 2, p. 253-259, 2013.

EL ENSHASY, H. A.; HATTI-KAUL, R. Mushroom immunomodulators: unique molecules with unlimited applications. **Trends Biotechnology**, v. 31, n. 12, p. 668-77, Dec 2013.

FANG, L. et al. Systemic inflammatory response following acute myocardial infarction. **Journal of Geriatric Cardiology**, v. 12, n. 3, p. 305-12, May 2015.

FISH, J. E.; MARSDEN, P. A. Endothelial nitric oxide synthase: insight into cell-specific gene regulation in the vascular endothelium. **Cellular and Molecular Life Science**, v. 63, n. 2, p. 144-62, Jan 2006.

FRASCARELLI, S. et al. Cardioprotective effect of 3-iodothyronamine in perfused rat heart subjected to ischemia and reperfusion. **Cardiovascular Drugs Therapy**, v. 25, n. 4, p. 307-13, Aug 2011.

FURCHGOTT; ZAWADZKI. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373-6, Nov 27 1980.

GAO, Y. et al. Salvia miltiorrhiza (Danshen) inhibits L-type calcium current and attenuates calcium transient and contractility in rat ventricular myocytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 158 Pt A, p. 397-403, Dec 02 2014.

GARG, M. K., DEEPA. Exploration of pharmacological interventions to prevent isoproterenol-induced myocardial infarction in experimental models. **Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease**, p. 1-15, 2014.

GIAVASIS, I. Bioactive fungal polysaccharides as potential functional ingredients in food and nutraceuticals. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 26, p. 162-73, Apr 2014.

GONANO, L. A. et al. Hypotonic swelling promotes nitric oxide release in cardiac ventricular myocytes: impact on swelling-induced negative inotropic effect. **Cardiovascular Research**, v. 104, n. 3, p. 456-66, Dec 01 2014.

GORSKI, P. A.; CEHOLSKI, D. K.; HAJJAR, R. J. Altered myocardial calcium cycling and energetics in heart failure--a rational approach for disease treatment. **Cell Metabolism**, v. 21, n. 2, p. 183-94, Feb 03 2015.

GUAN, S. et al. Effects of total flavones from Acanthopanax senticosus on L-type calcium channels, calcium transient and contractility in rat ventricular myocytes. **Phytotherapy Research**, v. 29, n. 4, p. 533-9, Apr 2015.

GUEDES, D. N. et al. Calcium antagonism and the vasorelaxation of the rat aorta induced by rotundifolone. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 1881-1887, 2004.

GURBEL, P. A. et al. Platelet activation in myocardial ischemic syndromes. **Expert Review of Cardiovascular Therapy**, v. 2, n. 4, p. 535-45, 2004.

HARRINGTON, L. S. et al. Reduced endothelial dependent vasodilation in vessels from TLR4(-/-) mice is associated with increased superoxide generation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 408, n. 4, p. 511-5, May 20 2011.

HASHIMOTO, T. et al. Enhanced production of inducible nitric oxide synthase by beta-glucans in mice. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 19, n. 2, p. 131-5, Oct 1997.

HONG, F. et al. Mechanism by Which Orally Administered α -1,3-Glucans Enhance the Tumoricidal Activity of Antitumor Monoclonal Antibodies in Murine Tumor Models. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 2, p. 797-806, 2004.

JAMOIS, F. et al. Glucan-like synthetic oligosaccharides: interactive synthesis of linear oligo-b-(1,3)-glucans and immunostimulatory effects. **Glycobiology**, v. 15, p. 393-407, 2005.

JANG, J. H. et al. Identification of a novel splice variant of neuronal nitric oxide synthase, nNOS β , in myofilament fraction of murine cardiomyocytes. **Nitric Oxide**, v. 50, p. 20-27, Aug 11 2015.

KAGIMURA, F. Y. et al. Biological activities of derivatized D-glucans: a review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 588-98, Jan 2015.

KHAN, A. A. et al. Structural, thermal, functional, antioxidant & antimicrobial properties of beta-d-glucan extracted from baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)-Effect of gamma-irradiation. **Carbohydrate Polymers**, v. 140, p. 442-50, Apr 20 2016.

KOBUCHI, S. et al. Nitric oxide modulation of endothelium-derived hyperpolarizing factor in agonist-induced depressor responses in anesthetized rats. **European journal of pharmacology**, v. 762, p. 26-34, 2015.

KOGAN, G. S., et al. Increased efficiency of Lewis lung carcinoma chemotherapy with a macrophage stimulator—yeast carboxymethyl glucan. **International Immunopharmacology**, v. 2, p. 775-781, 2002.

KOROLENKO, T. A. et al. Influence of atorvastatin and carboxymethylated glucan on the serum lipoprotein profile and MMP activity of mice with lipemia induced by poloxamer 407. **Canadian Journal of Physiology Pharmacology**, v. 90, n. 2, p. 141-53, Feb 2012.

KUSMIATI; DHEWANTARA, F. X. Cholesterol-Lowering Effect of Beta Glucan Extracted from *Saccharomyces cerevisiae* in Rats. **Scientia Pharmaceutica**, v. 84, n. 1, p. 153-65, Jan-Mar 2016.

LEHTOVAARA, B. C.; GU, F. X. Pharmacological, structural, and drug delivery properties and applications of 1,3-beta-glucans. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 59, n. 13, p. 6813-28, Jul 13 2011.

LI, C. et al. Modulating Toll-like receptor mediated signaling by (1 $\rightarrow$ 3)-beta-D-glucan rapidly induces cardioprotection. **Cardiovascular Research**, v. 61, n. 3, p. 538-47, Feb 15 2004.

LIU, X. et al. A new isolation method of β -d-glucans from spent yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Hydrocolloids**, v. 22, n. 2, p. 239-247, 2008.

LOBO DE ANDRADE, D. M. et al. Vasorelaxant and Hypotensive Effects of Jaboticaba Fruit (*Myrciaria cauliflora*) Extract in Rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 696135, 2015.

MACHADO-CALZERRA, N.T. Liofilizado do vinho tinto do Vale do Rio São Francisco reduz o estresse oxidativo e melhora as alterações vasculares, cardíacas e plaquetárias em modelo animal de hipertensão. 2017. tese (Doutorado em produtos naturais e sintéticos). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

MACHOVÁ, E. C., ALZBETA; BYSTRICKY, PETER Effect of carboxymethylation on antioxidant properties and radicaldegradation of mannans and glucans. **Carbohydrate Polymers**, v. 112, p. 603-607, 2014.

MAGNANI, M. et al. Optimized methodology for extraction of (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)- β -d-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* and in vitro evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of the corresponding carboxymethyl derivative. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, n. 4, p. 658-665, 2009.

MAGNANI, M. et al. Protective effect of carboxymethyl-glucan (CM-G) against DNA damage in patients with advanced prostate cancer. **Genet Mol Biol**, v. 34, n. 1, p. 131-5, Jan 2011.

MAGNANI, M.; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H. Beta-glucana de *Saccharomyces cerevisiae*: constituição, bioatividade e obtenção. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n. 3, p. 631-650, 2008.

MERINO, B.; QUESADA, I.; HERNANDEZ-CASCALES, J. Glucagon Increases Beating Rate but Not Contractility in Rat Right Atrium. Comparison with Isoproterenol. **PLoS One**, v. 10, n. 7, p. e0132884, 2015.

MONCADA, S. H., E.A. Nitric Oxide and the Vascular Endothelium. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 176, p. 213-254, 2006.

MONTECUCCO, F.; CARBONE, F.; SCHINDLER, T. H. Pathophysiology of ST-segment elevation myocardial infarction: novel mechanisms and treatments. **European Heart Journal**, v. 37, n. 16, p. 1268-83, Apr 21 2016.

MORAN, A. E. et al. 1990-2010 global cardiovascular disease atlas. **Global Heart**, v. 9, n. 1, p. 3-16, Mar 2014.

NAKAMURA, K. et al. Beta-Blockers and Oxidative Stress in Patients with Heart Failure. **Pharmaceuticals (Basel)**, v. 4, n. 8, p. 1088-100, Aug 05 2011.

NASA, Y.; ICHIARA, K.; YOSHIDA, R.; ABIKO, Y. Positive inotropic and negative chronotropic effects of (-)-cis-diltiazem in rat isolated atria. **British Journal of Pharmacology**, v.105, n. 3, p. 696-702, março. 1992.

NAVA, E.; LLORENS, S. The paracrine control of vascular motion. A historical perspective. **Pharmacological Research**, v. 113, n. Pt A, p. 125-145, Nov 2016.

NOVAK, M.; VETVICKA, V. Beta-glucans, history, and the present: immunomodulatory aspects and mechanisms of action. **Journal of Immunotoxicology**, v. 5, n. 1, p. 47-57, Jan 2008.

OHNO, N. et al. Effect of beta-glucans on the nitric oxide synthesis by peritoneal macrophage in mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 19, n. 4, p. 608-12, Apr 1996.

OLIVARES, E. L. et al. Cellular cardiomyoplasty in large myocardial infarction: can the beneficial effect be enhanced by ACE-inhibitor therapy? **European Journal of Heart Fail**, v. 9, n. 6-7, p. 558-67, Jun-Jul 2007.

PRATHAPAN, A. et al. Polyphenol rich ethanolic extract from *Boerhavia diffusa* L. mitigates angiotensin II induced cardiac hypertrophy and fibrosis in rats. **Biomedicine Pharmacotherapy**, v. 87, p. 427-436, Jan 06 2017.

PIEGAS, L. S. et al. Acute coronary syndrome behavior: results of a Brazilian registry. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 100, n. 6, p. 502-10, Jun 2013.

PISAREVA, E. E. et al. Role of changes in serum chitotriosidase activity in mice under conditions of hyperlipidemia and lipid-lowering effect of carboxymethylated (1-3)-beta-D-glycan. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 157, n. 5, p. 555-9, Sep 2014.

PRÍMOLA-GOMES, T. N. et al. Exercise capacity is related to calcium transients in ventricular cardiomyocytes. **Journal of Applied Physiology**, v. 107, n. 2, p. 593-598, 2009.

QU, Z. et al. Antihypertensive and vasorelaxant effects of *Rhizoma corydalis* and its active component tetrahydropalmatine via NO/cGMP pathway and calcium channel blockade in isolated rat thoracic aorta. **RSC Advances**, v. 5, n. 114, p. 94130-94143, 2015.

RAHAR, S. et al. Preparation, characterization, and biological properties of beta-glucans. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research**, v. 2, n. 2, p. 94-103, Apr 2011.

RAJENDRAN, P. et al. The vascular endothelium and human diseases. **International Journal of Biological Sciences** v. 9, n. 10, p. 1057-69, 2013.

RAMESHRAD, M. et al. Rat aorta as a pharmacological tool for in vitro and in vivo studies. **Life Sciences**, v. 145, p. 190-204, Jan 15 2016.

SADREDINI, M. et al. Beta-Adrenoceptor Stimulation Reveals Ca²⁺ Waves and Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Depletion in Left Ventricular Cardiomyocytes from Post-Infarction Rats with and without Heart Failure. **PLoS One**, v. 11, n. 4, p. e0153887, 2016.

SALUK-JUSZCZAK, J.; KROLEWSKA, K.; WACHOWICZ, B. Response of blood platelets to beta-glucan from *Saccharomyces cerevisiae*. **Platelets**, v. 21, n. 1, p. 37-43, 2010.

_____. (1 $\rightarrow$ 3)-beta-D-Glucan inhibits a dual mechanism of peroxynitrite stroke. **International Journal Biological Macromolecules**, v. 48, n. 3, p. 488-94, Apr 01 2011.

SALUK, J. et al. (1 $\rightarrow$ 3)-beta-D-Glucan reduces the damages caused by reactive oxygen species induced in human platelets by lipopolysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 97, n. 2, p. 716-24, Sep 12 2013.

SALVADOR, B. et al. Modulation of endothelial function by Toll like receptors. **Pharmacological Research**, v. 108, p. 46-56, Apr 09 2016.

SAMUELSEN, A. B.; SCHREZENMEIR, J.; KNUTSEN, S. H. Effects of orally administered yeast-derived beta-glucans: a review. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 58, n. 1, p. 183-93, Jan 2014.

ŠANDULA, J. et al. Microbial (1 $\rightarrow$ 3)- β -d-glucans, their preparation, physico-chemical characterization and immunomodulatory activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 38, n. 3, p. 247-253, 3// 1999.

ŠANDULA, J., KOGAN, G., KAČURÁKOVÁ, M., MACHOVÁ, E. . Microbial (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucans, their preparation, physico-chemical characterization and immunomodulatory activity. **Carbohydrate polymers**, v. 38, n. 3, p. 247-253, 1999.

SANTOS, C. X.; RAZA, S.; SHAH, A. M. Redox signaling in the cardiomyocyte: From physiology to failure. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 74, p. 145-51, May 2016.

SEDDON, M.; SHAH, A. M.; CASADEI, B. Cardiomyocytes as effectors of nitric oxide signalling. **Cardiovascular Research**, v. 75, n. 2, p. 315-26, Jul 15 2007.

SENBEL, A. M. et al. Evaluation of l-arginine on kidney function and vascular reactivity following ischemic injury in rats: protective effects and potential interactions. **Pharmacological Reports**, v. 66, n. 6, p. 976-83, Dec 2014.

SHADRIN, I. Y.; KHODABUKUS, A.; BURSAC, N.; Striated muscle function, regeneration, and repair. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.73, n. 22, p. 4175-4202, 2016.

SHIN, J.-Y. et al. Structural and biological study of carboxymethylated Phellinus linteus polysaccharides. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 9, p. 3368-3372, 2007.

SOUZA, D.S. Envolvimento dos canais para cálcio tipo-L na resposta cardiodepressora do farnesol em coração de rato. 2016. Dissertação (Mestrado em ciências fisiológicas), Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão.

SUCHAL, K. et al. Kampeferol protects against oxidative stress and apoptotic damage in experimental model of isoproterenol-induced cardiac toxicity in rats. **Phytomedicine**, v. 23, n. 12, p. 1401-1408, Nov 15 2016.

THOMPSON, I. J.; OYSTON, P. C.; WILLIAMSON, D. E. Potential of the beta-glucans to enhance innate resistance to biological agents. **Expert Review Anti-Infective Therapy**, v. 8, n. 3, p. 339-52, Mar 2010.

UPAGANLAWAR, A.; PATEL, V.; BALARAMAN, R. Tomato lycopene attenuates myocardial infarction induced by isoproterenol: Electrocardiographic, biochemical and anti-apoptotic study. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 5, p. 345-351, 2012.

VISSERS, L. E. et al. The relationship between the dietary inflammatory index and risk of total cardiovascular disease, ischemic heart disease and cerebrovascular disease: Findings from an Australian population-based prospective cohort study of women. **Atherosclerosis**, v. 253, p. 164-170, Oct 2016.

VOLMAN, J. J. et al. Dietary (1-->3), (1-->4)-beta-D-glucans from oat activate nuclear factor-kappaB in intestinal leukocytes and enterocytes from mice. **Nutrition Research**, v. 30, n. 1, p. 40-8, Jan 2010.

WALACHOWSKI, S. T., GUILLAUME; FOUCRAS, G. Triggering Dectin-1-Pathway Alone Is Not Sufficient to Induce Cytokine Production by Murine Macrophages. **PloS one**, v. v. 11, n. n. 2, p. p. e0148464, 2016.

WALLIS, R.; GHARANEI, M.; MADDOCK, H. Predictivity of in vitro non-clinical cardiac contractility assays for inotropic effects in humans--A literature search. **J Pharmacological Toxicology Methods**, v. 75, p. 62-9, Sep-Oct 2015.

WANG, E. F., Y.; ZOU, L.; LI, Y.; BUYS, E.S.; HUANG, P.; BROUCKAERT, P.; CHAO, W. Toll-like Receptor 4 Signaling Confers Cardiac Protection Against Ischemic Injury via Inducible Nitric Oxide Synthase- and Soluble Guanylate Cyclase-dependent Mechanisms. **Anesthesiology**, v. 114, n. 3, p. 603-613, 2011.

WANG, H. et al. In vivo immunological activity of carboxymethylated-sulfated (1-->3)-beta-D-glucan from sclerotium of *Poria cocos*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 79, p. 511-7, Aug 2015.

WANG, S. et al. beta-Glucan attenuates inflammatory responses in oxidized LDL-induced THP-1 cells via the p38 MAPK pathway. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 24, n. 3, p. 248-55, Mar 2014.

WILCKEN, D. E. L. Physiology of the normal heart. **Basic science**, v. 33, n. 2, 2014.

WISLØFF, U. L., et al. Increased contractility and calcium sensitivity in cardiac myocytes isolated from endurance trained rats. **Cardiovascular Research** v. 50, p. 495-508, 2001.

WU, Y. S. et al. Beta 1,3/1,6-glucan and vitamin C immunostimulate the non-specific immune response of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Fish Shellfish Immunol**, v. 57, p. 269-77, Oct 2016.

XU, X. E. A. β -Glucan from *Saccharomyces cerevisiae* reduces lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW264. 7 macrophages. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. v. 1820, n. n. 10, p. p. 1656-1663, 2012., 2012.

YOUNG-TECK KIMA, E.-H. K. et al. Structural characterization of β -d-(1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 6)-linked glucans using NMR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 328, n. 3, p. 331-341, 2000.

ZECHER-KRPAN, V. et al. Characterization of β -Glucans Isolated from Brewer's Yeast and Dried by Different Methods. **Biotechnology**, v. 48, n. 2, p. 189-197, 2010.

ZHU, F.; DU, B.; XU, B. A critical review on production and industrial applications of beta-glucans. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 275-288, 2016.

ZIMA, A. V.; BLATTER, L. A. Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters. **Cardiovascular Research**, v. 71, n. 2, p. 310-21, Jul 15 2006.

ZIOLO, M. T. The fork in the nitric oxide road: cyclic GMP or nitrosylation? **Nitric Oxide**, v. 18, n. 3, p. 153-6, May 2008.

APÊNDICES

Apêndice 1 - Original article

CARBOXYMETHYLGLUCAN EXTRACTED FROM *Saccharomyces cerevisiae* INDUCES VASODILATION MEDIATED BY THE NOS/NO/SCG PATHWAY AND NEGATIVE INOTROPIC EFFECT

Journal: Pharmacological research

ISSN: 1043-6618

FI: 2,108

CARBOXYMETHYL-GLUCAN EXTRACTED FROM *Saccharomyces cerevisiae* INDUCES VASODILATION MEDIATED BY THE NOS/NO/SCG PATHWAY AND NEGATIVE INOTROPIC EFFECT

ABSTRACT

Introduction: carboxymethyl-glucans are derived solubles of β -D-glucans, which are polymers of glucose found mainly in the cell wall of yeast as in *Saccharomyces cerevisiae*; they are known to be biologically active molecules presenting immunomodulation, antioxidant and platelet anti-aggregation activity. However, studies on its activities in the vessels, as well as evidences of cardio-protection are still scarce. Thus, this study evaluated the effect of carboxymethyl-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* on vascular and cardiac function in rats.

Methods: We studied direct effects of CM-G on vascular reactivity, the responses dependent on the cumulative concentrations of CM-G in rings pre-contracted PHE, with and without endothelium. We Investigated the mechanisms of action involved, with blockers L-NAME, ODQ and carboxy-PTIO. Atrial contractility and transient calcium in ventricular cardiomyocytes were studied. Experiments were designed with healthy animals which were divided into two groups: one treated orally with CM-G at a dose of 50 mg/Kg, daily, during 21 days; and another with saline solution. Were obtained concentration-response curves for PHE (10^{-9} - 10^{-6} M) and ACH (10^{-10} - 10^{-5} M) in the presence and absence of the blockers referred to above. Afterwards, experiments were carried out using an animal model of acute myocardial infarction induced by isoproterenol.

Results: CM-G provoked endothelium dependent vasorelaxant effect. This effect was significantly reduced in pre-incubated rings with L-NAME, ODQ, carboxy-PTIO and endothelium remotion. Treatment with CM-G (50 mg/Kg/day) for 21 days increased the effectiveness of ACH induced relaxation. CM-G had a negative inotropic effect in atrium. In ventricular cardiomyocytes isolated, induced reduction in the calcium transient.

Conclusions: The results show that CM-G positively modulated the vascular endothelium, leading to relaxation in the rat aorta pathway NOS/NO/SCGs, in addition to acting on the myocardium, inducing a negative inotropic effect.

Keywords: β -D-glucan, *Saccharomyces cerevisiae*, carboxymethyl-glucan, vascular reactivity, negative inotropic effect, myocardial infarction.

Chemical compounds studied in this article: N-nitro-L-arginine methyl ester (Pubchem CID: 39836; 1-H-[1,2,4]oxadiazolol[4.3-a]quinoxaline-1-one (Pubchem CID: 1456); 2-(4-Carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3- potassium oxide salt (Pubchem CID: 2733503); FLUO-4 (Pubchem CID: 25058176); isoproterenol hydrochloride (Pubchem CID: 5807).

1 INTRODUCTION

β -D-glucans are glucose polymers found mainly in the cell wall of yeast such as *Saccharomyces cerevisiae*. They are structurally formed by monomers of glucose organized around a central chain through glycosidic linkages in position β (1 $\rightarrow$ 3) and branches of varying sizes in β (1 $\rightarrow$ 6) [1-4]. Much of the production of this yeast is discarded in the baking and brewing industries [3]. However, these polymers contain the enormous possibility of generating biological activity, especially in relation to their immunomodulatory action, which is well recognized even in the recovery of patients with cancer [3, 5, 6].

Their insolubility in aqueous medium is a limiting factor for use in studies evaluating their biological activity or therapeutic applicability. Thus, chemically modified derivatives were developed, such as the carboxymethyl-glucan (CM-G), which has better solubility, absorption, distribution, and bioavailability, enhancing its pharmacological potential when compared to the polymer of origin [7, 8].

This polysaccharide has been described as operating in various biological systems, exercising antioxidant, antimutagenic, anti-genotoxic, anti-cancerogenous and immunomodulating activities [3, 4, 8, 9]. In addition to these effects, research has shown that CM-G also exerts a considerable protective effect on the cardiovascular system besides platelet anti-aggregant activity, which reduces chances of thrombosis, and improves vessel responsiveness to vasoactive NO-dependent relaxant agonists. [10]. That shows the potential of this polymer with respect to the prevention of cardiovascular diseases (CVD).

Studies developed with linear and branched forms of β -D-glucans, point to action on Dectin-1 and Toll-like receptors, only latter found in endothelial cells, as well as in cardiomyocytes [11-16]. In this way the vascular and cardioprotective activity of CM-G may arise from its action on these receptors. To date, research on the performance of CM-G in the cardiovascular system is scarce, with little exploration of its effects on vascular endothelium, mechanisms of action and cardioprotective properties. In this context, the aim of this study was to evaluate the activity of CM-G from *S. cerevisiae* on blood vessels, as well as to investigate its properties on cardiac function, elucidating possible mechanisms of action involved.

2 MATERIALS AND METODS

2.1 Obtaining CM-G

In accordance with the procedures described by Magnani et al. (2009)[17], CM-G was obtained from *S. cerevisiae* yeast cream discarded in breweries. The CM-G used in this study had a molecular weight of 220 kDa, and its degree of substitution was 0.8. The derivation of CM-G from β -D-glucan was performed using monochloroacetic acid (MCA) to achieve the degree of substitution (DS) 0.8, considering the solubility and bi-activity of the DS observed in previous studies made by our research group. The DS measurement was determined using potentiometric titration with potassium hydroxide solution (Šandula et al., 1999). The chemical identities of the polymers, as well as their structural modifications, were confirmed by infrared (IR) analyses and Magnetic Resonance Spectroscopy [17, 18].

2.2 Animals

We used male Wistar rats (*Rattus norvegicus*), aged between 10 and 12 weeks, weighing between 250 - 300g, from the Prof. Thomas George vivarium of the Instituto de Medicina e Pesquisa da Universidade Federal da Paraíba (IPeFarm/UFPB), were kept under controlled conditions of pressure and temperature ($21 \pm 1^\circ\text{C}$), under a 12 hour light-dark cycle (6:00 – 18:00 hours), with free access to water and balanced feed. All experiments were conducted in accordance with Brazilian Federal Law No. 11794/08, which defines the procedures for scientific use of laboratory animals, and approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of UFPB (CEUA 006/2016).

2.3 Reagents and materials

Sodium bicarbonate (NaHCO_3), Sodium Dihydrogen Phosphate (NaH_2PO_4), sodium chloride (NaCl), calcium chloride (CaCl_2), potassium chloride (KCl), Magnesium chloride (MgCl_2), magnesium sulfate (MgSO_4), potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4), HEPES and glucose; phenylephrine hydrochloride (PHE),

acetylcholine hydrochloride (ACH); N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME); 1-H-[1,2,4]oxadiazolol[4.3-a]quinoxaline-1-one (ODQ), and 2-(4-Carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3- potassium oxide salt (carboxy-PTIO), and (+/-) - isoproterenol hydrochloride were obtained from Sigma-Aldrich (São Paulo, Brazil). Xylazine and ketamine were acquired from Syntec (São Paulo, Brazil); FLUO-4 was purchased from Molecular Probes (MO, United States); collagenase type II was acquired from Worthington biochemical (Lakewood, NJ).

2.4 Design and experimental protocol

For evaluation of the cardiovascular effects of CM-G we adopted three experimental approaches. Initially, we evaluated the direct effect of the polymer on the reactivity of the thoracic aorta of rats, as well as on contractility and calcium transient in isolated atrium and ventricular cardiomyocytes, respectively, subsequently, we evaluated the effect of CM-G in the same organs, in treated rats. The animals were divided into two groups (n=8): the control group, which received saline solution as a placebo and the CM-G group, which received 50 mg/kg/day of CM-G orally for 21 days. In other set of experiments, we studied the effect of CM-G supplementation in prevention of myocardial infarction induced by isoproterenol, in which animals were randomized into three groups (n=8): the control group, which received a saline solution once a day for 21 days; the infarcted group (ISO), which received a saline solution once a day for 21 days and the infarcted group received supplementation at 50 mg/kg/day of CM-G, for 21 days (CM-G+ISO). The animals of these last two groups received 85 mg/kg/day of isoproterenol subcutaneously on days 20 and 21 of the experiment with the aim of inducing Acute Myocardial Infarction (AMI). All animals were anesthetized with ketamine (75 mg/kg) and xylazine (15mg/kg) before the experimental protocols.

2.5 Preparation of the rat thoracic aorta rings

The animals were euthanized and, through a thoracotomy, the anterior thoracic aorta was identified, carefully removed, and immediately immersed in Krebs solution (118 mM NaCl; 4.6 mM KCl; 2.5 mM CaCl₂; 5.7 mM MgSO₄; 1.1 mM

KH₂PO₄; 25 mM NaHCO₃; and 11 mM glucose) at 4°C. Subsequently, all of the connective tissue was removed, and the aorta was divided into rings of from 1 to 2 millimeters in length. Two metallic rods were inserted into the lumen of the vessel, suspended vertically, fixed to a force transducer (MLT020, AD Instruments, Australia), and immersed in a bath of isolated organs containing 10 mL of Krebs solution, at 37 °C, aerated with a carbogenic mixture of 95% O₂ and 5% CO₂ (White Martins, Brazil). All of the rings were subjected to a basal tension of approximately 1.0 g, for a stabilization period of 60 minutes [19], with nutrient solution exchange every 15 minutes, and baseline adjustment when necessary [20]. To verify the viability of the tissue after the stabilization period contraction with PHE (1 µM) was performed. In the tonic phase of the contraction, ACH (1 µM) was added to assess the vascular endothelium integrity. Rings without functional endothelium were obtained by mechanical removal of the endothelial layer through mechanical friction between the rod and the inner wall of the vessel. The vascular endothelium was considered healthy when the aortic rings showed relaxation as induced by ACH exceeding 70% above pre-contraction with PH (1 µM), and withdrawal of the endothelium was confirmed when relaxation was less than 10% [21]. The isometric preparation tension variations were obtained by means of a digital polygraph; model PowerLab (AD Instruments, Australia) and recorded by the software LabChart version 7.0 (AD Instruments, Australia).

2.5.1 Evaluation of the effect vasorelaxant of CM-G *in vitro*

To demonstrate the role of the endothelium in the relaxation mediated by CM-G, the responses dependent on the cumulative concentrations of CM-G (1, 3, 10, 30, 100, 300, 500, 1000 and 3000 µg/ml) were detected in aortic rings contracted with PHE (1 µM), with and without endothelium. In addition, rings with endothelium were pre-incubated for 30 minutes, before contraction with PHE (1 µM), with a non-selective nitric oxide synthase inhibitor, L-NAME (100 µM), or carboxy-PTIO scavenger (300 µM), or a selective inhibitor of soluble guanylate cyclase ODC (10 µM). From the vessels isolated from animals treated with CM-G or saline were obtained concentration-response curves for PHE (10⁻⁹-10⁻⁶M) and ACH (10⁻¹⁰-10⁻⁵M) in the presence and absence of the blockers referred to above.

2.6 Isolation of the left rat atrium

The left atrium was carefully removed, suspended vertically on metallic rods and kept in tanks containing 10 mL of Krebs-Henseleit solution, kept at a temperature of 37°C, aerated with a carbogenic mixture 95% O₂ and 5% CO₂ (White Martins, Brazil), and attached to a force transducer (MLT020, ADInstruments, Australia), then subjected to an initial tension of 0.55 g, for a period of at least 30 minutes, during which the nutrient solution was changed every 10 minutes [22]. The atrium was stimulated electrically by means of platinum electrodes, with square wave pulses at a frequency of 3 Hz, duration of 3ms and tension of 1.5 times the excitation threshold (Panlab, Harvard University, USA). The inotropic effect was recorded by a force transducer connected to the LabChart (ML870/P data acquisition system, version 7.0, AD Instruments, Australia).

2.6.1 Study of the inotropic effect of CM-G in isolated rat atriums

After the stabilization period, cumulative concentrations of CM-G (1µg/mL - 3000 µg/mL) were added to the bath, with a view to study the inotropic effect, which was calculated using the contraction amplitude, both before (basal control) and after the addition of the polymer. The control frequency was recorded at the beginning of the experiment and considered as 100%.

2.6.2 Evaluation of the effect of CM-G on positive inotropic calcium response

To evaluate the effect of CM-G on the positive inotropic response caused by Ca²⁺ in the cells, we built concentration-response curves cumulatively adding the CaCl₂ to the bath (0.5 to 7.0 mM). The amplitude of contraction induced by cumulative addition of CaCl₂ was measured before (control), and after pre-incubation for 30 minutes with the CM-G (3000 µg/mL). For each situation, the curve of the inotropic response as a function of the logarithm of the extracellular CaCl₂ matrix concentration was determined.

2.7 Isolation of cardiomyocytes

After euthanasia of the animals, the heart was quickly removed and ventricular cardiomyocytes were isolated enzymatically according to the procedures described by Prímola-Gomez et al. (2009)[23]. Briefly, the hearts were mounted on a Langendorff system adapted and perfused for 5 min at 37°C, with a solution free of Ca^{2+} (pH 7.4, containing in mM: NaCl 130, KCl 5.4, HEPES 25, MgCl_2 0.5, glucose 22, NaH_2PO_4 0.33). Then, the hearts were perfused during 10-20 min with a solution containing type II collagenase. The ventricles were cut into small pieces and filtered. The filtrate was then suspended in solutions with increasing concentrations of Ca^{2+} (0.3 to 1.8 mM) and centrifuged. The supernatant was discarded and the *pellet* was suspended in a solution of Tyrode's solution (containing in mM: NaCl 140, KCl 1, glucose 10, MgCl_2 1, HEPES 10, CaCl_2 1.8, NaH_2PO_4 0.33) and maintained at room temperature until they were used. Only cells in the form of rods with left and right edges well delineated, relaxed at rest, and not presenting involuntary contractions were used. Recording were made within one to four hours of isolation.

2.7.1 Measuring cardiomyocyte contractility and calcium transient

Obtaining measurements of calcium transient and contractility of cardiomyocytes was done in accordance with Wisløff et al. (2011)[24]. Initially the isolated cardiomyocytes were placed on a sheet of acrylic adapted with electrodes on both sides of the tank, positioned in an inverted microscope (Nikon eclipse- Ti-S, Nikon, Japan) equipped with a camera to acquire images (Nikon DS- U3 Digital Camera control, Japan), and a source of ultraviolet light (Nikon *intensilight* C-HGFI, Japan). To measure the mechanical properties of ventricular cardiomyocytes, they were stimulated electrically (pulses of 5ms in duration, at 1Hz), at ambient temperature, it was possible to observe the distance variations between the edges, as measured by the NIS software-Elements D and expressed through the contractility index (% of cell shortening). All measurements were made using 40x/0.60 lens (Nikon S Plan Fluor). To measure the calcium transient, the cardiomyocytes were marked during 35 minutes with 5 μM of Fluo-4 AM in ambient temperature and under

constant agitation. On the same day control cells and cells incubated for 30 minutes with differing concentrations of CM-G (10 µg/mL, 100 µg/mL, and 300 µg/mL), or cells of animals treated with CM-G (50 mg/Kg/day) or with saline solution, were used. Variations in fluorescence intensity were expressed by the ratio F/F_0 , in which “ F_0 ” represents the average measure of basal fluorescence between cellular contractions and “ F ” an average of the maximum fluorescence after stimulation in the contracting phase. The images were analyzed using the ImageJlnk software.

2.8 Electrocardiogram (ECG) and heart mass index

The animals of the control group, ISO and CM-G+ISO were intraperitoneally anesthetized with ketamine (75 mg/kg) and xylazine (15mg/kg) at 48 h from the first dose of isoproterenol or saline solution, and fasting for 12h. To perform the ECG recordings, electrodes were implanted subcutaneously in the upper and lower limbs of the animals [25], using derivation DII of the electrocardiograph BIOAMP (AD instruments®, Joao Pessoa, Brazil), for obtaining the height of the ST segment and the heart rate. The digital records were evaluated using Labchart (AD instruments®) software. The mass of the heart was calculated using the ratio between the total weight of the heart (mg) and the animal's weight (g)[26].

2.9 Statistical analysis

The data were expressed as mean $\pm$ S.E.M (standard error of the mean). Non-paired Student t test and analysis of variance (ANOVA) were used to evaluate potential differences between the averages when comparing two groups and three or more groups, respectively. The differences were considered statistically significant when $p < 0.05$. The values of PD_2 (negative logarithm of concentration capable of producing 50% of the maximum response) were obtained from nonlinear regressions of the concentration response curves as plotted from the percentage values of the responses induced in each *in vitro* experiment. The calculation of PD_2 was only done when E_{max} was greater than 50%. All statistical analyses were performed using Graphpad Prism 6.0®.

3 Results

3.1 Characterization of the vasorelaxant effect of CM-G

As shown in figure 1A, in the preparations with endothelium-intact, the vascular tension induced by PHE was reduced by dependent-concentration CM-G, reaching a maximum value of $69.13 \pm 8.18\%$, while the aortic rings endothelium-denuded, despite CM-G also inducing concentration dependent relaxation, the maximum value was $35.26 \pm 5.86\%$ ($p < 0.05$, $n=6$).

To assess the influence of vascular endothelium in the relaxant response induced by CM-G, we evaluated the effect in the presence of L-NAME, ODQ and carboxy-PTIO. The efficacy such relaxation as dependent on endothelium induced by CM-G was significantly reduced in rings pre-incubated with L-NAME ($E_{max} = 30.91 \pm 3.66\%$, $n=6$), and ODQ ($E_{max} = 19.57 \pm 4.08\%$, $n=5$), and carboxy-PTIO ($E_{max} = 21.19 \pm 3.42\%$, $n=6$) as compared with the control ($E_{max} = 69.13 \pm 8.18\%$, $n=6$, $p < 0.05$) (Figure 1B, 1C, 1D, respectively).

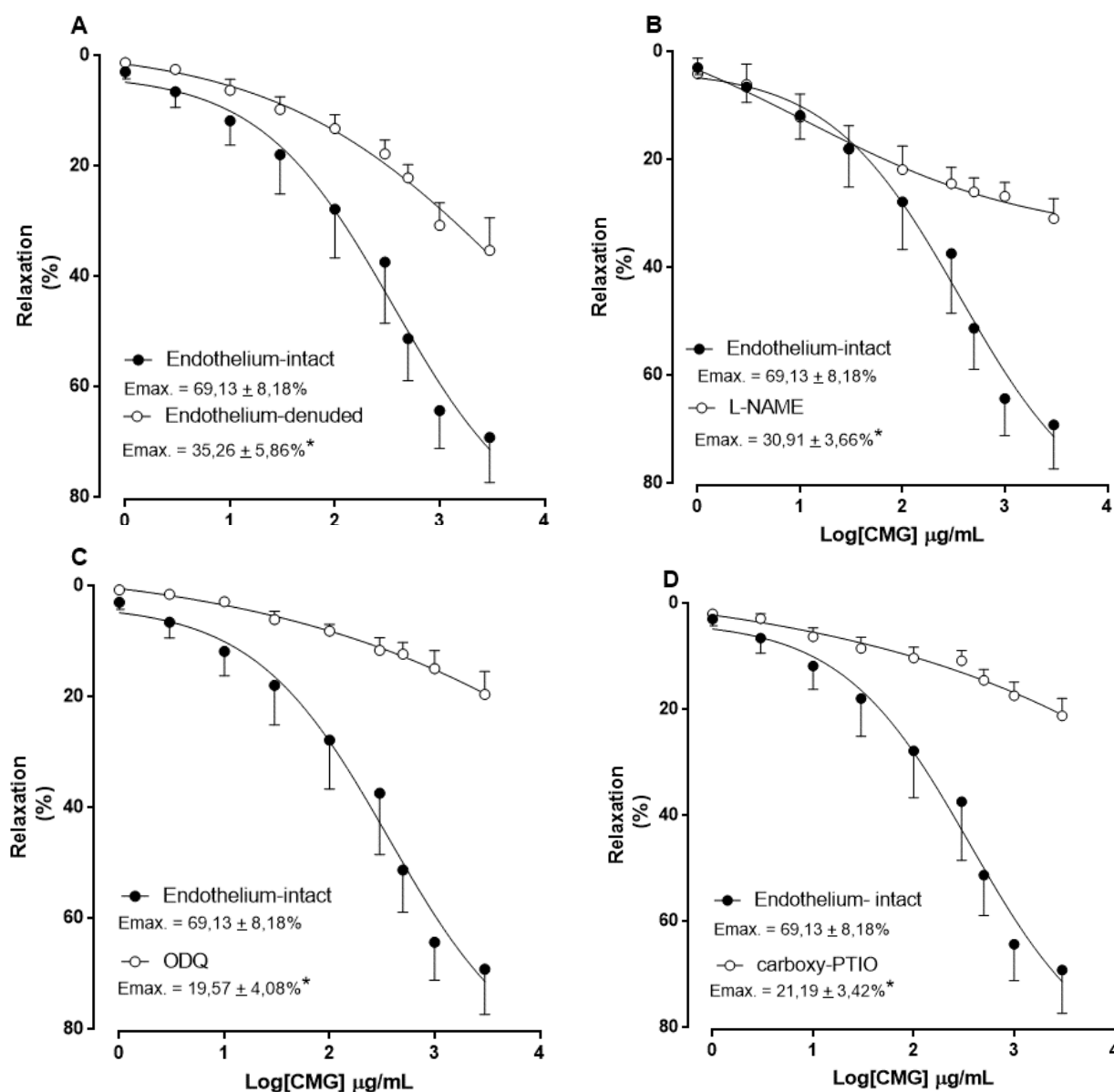


Figure 1: Concentration-response curve of the vasorelaxant effect induced by CM-G in rings of the thoracic aorta of rats contracted with PHE (1 μM). (A) In the presence (n=6) and absence (n=6) of functional endothelium. (B) In the presence or absence of L-NAME 100 μM (n=6) (C) In the presence and absence of ODQ 10 μM (n=6) (D) In the presence and absence of carboxy-PTIO 300 μM (n=5). *p<0.05 (Endothelium-intact vs Endothelium-denuded) or vs control.

3.2 Effect of CM-G treatment on vascular reactivity

Adding increasing and cumulative PHE concentrations (10⁻⁹-10⁻⁶M) induced concentration dependent contraction in aortic rings of the control group and the group treated with CM-G (50 mg/Kg/day). Treatment with CM-G promoted reduction in the

potency ($pD_2 = 7.103 \pm 0.06$, $E_{max} = 111.55 \pm 1.99\%$, $n=8$) when compared with the control group ($pD_2 = 6.85 \pm 0.09$, $E_{max} = 150.9 \pm 3.67\%$, $n=8$; $p<0.05$) (Figure 2A).

The relaxation induced by ACH (10^{-10} - 10^{-5} M) was increased in aortic rings of animal treated with CM-G ($pD_2 = 5.56 \pm 0.14$, and $E_{max} = 90.10 \pm 3.71\%$, $n=11$) compared with the control group ($pD_2 = 4.18 \pm 0.35$, $n=9$, $E_{max} = 69.87 \pm 4.27\%$, $p<0.05$) (Figure 2B).

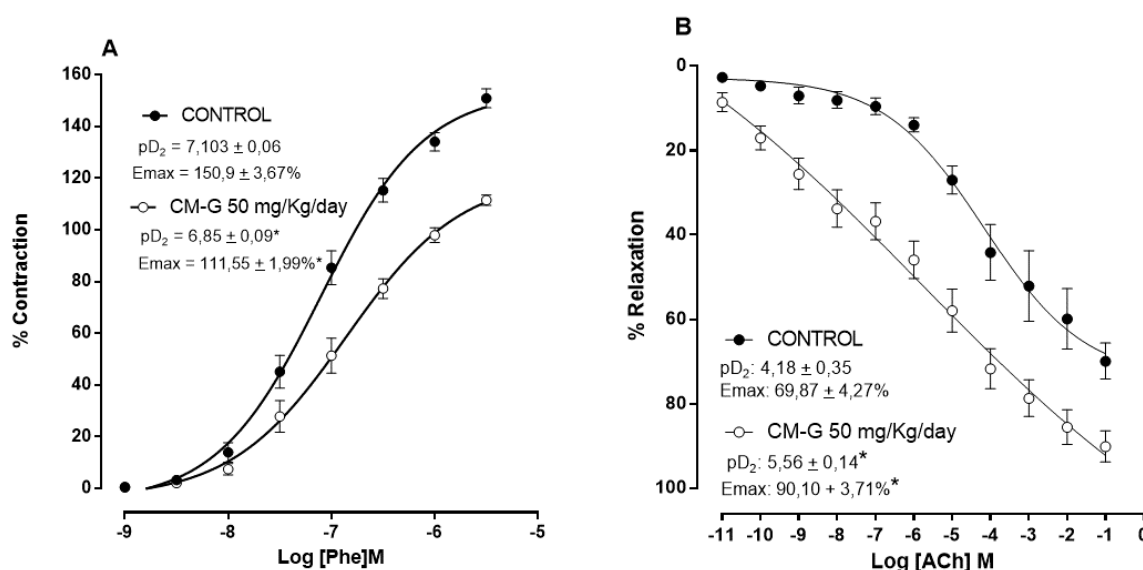


Figure 2: (A) Concentration-response curve for PHE (10^{-9} - 10^{-6} M) in aortic rings isolated from rats in groups treated with CM-G (50 mg/Kg/day, $n=8$), and the control group ($n=8$). (B) Concentration-response curves for ACH (10^{-10} - 10^{-5} M) in aortic rings isolated from rats in groups treated with CM-G (50mg/Kg/day, $n=11$), and the control group ($n=9$). * $p<0.05$ vs control.

3.3 Participation of the NOS/NO/sCG pathway in vasorelaxant effects after treatment with CM-G

The vasodilator effect of ACH (10^{-10} - 10^{-5} M) was significantly lower in rings pre-incubated with the different inhibitors: L-NAME (figure 3), ODC (figure 3), and carboxy-PTIO (additional data). Interestingly, in the presence of different inhibitors, the relaxant response of ACH was significantly decreased in the group treated (L-NAME: $E_{max} = 15.77 \pm 2.85\%$, $n=10$) when compared to the control group (L-NAME: $E_{max} = 30.44\% \pm 5.5\%$, $n=10$, $p<0.05$).

A similar result was observed in aortic rings pre-incubated with ODQ at 10 μ M, demonstrating a significant reduction of the relaxant response mediated by ACH ($E_{max} = 9.7 \pm 0.92\%$, $n = 11$, vs control: $E_{max} = 22.99 \pm 3.79\%$, $p < 0.05$). In addition, we found higher values for ΔAUC (Figure 3C and 3F) in the groups treated with the CM-G.

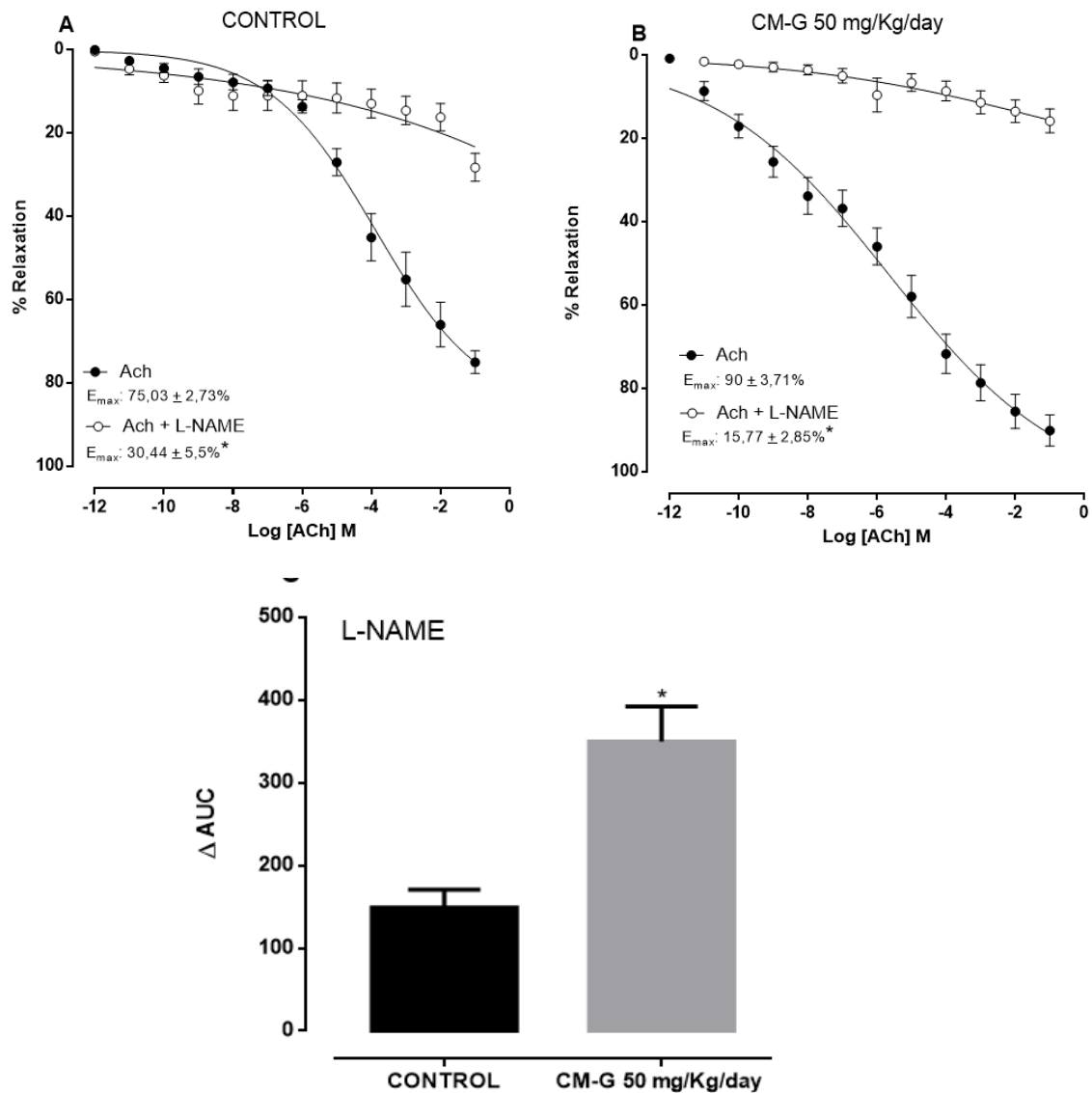


Figure 3: Concentration-response curves of the vasorelaxant effect induced by ACH (10^{-10} - 10^{-5} M) in aortic rings isolated from mice for different groups (A) Control group in the absence and in the presence of L-NAME 100 μ M ($n=10$) (B) After treatment for 21 days with CM-G (50mg/Kg/day, $n=11$) in the presence and absence of L-NAME. (C) Variation in the area under the curve for ACH in the control groups and CM-G in the presence of L-NAME. $*p < 0.05$ vs ACH or vs control.

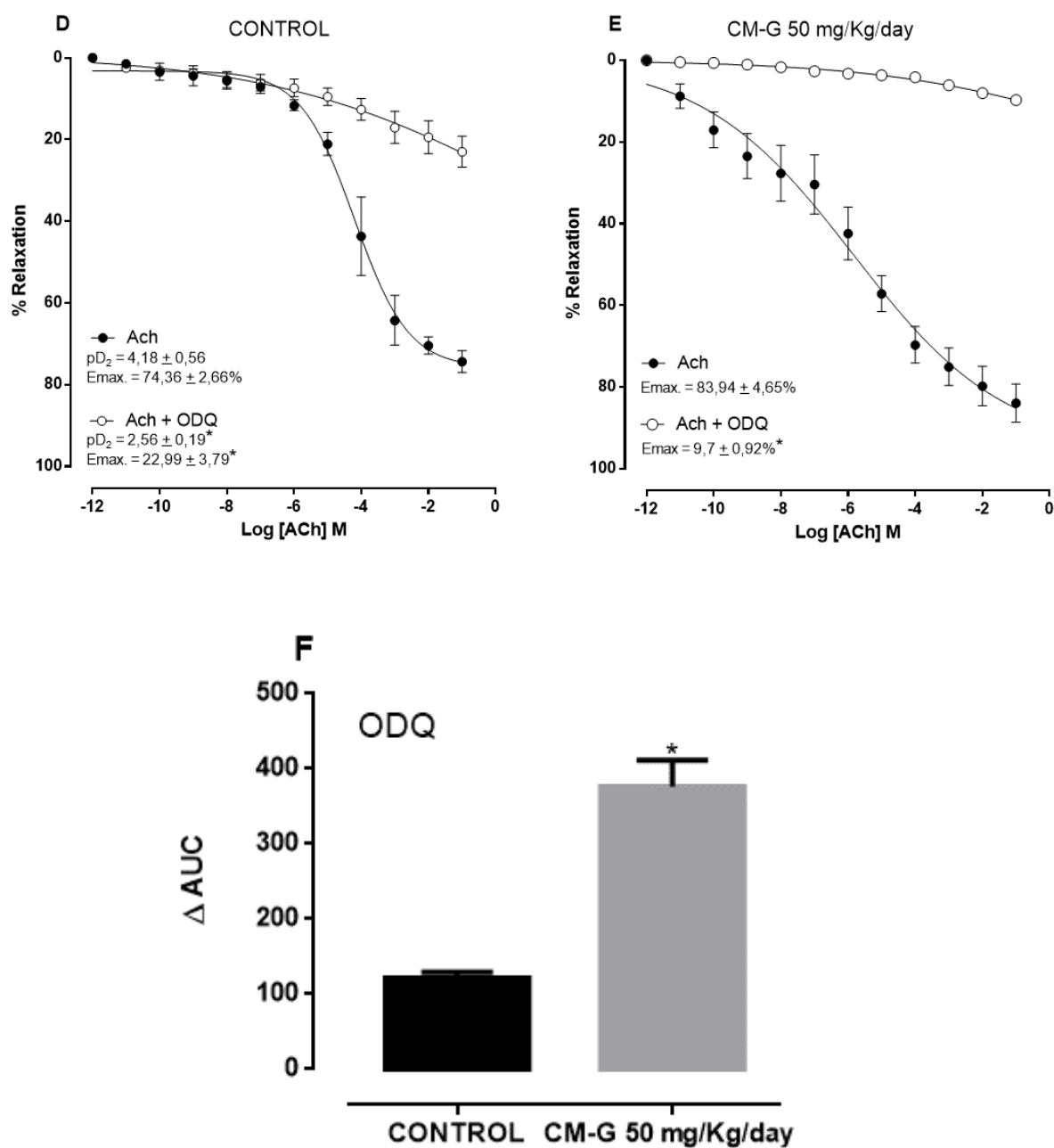


Figure 3.1: (D) Control group in the absence and in the presence of ODQ 10 μ M (n=7) (E) After treatment for 21 days with CM-G (50mg/Kg/day, n=11) in the absence and in the presence of ODQ (F) Variation in the area under the curve for ACH in the control groups and CM-G (50 mg/Kg/day) in the presence of ODQ. * $p < 0.05$ vs ACH or vs control.

3.4 Negative inotropic effect of CM-G in atrium isolated from rats

Evaluating the bioactivity of CM-G in the atrium, a contractility reduction in a concentration dependent manner was observed (Figure 4A). Fig 4B shows the concentration response curve of the negative inotropic effect of CM-G, being the pD_2 of 2.96 ± 0.36 ($n=6$). The effect was totally reversed after washing. In this way, we investigated whether the inotropic response for CM-G would involve the ability of the CM-G to change the contractile response to Ca^{+2} . For this reason, we developed concentration-response curves (figure 4C) in both the absence and presence of CM-G (3000 μ g/mL) facing increasing concentrations of $CaCl_2$ (0.5 to 7.0 mM). The positive inotropic $CaCl_2$ response was decreased significantly in the presence of CM-G, reducing the maximum efficiency of 100% to $73.41 \pm 2.43\%$ ($p<0.05$, $n=5$).

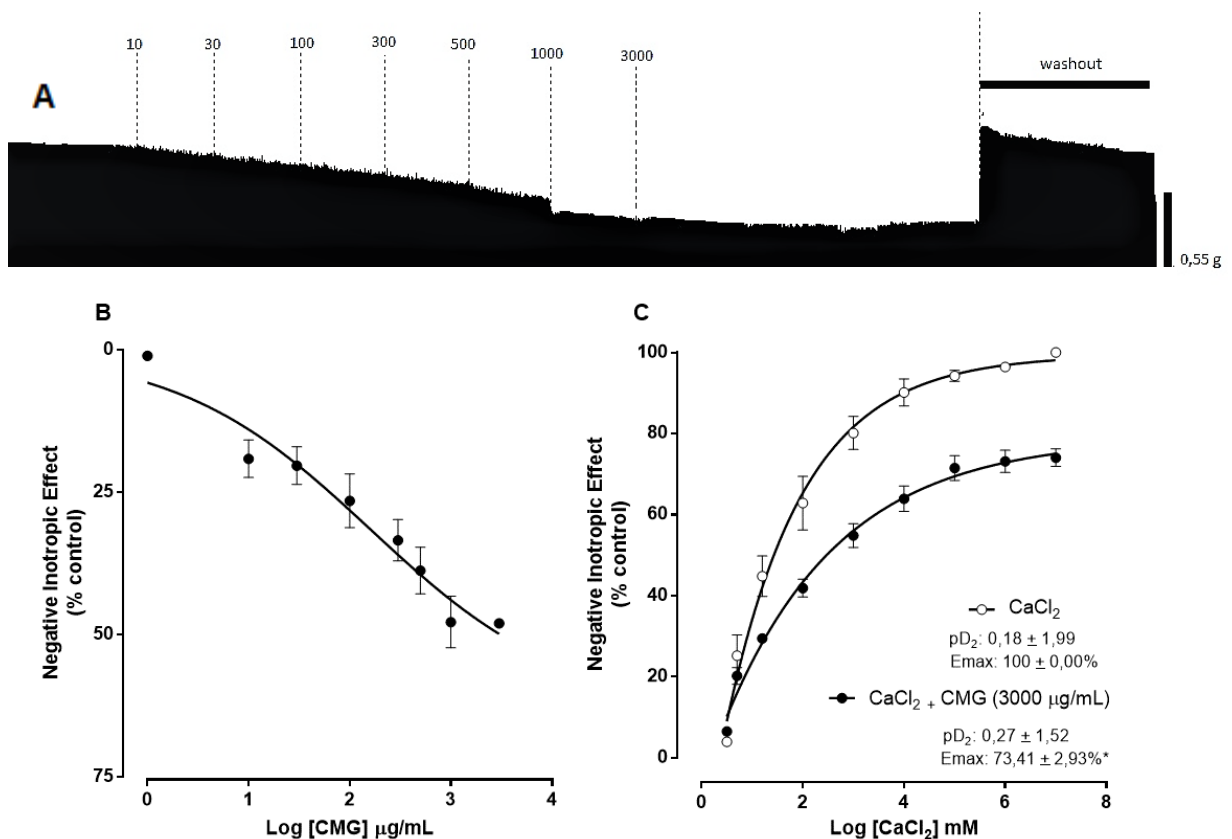


Figure 4: (A) Original recording of the effect of increasing CM-G concentrations on the force of contraction of the left rat atrium. (B) The concentration-response curve of the negative inotropic effect of CM-G. (C) Positive inotropic response of $CaCl_2$ in the absence and presence of CM-G (3000 μ g/mL). * $p<0.05$ vs $CaCl_2$, $n=6$.

3.5 Effects of CM-G on the cardiomyocytes contractility and calcium transient

When ventricular cardiomyocytes were incubated with CM-G in concentrations of 100 μ g/mL (1.49 ± 0.06 , n=47 cells, 6 animals), and 300 μ g/mL (1.51 ± 0.07 , n=37 cells, 6 animals) there was a reduction in the amplitude of calcium transient (F/F_0) in comparison with the cell controls (1.85 ± 0.35 , n=103 cells, 6 animals, $p < 0.05$) (Figure 5A), which did not occur when the cells were incubated with 10 μ g/mL of CM-G. In a similar manner, treatment with CM-G (50 mg/Kg/day) was able to reduce the amplitude of calcium transient (F/F_0 CM-G: 1.46 ± 0.01 , n=150 cells, 6 animals vs. control: 2.89 ± 0.09 , n=141 cells, 6 animals, $p < 0.05$, Figure 5B). In addition, the index of contractility was also reduced in cells of animals treated with CM-G as compared with those of the control animals ($10.29 \pm 0.42\%$, n=95 cells, 5 animals vs $12.33 \pm 0.31\%$, n=131 cells, 5 animals, $p < 0.05$ figure 5C).

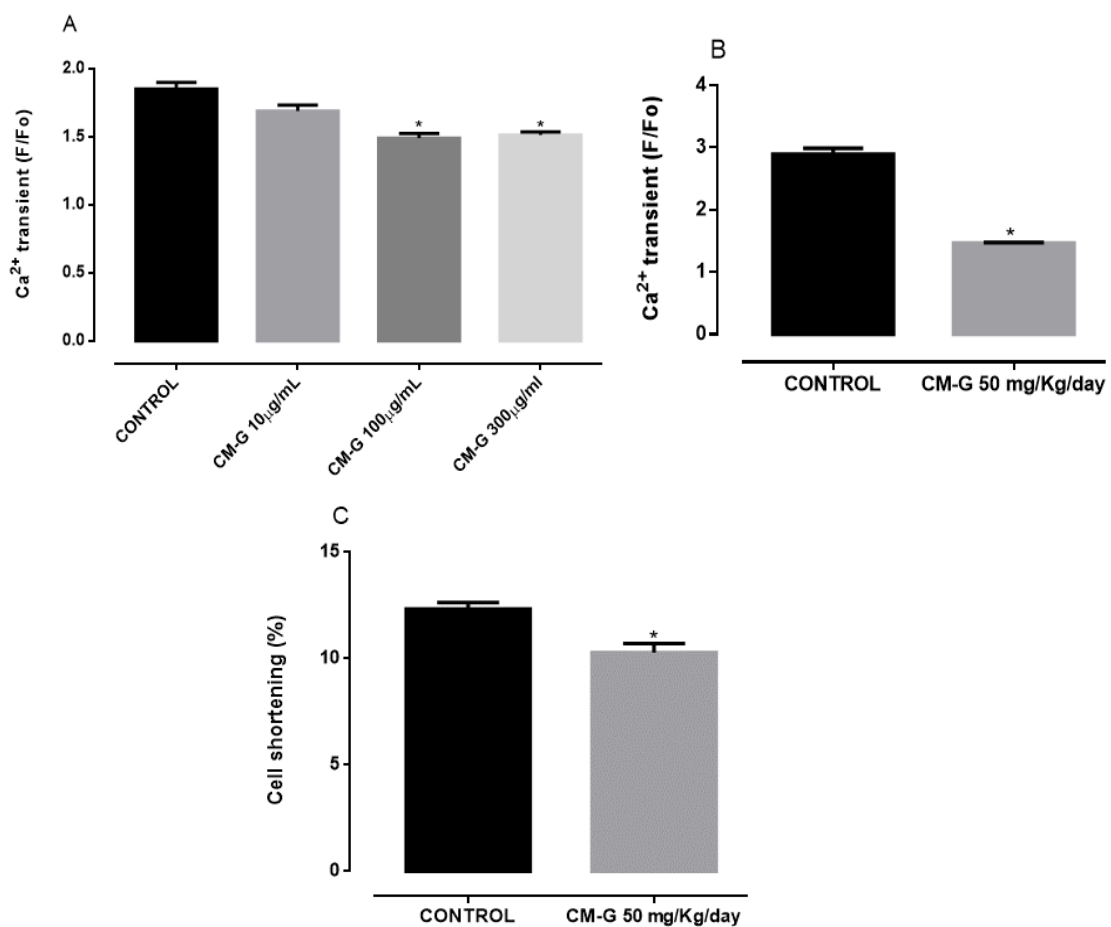


Figure 5: (A) *In vitro* effect of different concentrations CM-G (10, 100 and 300 μ g/mL) on the amplitude of the calcium transient in isolated ventricular cardiomyocytes of mice, n = 5, 37-47 cells/analysis. (B) Effect of treatment with CM-G (50

mg/Kg/day, 21 days) on the amplitude of calcium transient, $n = 6$, 95-131 cells/analysis, (C) Effect of CM-G (50 mg/Kg/day) treatment on the contractility of ventricular cardiomyocytes isolated from rats after treatment for 21 days, $n = 5$, 95-131 cells/analysis * $p < 0.05$ vs control.

3.6 Effect of CM-G treatment on cardiac alterations in rats with myocardial infarction

Infarcted animals showed a significant increase in the height of the ST segment in relation to the control animals, indicating AMI, but in acute analysis changes not observed (Figure 6A). The mass was significantly higher in animals ISO (mean = 4.28 ± 0.15 , $n=11$) in comparison with the control (mean = 2.94 ± 0.08 , $n=7$, $p < 0.05$), but differences between groups ISO and ISO+CM-G was not observed (mean = 4.14 ± 0.19 , $n=7$) (Figure 6B).

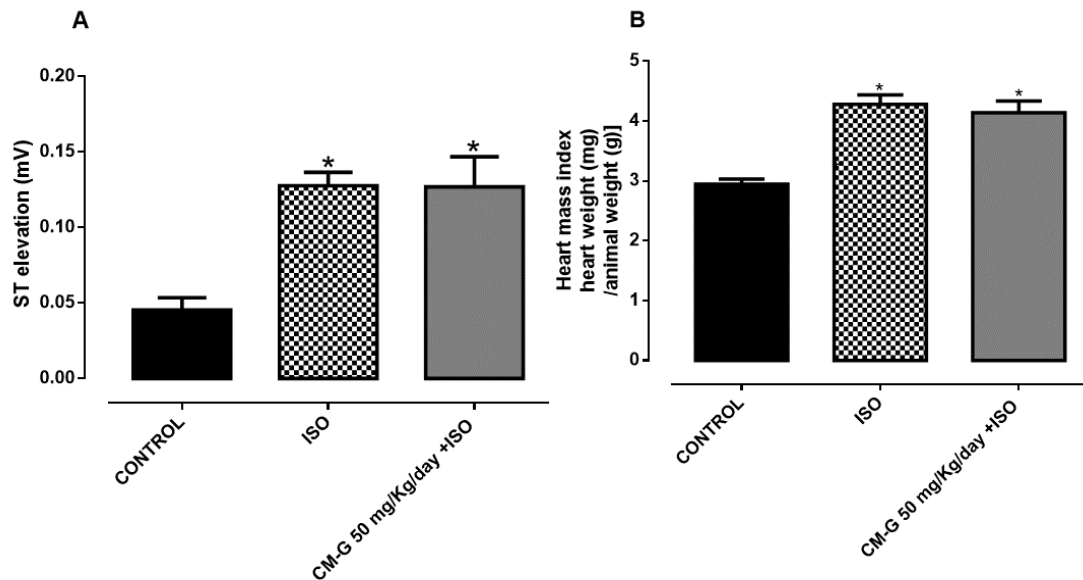


Figure 6: (A) effect of treatment for 21 days with CM-G (50 mg/kg/day) at elevation of the ST segment in the electrocardiogram compared with control animals (B) in the mass of the heart, * $p < 0.05$ vs control.

4 DISCUSSION

The results presented in this study showed that CM-G from *S. cerevisiae* induces relaxation in aortic rings with functional endothelium, and the effect is mediated by the NOS/NO/sCG pathway. In addition, treatment with CM-G (50 mg/Kg/day) during 21 days attenuated contractile response and improved endothelium dependent relaxation. It was also observed that CM-G caused negative inotropic effects in atrium and reduced calcium cell shortening in ventricular cardiomyocytes, which was accompanied by a reduction in calcium transient. However, treatment with CM-G was not able to reduce in short period of time heart damage induced by isoproterenol, as assessed by the height of the ST segment and heart mass index.

CM-G is a derivative of well-studied β -D-glucans, bearing in mind that introduction of carboxymethyl groups into the polymer structure enhances its bio-protective properties such as: antioxidant, anti-cancerogenous and immunomodulating activity, while retaining the advantage of low toxicity. In addition, the literature suggests that CM-G has protective effects on the cardiovascular system [3, 4, 27-29].

Studies on the role of CM-G in regulating vascular tone are scarce and its mechanisms of action in the vasculature are not well understood. Studies have shown that the endothelial cells of vessels of humans express membrane receptors for β -D-glucans, like Toll Like receptors (TLR), suggesting that the response to these polymers may not be restricted to the immune system [11, 14, 32, 33].

In this study, we observed that CM-G has modulating effect on vascular reactivity in the aortic artery of rats, promoting concentration dependent vasorelaxant activity when facing pre-contraction with an alpha-adrenergic agonist. This action has been observed in aortic rings endothelium-intact and endothelium-denuded, indicating that the vasodilator effect caused by this polymer influences both independent pathways and the relaxing factors derived from the endothelium, being these of greater magnitude.

It is known that the vascular endothelium plays an essential role in regulating the cardiovascular system, especially in the control of vasomotor tone via synthesis

or release of endothelium-derived relaxing factor (EDRF) as NO, prostacyclin, and hyper-polarizing factors derived from the endothelium [34, 35].

Whereas the vasorelaxant action of CM-G is more pronounced in aortic rings with functional endothelium, and bearing in mind that in coronary conductance as in the aorta, the participation of NO is most relevant [36].

In the presence of L-NAME, non-selective inhibitor of NOS we observed that the relaxant response induced by CM-G was diminished, indicating that production of endothelial nitric oxide is involved in the effect. In line with this finding, we observed a significant reduction in CM-G vasorelaxant effect after incubation of preparations with the NO scavenger (carboxy-PTIO). To further investigate the NO pathway, the vasodilatory effect of CM-G was evaluated in the presence of ODQ, an sGC inhibitor. In this situation the relaxation induced by CM-G was attenuated, suggesting the involvement of the NOS/NO/cGS pathway in the effect induced by CM-G.

This finding corroborate with previous studies, have found that linear and branched β -D-glucans of fungal and bacterial origin act on other cell types like peritoneal macrophages, increasing NO synthesis *in vitro* [37, 38]. The literature indicates that once synthesized, NO diffuses rapidly to the vascular smooth muscle cells, causing the production of guanine monophosphate (cGMP) through binding to the heme complex present in the soluble guanylate cyclase enzyme (sGC), which activates protein kinase G (PKG). This, in turn, reduces intracellular calcium levels, with desensitization of the contractile apparatus to calcium, culminating in relaxation of the vascular smooth muscle [34, 39-41].

The present study is a pioneer in describing the mechanisms by which CM-G induces vasorelaxation, and it is possible to infer that CM-G acts modulating endothelial function, increasing NO synthesis of the vascular endothelium. In addition, there seems to be an independent endothelium component in this vasorelaxant response, and further studies are needed to investigate this effect.

In assessing the responsiveness to PHE in the aortic rings, CM-G treatment significantly decreased arterial responsiveness to PHE. This can be explained by the effect of CM-G on endothelial function, via NO, since it also acts modulating the contractile function [42].

When assessing the effects of treatment with CM-G (50 mg/mg/kg for 21 days) on the arterial bed of rats, it was observed that ACH caused a significantly more

pronounced vasorelaxant effect in the CM-G treated group when compared to the control group, indicating a significant increase in the relaxant sensibility.

Bezerra et al. (2017), investigating the effect of supplementation with CM-G from *S. cerevisiae*, found that treatment with 20 mg/kg/day for 8 days with this same derivative did not alter vascular responsiveness to PHE nor the vasorelaxant response to ACH when compared to the control animals. These findings are in conflict with those obtained in the present study; however, the dose and the treatment period adopted in this study were different. On the other hand, in the study by Bezerra et al. (2017) treatment with CM-G potentiated vascular response to the NO donor, sodium nitroprusside (SNP) suggesting CM-G acts directly on vascular smooth muscle, increasing the NO sensibility [10].

In the end of evaluating the involvement of the NOS/NO/sCG pathway, it was observed that the relaxation response to ACH in the presence of different inhibitors lower in rings from treated rats when compared to the control group. Pode-se observar que a variação da área sob a curva foi maior nos animais tratados em comparação com os controles, sugerindo um aumento na sensibilidade dos alvos moleculares envolvidos, como por exemplo aumento na sua expressão.

These findings indicate that CM-G caused an improvement in endothelial function, corroborating the results observed for its direct effect on vasorelaxation. Together, these results point to involvement of the NOS/NO/sCG pathway in the acute effect and post-treatment with CM-G. This confirms the literature data, which show that NO release by endothelial cells or its increased bioavailability can be regulated positively by dietary factors, mechanisms having been described by which natural products and plant extracts induce vasorelaxation in close relationship with the eNOS/sCG pathway [34, 43, 44].

In addition to investigating the action of this polymer in the vasculature of animals, the present study also showed that CM-G acts directly on the heart, promoting a concentration dependent negative inotropic effect in isolated rat atrium. Natural products which have negative inotropic effect do act among other mechanisms, by reducing calcium transient, intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), and cardiac contractility [45-48].

In fact, preparations of rat isolated atrium, pre-incubated with CM-G, did reduce atrial contraction induced by addition of increasing and cumulative

concentrations of CaCl_2 , demonstrated by a significant reduction in the maximum effectiveness seen in the CaCl_2 curve in comparison with the control curve. In line with this result it was also demonstrated that CM-G directly reduced intracellular calcium transient in ventricular cardiomyocytes isolated from rats. This finding was accompanied by a reduction in the cardiomyocytes contractility in the treated animals cells. This is the first study on the polymer's activity in cellular mechanisms that determine normal functioning of the heart, as in Ca^{2+} handling and cardiac contractility.

These data corroborate the role of CM-G as protector, since alterations in Ca^{2+} handling is the central cause of both contractile dysfunction and arrhythmias, directly related to heart disease pathophysiology, in particular heart failure and ischemic heart disease. Still, most negative inotropic agents have cardioprotective properties [48-50]. In addition, evidence suggests that lowering intra-cytoplasmic calcium overload, and subsequent cardiac contractility, increased bioavailability of vascular NO and increased oxygen and blood and are among the more important cellular mechanisms in clinical ischemic heart disease treatment [45-47, 51, 52].

Thus, natural products like CM-G, which modulate the action of NO in vasodilation and/or exert negative inotropic effect, have potential for preventing and treating CVD [34, 48]. In this study we sought to investigate whether treatment with CM-G, 50 mg/kg/day for 21 days, would exert cardioprotective effect against damage in an animal model of AMI. It was observed that isoproterenol injection resulted in significant changes in heart mass index and in ECG patterns such as ST segment elevation. The treatment with CM-G did not increased infarcted area or altered the heart mass. Prevention of cardiac damage in the AMI animal model caused by isoproterenol was not evidenced in the acute moments.

These results conflict with those described in the literature which demonstrate that intraperitoneal administration of 40 mg/Kg/day of phosphorylated (1→3) β -D-glucan in models of acute myocardial infarction due to ischemia and reperfusion, reduced the infarction area by 47% and 50% with reperfusion of 4h and 2h respectively [53]. A later study using an pig model of acute myocardial infarction by to ischemia and reperfusion, supplementation with 50 mg/kg/day (1→3) (1→6) β -D-glucan isolated from *S. cerevisiae* for ten consecutive days, was able to reduce the infarction area by 37% in the supplemented group compared with the control

group [54]. Possible explanations for these contradictory results include the structure of the polymer and the myocardium infarction model, which differ from the present study. The β -D-glucan used in the first study is the linear form and the second is micro-particulated. In addition, ischemia and reperfusion differ from AMI induced by isoproterenol, which causes cardiac hyperactivity and induces momentary regional ischemia, which is easier to be affected in treatment. In addition, the period between the administration of isoproterenol and experimental protocol was only 24 hours, being a short space of time, which may have been insufficient to assess if CM-G would act in prevention of heart damage.

The beneficial properties of CM-G on the cardiovascular system are undeniable, presenting potential as a nutraceutical in cardiovascular protection, with a view to the activity of this polymer, modulating Ca^{2+} handling, interfering with cardiac contractility, and the function of the vascular endothelium through increased NO synthesis and bioavailability, which plays a central role in regulating vascular tone, through its vasorelaxant effect [39, 44]. In this sense, investigations which relate the use of such polysaccharides in the prevention or treatment of these diseases are necessary, this considering the results described herein.

5 CONCLUSIONS

The results of this study demonstrate for the first time that CM-G induces relaxation in the aorta of rats, with participation of the endothelium, increasing synthesis and availability of NO by the NOS/NO/sCG pathway. In addition, CM-G acts on the myocardium, inducing negative inotropic effect, through the modulation of Ca^{2+} handling. These findings provide further experimental evidence for the mechanism of action of CM-G with respect to the prevention of CVD. However, additional research on the effectiveness of this polymer's cardio-protection is required in order to better clarify both its role and applicability for therapeutic purposes.

6 CONFLICT OF INTEREST

The authors have declared that there is no conflict of interest.

7 ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Instituto de Desenvolvimento do Estado da Paraíba (IDEP).

8 REFERENCES

- [1] X.Xu, β -Glucan from *Saccharomyces cerevisiae* reduces lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW264. 7 macrophages., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* v. 1820 (2012) 1656-1663.
- [2] S.T. Walachowski, Guillaume; G. Foucras. Triggering Dectin-1-Pathway Alone Is Not Sufficient to Induce Cytokine Production by Murine Macrophages, *PloS one* 11 (2016) e0148464.
- [3] M. Magnani, R.J. Castro-Gomez, M.P. Mori, H. Kuasne, E.P. Gregorio, F. Libos, Jr., I.M. de Syllos Colus, Protective effect of carboxymethyl-glucan (CM-G) against DNA damage in patients with advanced prostate cancer, *Genetics and molecular biology* 34(1) (2011) 131-5.
- [4] V.B. Araujo, A.N. de Melo, N.T. de Souza, V.M. da Silva, R.H. Castro-Gomez, A.S. Silva, E.L. de Souza, M. Magnani, Oral Intake of Carboxymethyl-Glucan (CM-G) from Yeast (*Saccharomyces uvarum*) Reduces Malondialdehyde Levels in Healthy Men, *Molecules* 20(8) (2015) 14950-8.
- [5] A.A. Khan, A. Gani, F.A. Masoodi, F. Amin, I.A. Wani, F.A. Khanday, A. Gani, Structural, thermal, functional, antioxidant & antimicrobial properties of beta-d-glucan extracted from baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)-Effect of gamma-irradiation, *Carbohydrate polymers* 140 (2016) 442-50.
- [6] M. Magnani, Effects of carboxymethyl-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* on the peripheral blood cells of patients with advanced prostate cancer, *Experimental and Therapeutic Medicine* (2010).
- [7] J. Ding, Y. Wang, S. Xiong, S. Zhao, Q. Huang, Optimised methodology for carboxymethylation of (1 $\rightarrow$ 3)- β -d-glucan from Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and promotion of mechanical activation, *International Journal of Food Science & Technology* 48(2) (2013) 253-259.
- [8] F.Y. Kagimura, M.A. da Cunha, A.M. Barbosa, R.F. Dekker, C.R. Malfatti, Biological activities of derivatized D-glucans: a review, *International journal of biological macromolecules* 72 (2015) 588-98.
- [9] D. Slameova, Protective effects of fungal (1-3)-beta-glucan derivatives against oxidative DNA lesions in V79 hamster lung cells, *Cancer Letters* 198(2) (2003) 153-160.

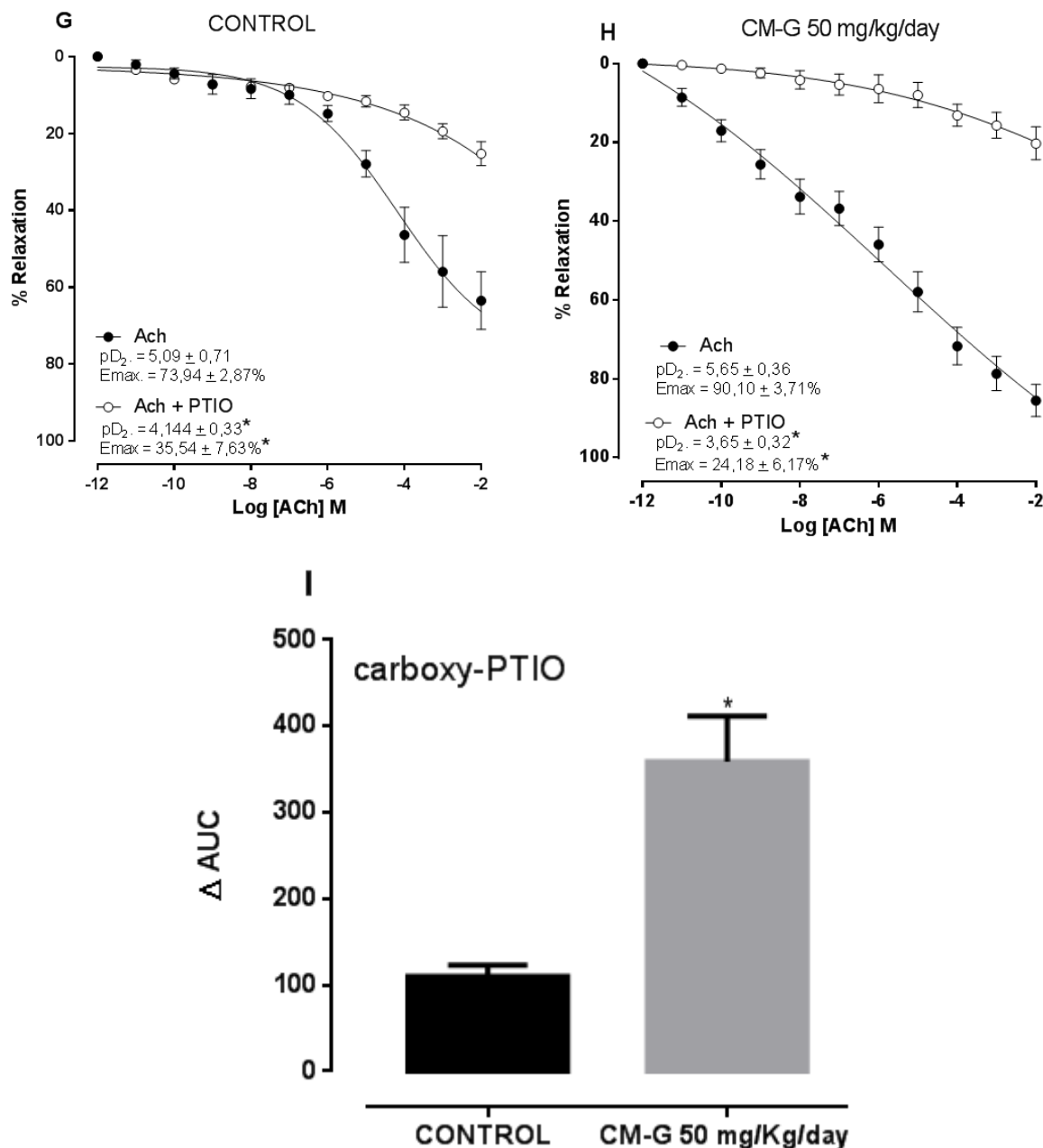
- [10] L.S.M. Bezerra, Marciane; R.J.H.Castro-Gomez,; Silva C.H.C.,T.A. Felisberto; R.L.P. Vieira, I.A. de Medeiros, R.C.Veras. Modulation of vascular function and anti-aggregation effect induced by (1 → 3) (1 → 6)-β-d-glucan of *Saccharomyces cerevisiae* and its carboxymethylated derivative in rats *Pharmacological Reports* 69 (2017) 448-455.
- [11] S. Wang, H. Zhou, T. Feng, R. Wu, X. Sun, N. Guan, L. Qu, Z. Gao, J. Yan, N. Xu, J. Zhao, C. Qi, beta-Glucan attenuates inflammatory responses in oxidized LDL-induced THP-1 cells via the p38 MAPK pathway, *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD* 24(3) (2014) 248-55.
- [12] B. Salvador, A. Arranz, S. Francisco, L. Cordoba, C. Punzon, M.A. Llamas, M. Fresno, Modulation of endothelial function by Toll like receptors, *Pharmacological research* 108 (2016) 46-56.
- [13] M. Novak, V. Vetvicka, Beta-glucans, history, and the present: immunomodulatory aspects and mechanisms of action, *Journal of immunotoxicology* 5(1) (2008) 47-57.
- [14] B.C. Lehtovaara, F.X. Gu, Pharmacological, structural, and drug delivery properties and applications of 1,3-beta-glucans, *J Agric Food Chem* 59(13) (2011) 6813-28.
- [15] J.H. Boyd, S. Mathur, Y. Wang, R.M. Bateman, K.R. Walley, Toll-like receptor stimulation in cardiomyocytes decreases contractility and initiates an NF-kappaB dependent inflammatory response, *Cardiovasc Res* 72(3) (2006) 384-93.
- [16] O. Avlas, R. Fallach, A. Shainberg, E. Porat, E. Hochhauser, Toll-like receptor 4 stimulation initiates an inflammatory response that decreases cardiomyocyte contractility, *Antioxidants & redox signaling* 15(7) (2011) 1895-909.
- [17] M. Magnani, C.M. Calliari, F.C. de Macedo, M.P. Mori, I.M. de Syllos Cólus, R.J.H. Castro-Gomez, Optimized methodology for extraction of (1→3)(1→6)-β-d-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* and in vitro evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of the corresponding carboxymethyl derivative, *Carbohydrate polymers* 78(4) (2009) 658-665.
- [18] J. Šandula, Kogan, G., Kačuráková, M., Machová, E. , Microbial (1→ 3)-β-D-glucans, their preparation, physico-chemical characterization and immunomodulatory activity., *Carbohydrate polymers* 38(3) (1999) 247-253.
- [19] R.F. Furchgott, J.V. Zawadzki, The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine, *Nature* 288 (1980) 373-376.
- [20] B.M. Altura, B.T. Altura, Differential effects of substrate depletion on drug-induced contractions of rabbit aorta, *Am. J. Physiol.* 219 (1970) 1698-1705.
- [21] Furchgott, Zawadzki, The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine, *Nature* 288(5789) (1980) 373-6.

- [22] B. Merino, I. Quesada, J. Hernandez-Cascales, Glucagon Increases Beating Rate but Not Contractility in Rat Right Atrium. Comparison with Isoproterenol, *PLoS One* 10(7) (2015) e0132884.
- [23] T.C. Prímola-Gomes, LA; Lauton-Santos, S; Balthazar, CH; Guatimosim, S; Capettini, LS; Lemos, VS; Coimbra, CC; Soares, DD; Carneiro-Júnior, MA; Quintão-Júnior, JF; Souza, MO; Cruz, JS; Natali AJ., Exercise capacity is related to calcium transients in ventricular cardiomyocytes, *J Appl Physiol* 107(2) (2009) 593-598.
- [24] U.L. Wisløff, Jan Pal; Falck, Geir; Beisvag, Vidar; Currie, Susan; Smith, Godfrey; Ellingsen, Øyvind., Increased contractility and calcium sensitivity in cardiac myocytes isolated from endurance trained rats., *Cardiovascular Research* 50 (2001) 495-508.
- [25] E.L. Olivares, E.S.R.H. Costa, J.P. Werneck-de-Castro, V. Pinho-Ribeiro, M.G. Silva, K.C. Ribeiro, E.C. Mattos, R.C. Goldenberg, A.C. Campos de Carvalho, M.O. Masuda, Cellular cardiomyoplasty in large myocardial infarction: can the beneficial effect be enhanced by ACE-inhibitor therapy?, *European journal of heart failure* 9(6-7) (2007) 558-67.
- [26] P. A, M.V. Varghese, A. S, S.R. P, A.K. Mathew, A. Nair, R.H. Nair, G.R. K, Polyphenol rich ethanolic extract from *Boerhavia diffusa* L. mitigates angiotensin II induced cardiac hypertrophy and fibrosis in rats, *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 87 (2017) 427-436.
- [27] H.A. El Enshasy, R. Hatti-Kaul, Mushroom immunomodulators: unique molecules with unlimited applications, *Trends in biotechnology* 31(12) (2013) 668-77.
- [28] H. Wang, J.F. Mukerabigwi, Y. Zhang, L. Han, T. Jiayinaguli, Q. Wang, L. Liu, Y. Cao, R. Sun, X. Huang, In vivo immunological activity of carboxymethylated-sulfated (1-->3)-beta-D-glucan from sclerotium of *Poria cocos*, *International journal of biological macromolecules* 79 (2015) 511-7.
- [29] E.C. Machová, Alzbeta; Bystricky, Peter Effect of carboxymethylation on antioxidant properties and radical degradation of mannans and glucans, *Carbohydrate polymers* 112 (2014) 603-607.
- [30] C. Borchani, F. Fonteyn, G. Jamin, J. Destain, L. Willems, M. Paquot, C. Blecker, P. Thonart, Structural Characterization, Technological Functionality, and Physiological Aspects of Fungal beta-D-glucans: A Review, *Critical reviews in food science and nutrition* 56(10) (2016) 1746-52.
- [31] E.-H.K. Young-Teck Kima, Chaejoon Cheongb, David L Williams, Chan-Wha Kima, Seung-Taik Lim, Structural characterization of β -d-(1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 6)-linked glucans using NMR spectroscopy, *Carbohydrate Research* 328(3) (2000) 331-341.
- [32] Y.S. Wu, S.Y. Liao, C.T. Huang, F.H. Nan, Beta 1,3/1,6-glucan and vitamin C immunostimulate the non-specific immune response of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*), *Fish & shellfish immunology* 57 (2016) 269-77.

- [33] J.J. Volman, R.P. Mensink, J.D. Ramakers, M.P. de Winther, H. Carlsen, R. Blomhoff, W.A. Buurman, J. Plat, Dietary (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 4)-beta-D-glucans from oat activate nuclear factor-kappaB in intestinal leukocytes and enterocytes from mice, *Nutrition research* 30(1) (2010) 40-8.
- [34] Z. Qu, J. Zhang, L. Huo, H. Chen, H. Li, Y. Fan, W. Gao, Antihypertensive and vasorelaxant effects of *Rhizoma corydalis* and its active component tetrahydropalmatine via NO/cGMP pathway and calcium channel blockade in isolated rat thoracic aorta, *RSC Adv.* 5(114) (2015) 94130-94143.
- [35] L. Huo, J. Zhang, Z. Qu, H. Chen, Y. Li, W. Gao, Vasorelaxant effects of Shunaoxin pill are mediated by NO/cGMP pathway, HO/CO pathway and calcium channel blockade in isolated rat thoracic aorta, *Journal of ethnopharmacology* 173 (2015) 352-60.
- [36] C. Mingorance, R. Andriantsitohaina, M. Alvarez de Sotomayor, Cedrelopsis grevei improves endothelial vasodilatation in aged rats through an increase of NO participation, *Journal of ethnopharmacology* 117(1) (2008) 76-83.
- [37] N. Ohno, Y. Egawa, T. Hashimoto, Y. Adachi, T. Yadomae, Effect of beta-glucans on the nitric oxide synthesis by peritoneal macrophage in mice, *Biological & pharmaceutical bulletin* 19(4) (1996) 608-12.
- [38] T. Hashimoto, N. Ohno, Y. Adachi, T. Yadomae, Enhanced production of inducible nitric oxide synthase by beta-glucans in mice, *FEMS immunology and medical microbiology* 19(2) (1997) 131-5.
- [39] D.M. Lobo de Andrade, F. Reis Cde, P.F. Castro, L.L. Borges, N.O. Amaral, I.M. Torres, S.G. Rezende, S. Gil Ede, E. Cardoso da Conceicao, G.R. Pedrino, M. Lavorenti Rocha, Vasorelaxant and Hypotensive Effects of Jaboticaba Fruit (*Myrciaria cauliflora*) Extract in Rats, *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* 2015 (2015) 696135.
- [40] M. Rameshrad, H. Babaei, Y. Azarmi, D.F. Fouladia, Rat aorta as a pharmacological tool for in vitro and in vivo studies, *Life sciences* 145 (2016) 190-204.
- [41] R.H. Ritchie, G.R. Drummond, C.G. Sobey, T.M. De Silva, B.K. Kemp-Harper, The opposing roles of NO and oxidative stress in cardiovascular disease, *Pharmacological research* 116 (2017) 57-69.
- [42] F. Montecucco, F. Carbone, T.H. Schindler, Pathophysiology of ST-segment elevation myocardial infarction: novel mechanisms and treatments, *Eur Heart J* 37(16) (2016) 1268-83.
- [43] C.P. Bondonno, K.D. Croft, N. Ward, M.J. Considine, J.M. Hodgson, Dietary flavonoids and nitrate: effects on nitric oxide and vascular function, *Nutrition reviews* 73(4) (2015) 216-35.

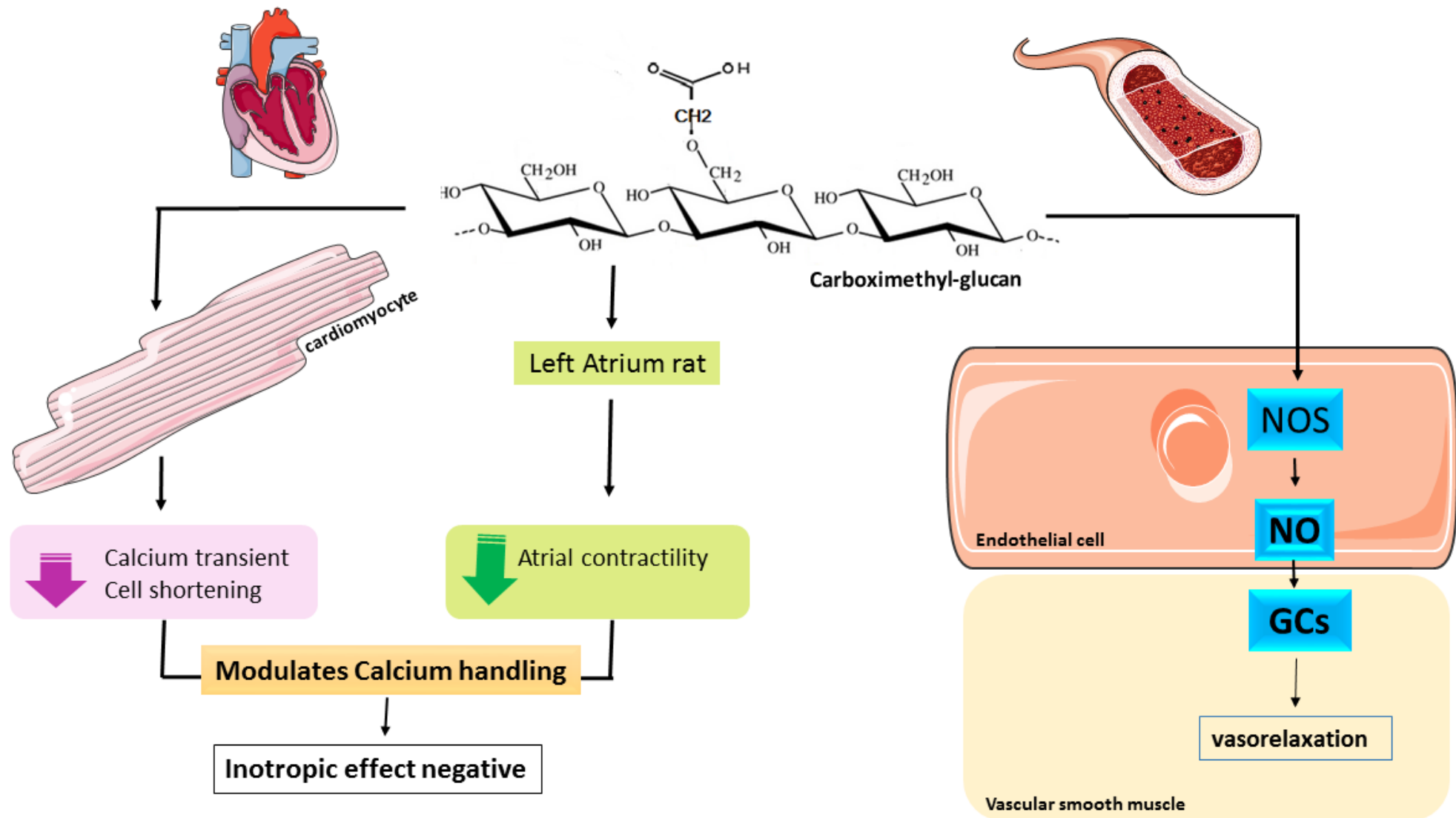
- [44] C. Auger, A. Said, P.N. Nguyen, P. Chabert, N. Idris-Khodja, V.B. Schini-Kerth, Potential of Food and Natural Products to Promote Endothelial and Vascular Health, *Journal of cardiovascular pharmacology* 68(1) (2016) 11-8.
- [45] F. Zhu, B. Du, B. Xu, A critical review on production and industrial applications of beta-glucans, *Food Hydrocolloids* 52 (2016) 275-288.
- [46] S. Guan, J. Ma, X. Chu, Y. Gao, Y. Zhang, X. Zhang, F. Zhang, Z. Liu, J. Zhang, L. Chu, Effects of total flavones from *Acanthopanax senticosus* on L-type calcium channels, calcium transient and contractility in rat ventricular myocytes, *Phytotherapy research : PTR* 29(4) (2015) 533-9.
- [47] Y. Gao, K. Zhang, F. Zhu, Z. Wu, X. Chu, X. Zhang, Y. Zhang, J. Zhang, L. Chu, *Salvia miltiorrhiza* (Danshen) inhibits L-type calcium current and attenuates calcium transient and contractility in rat ventricular myocytes, *Journal of ethnopharmacology* 158 Pt A (2014) 397-403.
- [48] S. Frascarelli, S. Ghelardoni, G. Chiellini, E. Galli, F. Ronca, T.S. Scanlan, R. Zucchi, Cardioprotective effect of 3-iodothyronamine in perfused rat heart subjected to ischemia and reperfusion, *Cardiovascular drugs and therapy* 25(4) (2011) 307-13.
- [49] M. Sadredini, T.K. Danielsen, J.M. Aronsen, R. Manotheepan, K. Hougen, I. Sjaastad, M.K. Stokke, Beta-Adrenoceptor Stimulation Reveals Ca²⁺ Waves and Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Depletion in Left Ventricular Cardiomyocytes from Post-Infarction Rats with and without Heart Failure, *PLoS One* 11(4) (2016) e0153887.
- [50] P.A. Gorski, D.K. Ceholski, R.J. Hajjar, Altered myocardial calcium cycling and energetics in heart failure--a rational approach for disease treatment, *Cell metabolism* 21(2) (2015) 183-94.
- [51] R. Wallis, M. Gharanei, H. Maddock, Predictivity of in vitro non-clinical cardiac contractility assays for inotropic effects in humans--A literature search, *Journal of pharmacological and toxicological methods* 75 (2015) 62-9.
- [52] P.A. Davlourous, V. Gkizas, C. Vogiatzi, G. Giannopoulos, D. Alexopoulos, S. Deftereos, Calcium Homeostasis and Kinetics in Heart Failure, *Medicinal chemistry* 12(2) (2016) 151-61.
- [53] C. Li, T. Ha, J. Kelley, X. Gao, Y. Qiu, R.L. Kao, W. Browder, D.L. Williams, Modulating Toll-like receptor mediated signaling by (1-->3)-beta-D-glucan rapidly induces cardioprotection, *Cardiovasc Res* 61(3) (2004) 538-47.
- [54] E. Aarsaether, E. Straumbotn, A. Rosner, R. Busund, Oral beta-glucan reduces infarction size and improves regional contractile function in a porcine ischaemia/reperfusion model, *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery* 41(4) (2012) 919-25.

Dados suplementares do artigo



Concentration-response curves of the vasorelaxant effect induced by ACH (10^{-10} - 10^{-5} M) in aortic rings isolated from rats for different groups. (G) Control group in the absence and in the presence of carboxy-PTIO 300 μ M ($n=5$). (H) After treatment for 21 days with CM-G (50mg/Kg/day, $n=11$) in the absence and in the presence of carboxy-PTIO. (I) Variation in the area under the curve for ACH in the control groups, and CM-G (50 mg/Kg/day) in the presence of carboxy-PTIO.* $p < 0.05$ vs ACH or Control.

Apêndice 2 - Resumo gráfico artigo



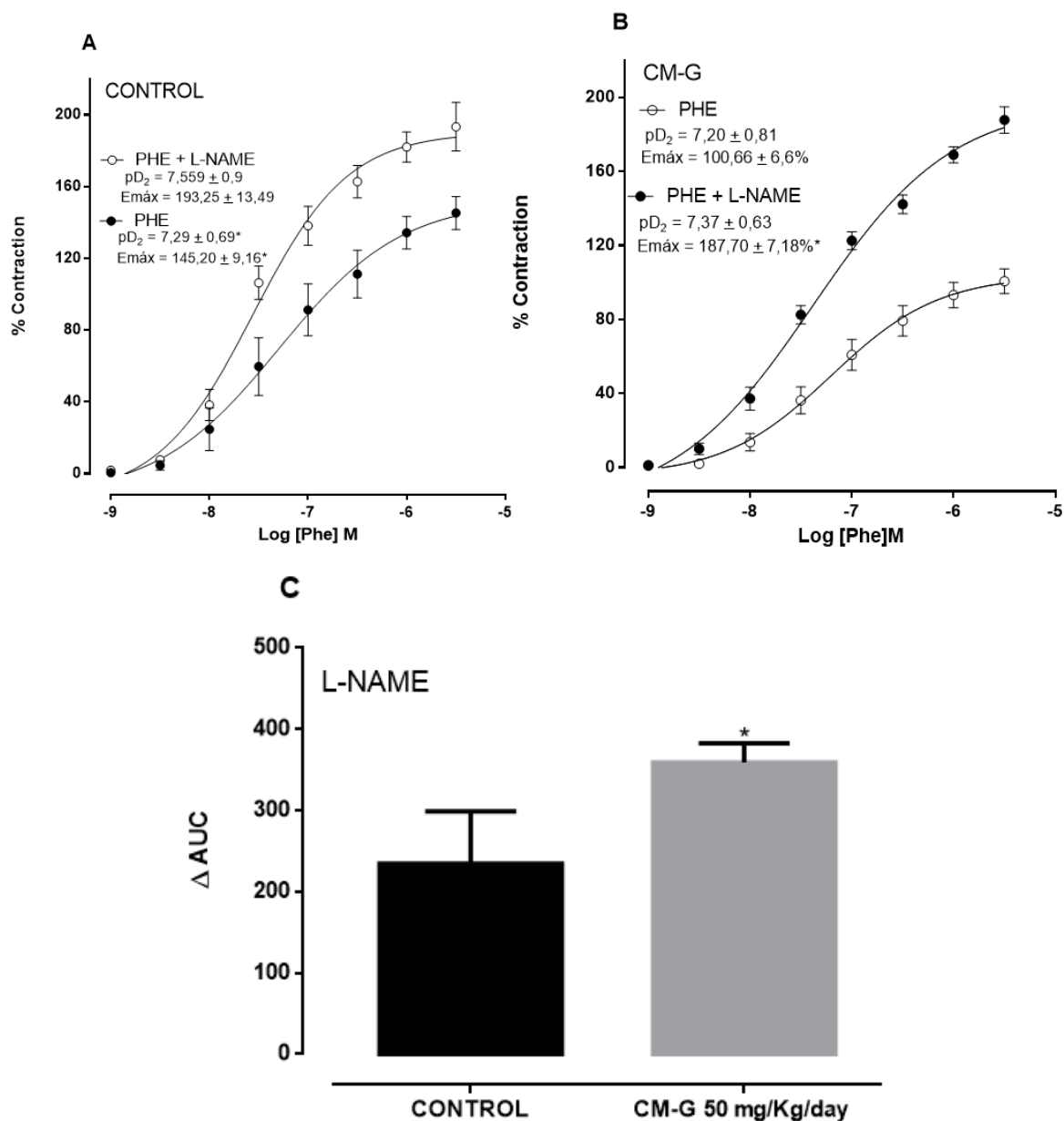
Apêndice 3 – Dados ecocardiográficos de animais saudáveis

	Control N=9	CMG 50mg/Kg/dia N=9	P value
Left Ventricular Diastolic Diameter (LVDD) mm	6,22 ± 0,11	6,022 ± 0,19	0,3799
LVDD/ body weight mm/Kg	23,17 ± 1,18	21,28 ± 0,62	0,1750
Left ventricular Posterior wall (LVPW) mm	1,089 ± 0,02	1,211 ± 0,03	0,0044*
LVPW/LVDD	0,173 ± 0,003	0,203 ± 0,007	0,0015*
Left Atrium diameter (LA) mm	3,54 ± 0,03	3,54 ± 0,09	>0,99
Diameter Aortic (DA) mm	3,51 ± 0,05	3,48 ± 0,05	0,6457
LA/DA (mm)	1,01 ± 0,02	1,02 ± 0,02	0,7316
LA/body weight (mm/Kg)	13,21 ± 0,67	12,51 ± 0,20	0,3287

	Control N=9	CMG 50mg/Kg/dia N=9	P value
Left Ventricular Systolic Diameter (LVSD) mm	3,356 ± 0,04	3,538 ± 0,09	0,09
LVSD/ body weight mm/Kg	12,52 ± 0,67	12,72 ± 0,31	0,79
E wave cm/s	66,44 ± 5,91	63,29 ± 3,83	0,6601
A wave cm/s	37,78 ± 4,34	34,87 ± 3,1	0,5930
E/A	1,859 ± 0,17	1,868 ± 0,17	0,9715
Fractional shortening (FS) %	44,70 ± 0,82	41,81 ± 1,06	0,0902

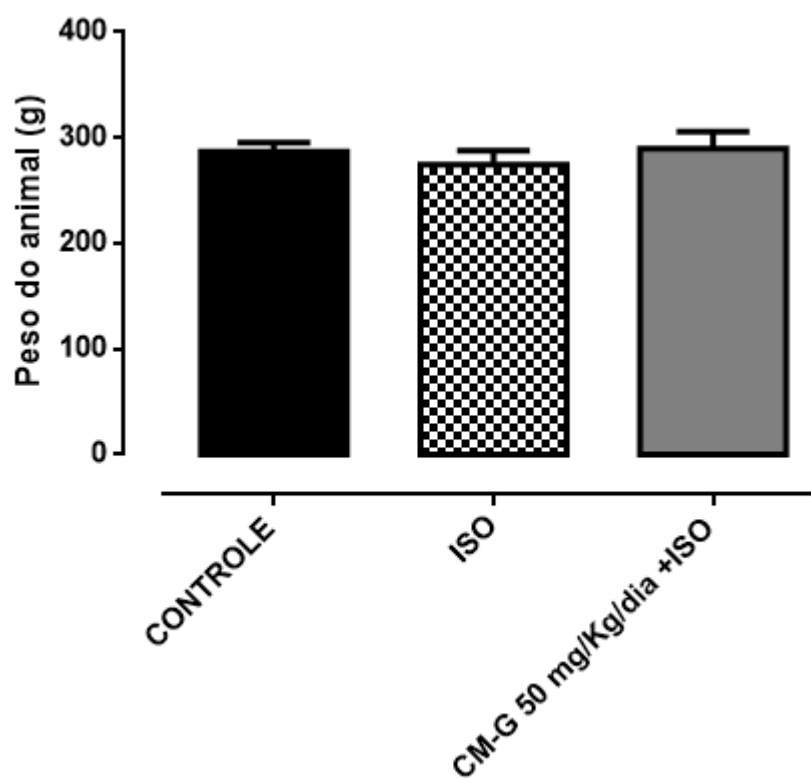
Após o período de 21 dias de suplementação com CM-G (50 mg/kg/dia) ou salina, os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina (75mg/kg) e xilasina (15mg/Kg) via intraperitoneal, colocados em posição supina e posteriormente avaliados por um exame de ecocardiografia transtorácica, sendo obtidos os parâmetros morfológicos e funcionais descritos nas tabelas acima.

Apêndice 4 – Dados reatividade à PHE em anéis de aorta torácica de ratos



Curvas concentração-resposta do efeito contracturante induzido pela PHE (10^{-9} - 10^{-6} M) em anéis de aorta isolada de rato para os diferentes grupos (A) grupo controle na ausência e na presença de L-NAME 100 μ M (n=10) (B) após tratamento de 21 dias com CM-G (50mg/Kg/dia, n=11) na presença e ausência de L-NAME. (C) Variação da área sob a curva para PHE nos grupos controle e CM-G na presença de L-NAME. * $p < 0,05$ vs PHE ou vs controle.

Apêndice 5 – Gráfico de peso dos animais com IAM induzido por isoproterenol



ANEXOS



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Efeito da suplementação de carboximetil-glucana extraída da *Saccharomyces cerevisiae* sobre a função cardíaca e hemostasia de ratos tratados com Isoproterenol", protocolo nº 006/2016 sob a responsabilidade do pesquisador Dr. Robson Cavalcante Veras – que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA-UFPB).

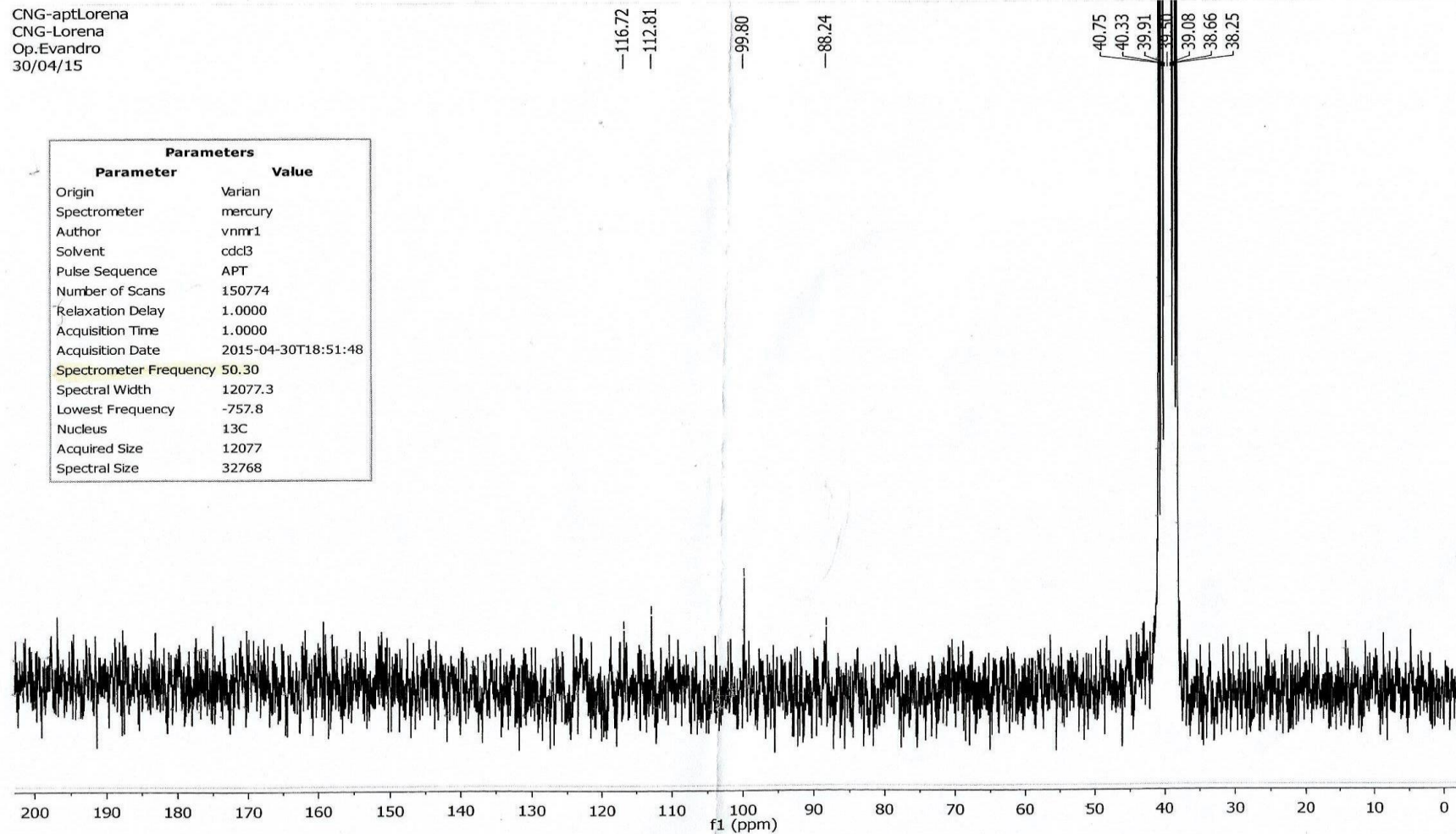
Vigência do Projeto	2015 a 2016
Espécie/linhagem	<i>Rattus norvegicus</i> / Wistar
Número de animais	60 animais
Idade/peso	12 semanas/ 250-350g
Sexo	Machos
Origem	Biotério Professor Dr. Thomas George - UFPB

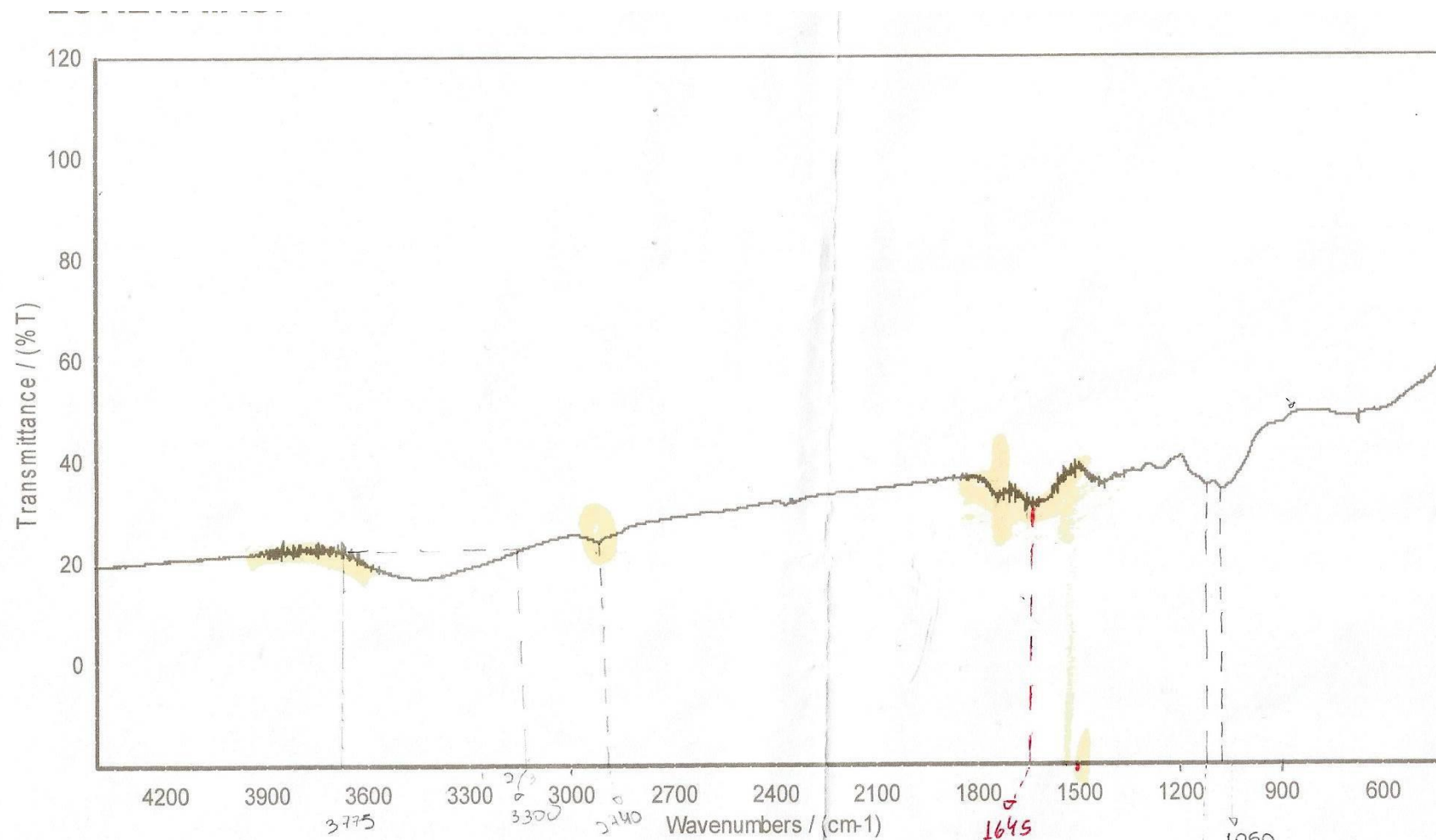

Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra
CEUA-UFPB

Anexo 2 – Espectroscopia por ressonância magnética nuclear da CM-G

CNG-apLorena
CNG-Lorena
Op.Evandro
30/04/15

Parameters	
Parameter	Value
Origin	Varian
Spectrometer	mercury
Author	vnmr1
Solvent	cdcl3
Pulse Sequence	APT
Number of Scans	150774
Relaxation Delay	1.0000
Acquisition Time	1.0000
Acquisition Date	2015-04-30T18:51:48
Spectrometer Frequency	50.30
Spectral Width	12077.3
Lowest Frequency	-757.8
Nucleus	13C
Acquired Size	12077
Spectral Size	32768



Anexo 3 – Espectroscopia por infravermelho da CM-G

Instrument model=WQF-520 resolution=2 scan times=32

