

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

LORENA SOARES BEZERRA

AÇÃO ANTIAGREGANTE E MODULADORA DA FUNÇÃO
VASCULAR DA β -GLUCANA EXTRAÍDA DE *Saccharomyces cerevisiae* E
DA FORMA CARBOXIMETILADA DERIVADA

JOÃO PESSOA
2016

LORENA SOARES BEZERRA

**AÇÃO ANTIAGREGANTE E MODULADORA DA FUNÇÃO
VASCULAR DA β -GLUCANA EXTRAÍDA DE *Saccharomyces cerevisiae* E
DA FORMA CARBOXIMETILADA DERIVADA**

JOÃO PESSOA
2016

LORENA SOARES BEZERRA

**AÇÃO ANTIAGREGANTE E MODULADORA DA FUNÇÃO
VASCULAR DA β -GLUCANA EXTRAÍDA DE *Saccharomyces cerevisiae* E
DA FORMA CARBOXIMETILADA DERIVADA**

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
2016

B574a Bezerra, Lorena Soares.

Ação antiagregante e moduladora da função vascular da β -glucana extraída de Saccharomyces cerevisiae e da forma carboximetilada derivada / Lorena Soares Bezerra.- João Pessoa, 2016.

81f.

Orientador: Robson Cavalcante Veras

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS

1. Nutrição. 2. B-D-glucana. 3. Saccharomyces cerevisiae. 4. Derivado carboximetilado. 5. Agregação - ativação. 6. Reatividade vascular.

UFPB/BC

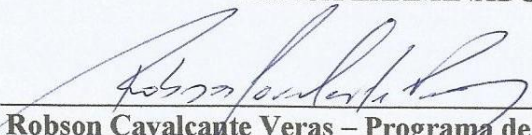
CDU: 612.39(043)

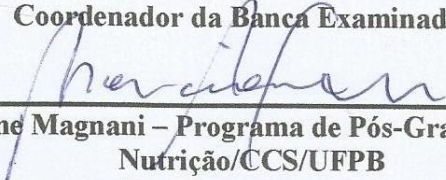
LORENA SOARES BEZERRA

**AÇÃO ANTIAGREGANTE E MODULADORA DA FUNÇÃO
VASCULAR DA β -GLUCANA EXTRAÍDA DE *Saccharomyces cerevisiae* E
DA FORMA CARBOXIMETILADA DERIVADA**

Dissertação de Mestrado aprovada em ____ / ____ /2016.

BANCA EXAMINADORA


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


Profa. Dr. Marciane Magnani – Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Nutrição/CCS/UFPB
Examinador Interno

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

Profa. Dr. Liana Clébia Moraes Pordeus - Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Nutrição/CCS/UFPB
Examinador Suplente Interno

Profa. Dr. Fabíola Fialho Furtado Gouvêa – Escola de Técnica de saúde/ UFCG
Examinador Suplente Externo

À minha mãe, Railda, com amor

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus, que até mesmo nos momentos de incredulidade me guiou, me protegeu, me deu força e coragem para seguir firme na busca de mais uma conquista;

Aos meus pais, Antônio Bezerra e Railda Soares, pelo amor e dedicação. Em especial a minha mãe, que sempre me encorajou a dar o melhor de mim e me fortaleceu nos momentos de fraqueza. Tudo é por vocês e para vocês;

À minha irmã Floriza Soares, que é minha grande amiga e parceira, e em todos os momentos esteve ao meu lado, acreditando e se orgulhando de mim;

À Família Souza Freire: Dona Marta, Sr. Ademir, Marina, Milena, Medianeira, Ana Maria e Débora, que me acolheram em João Pessoa e me fizeram parte da família. Em especial a Manuela, pelo companheirismo de todos os dias, pelo apoio incondicional e incentivo constante nos momentos bons e principalmente nos ruins;

Ao professor e orientador Dr. Robson Cavalcante Veras por confiar a mim a execução dessa pesquisa, e por sua paciência em me orientar e me guiar por caminhos que ainda não havia percorrido na minha jornada acadêmica;

Ao professor Isac Almeida de Medeiros, por me acolher em seu laboratório e por dispor todos os equipamentos necessários para que esse trabalho acontecesse;

À professora Marciane Magnani pela disponibilidade, pelas orientações e principalmente por mediar o fornecimento das β -Glucanas;

Ao Professor Raul Jorge Castro Gomez por fornecer tão prontamente as substâncias que utilizo nessa pesquisa;

Aos companheiros de laboratório que me ensinaram técnicas e farmacologia sempre com paciência e disposição, e contribuíram de forma direta ou indiretamente, profa Islânia, George,

Mayara, Tereza Raquel, Alzimary, Rayanne, Valéria, Kivia, Priscila. Em especial, a Natália Tabosa que tanto me orientou quanto as técnicas e/ou esclarecendo dúvidas; a Renata Layne, que sempre esteve disposta a ajudar com bom humor e otimismo; a Hassler Cavalcante, que por vezes abdicou dos fins de semana para me ajudar e dar gavagem; e a Thays Amanda que, com generosidade, transmitiu um pouco do seu conhecimento e experiência no laboratório e me ajudou nos experimentos.

À Fatima Azevedo, pelo carinho, preocupação e apoio;

À José Crispim Duarte, pela disponibilidade, paciência e acessibilidade ao biotério;

Aos meus amigos e amigas, que perto ou longe fizeram parte desse momento, dividindo medos, anseios, vitórias... sempre com palavras de incentivo, muita torcida, boas risadas e leveza;

Aos professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição pelo convívio e aprendizado;

Ao **MCTI/CNPq/MEC/Capes**, pelo apoio financeiro e concessão de bolsa de mestrado.

*“É preciso força pra sonhar e perceber
Que a estrada vai além do que se vê”*

Marcelo Camelo

RESUMO

As β -D-glucanas são polissacarídeos constituintes da parede celular de leveduras, como a *Saccharomyces Cerevisae*. Evidências mostram que esses polímeros possuem diversos efeitos benéficos, principalmente relacionados a imunomodulação. Entretanto, a sua ação sobre a função plaquetária e endotelial é pouco estudada. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da (1-3) (1-6) β -d-glucana extraída de *S. cerevisiae* e do seu derivado carboximetilado (CM-G) sobre a função vascular e plaquetária em ratos. Os animais foram tratados por via oral com CM-G e BG-Sc na dose de 20 mg/Kg, diariamente, durante oito dias, e os controles receberam solução salina como placebo. Ao final, foram coletados o sangue e a artéria aorta torácica para estudos de agregação e ativação plaquetária por transmissão luminosa, citometria de fluxo, reatividade vascular e dosagem de citocinas. Foram realizados estudos *in vitro* de agregação e ativação plaquetária induzida por adenosina difosfato (ADP) e colágeno com a CM-G em diferentes concentrações (100 e 300 μ g/mL). Constatou-se redução significativa dos níveis de IL-8 ($4,18 \pm 0,72$ pg/mL) no grupo tratado com CM-G ao se comparar com o grupo controle ($22,7 \pm 6,9$ pg/mL) e com o grupo BG-Sc ($16,4 \pm 2,4$ pg/mL). Os estudos de reatividade mostraram que a BG-Sc e a CM-G não exerceram influência sobre a resposta vascular da fenilefrina (PHE) em relação ao controle. No grupo tratado com BG-Sc, a resposta aos agentes vasorelaxantes acetilcolina (ACH; $E_{max} = 90,2 \pm 14,1\%$; $pD_2 = 6,36 \pm 0,30$ M) e nitroprussiato de sódio (NPS; $E_{max} = 92,3 \pm 2,4\%$; $pD_2 = 10,21 \pm 0,10$ M) foram prejudicadas em relação aos controles (ACH: $E_{max} = 100 \pm 7,5\%$; $pD_2 = 8,17 \pm 0,25$ M; NPS: $E_{max} = 100 \pm 9,5\%$; $pD_2 = 11,18 \pm 0,27$ M). Porém, o tratamento com a CM-G ($E_{max} = 93,1 \pm 2,7\%$; $pD_2 = 11,71 \pm 0,07$ M) aumentou a potência do NPS quando comparado com o controle ($E_{max} = 100 \pm 9,5\%$; $pD_2 = 11,18 \pm 0,27$ M). Os estudos de agregação plaquetária *in vitro* por transmissão luminosa revelam que a CM-G inibiu a agregação estimulada por ADP nas doses de 100 e 300 μ g/mL, atingindo $25,7 \pm 2,7\%$ e $14,8 \pm 3,2\%$ de agregação, respectivamente. Quando a agregação foi induzida pelo colágeno, apenas a dose 300 μ g/mL teve ação inibitória ($33 \pm 6,2\%$). O efeito antiagregante foi similar ao ácido acetilsalicílico quando a agregação foi induzida por ADP. Inibição da agregação também foi demonstrada na técnica de citometria de fluxo, porém observou-se que a CM-G não afetou a ativação plaquetária. Nos animais tratados, verificou-se inibição da agregação plaquetária induzida por ADP ($45 \pm 3,9\%$ e $45 \pm 6\%$, respectivamente). Entretanto, quando induzido por colágeno, o efeito antiagregante foi visto apenas nos animais que receberam BG-Sc ($22,6 \pm 7,7\%$). O tratamento e os ensaios de agregação *in vitro* sugerem que a CM-G parece ser mais seletiva para o ADP. Os achados indicam que a CM-G e a BG-Sc apresentam efeito antiagregante e moduladora da função vascular. Assim, o uso desses polissacarídeos pode ser uma possível ferramenta para a prevenção de doenças cardiovasculares.

Palavras Chaves: β -D-glucana, *Saccharomyces cerevisiae*, derivado carboximetilado, agregação, ativação, reatividade vascular

ABSTRACT

The β -D-glucans are polysaccharides constituting the cell wall of yeasts such as *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence shows polymers have several beneficial effects, mainly related to immunomodulation. However, their action on platelet and endothelial function is understudied. This study aimed to evaluate the effect of (1-3) (1-6) β -D-glucan extracted from *S. cerevisiae* and derivative carboxymethylated (CM-G) on vascular and platelet function in rats. The animals were treated orally with CM-G and BG-Sc at a dose of 20 mg/kg daily for eight days and the controls received saline as placebo. At end, were collected blood and thoracic aortic artery to study platelet activation and aggregation by light transmission, flow cytometry, vascular reactivity and cytokine assay. *In vitro* studies of platelet activation and aggregation induced by adenosine diphosphate (ADP) and collagen were conducted with CM-G at different concentrations (100 and 300 μ g/mL). Significant reduction in IL-8 levels ($4,18 \pm 0,72$ pg/mL) in the group treated with CM-G was also found when compared to control ($22,7 \pm 6,9$ pg/mL) and the BG-Sc group ($16,4 \pm 2,4$ pg/mL). The reactivity studies shows BG-Sc and CM-G had no influence on vascular response to phenylephrine (PHE) compared to the control. In the group treated with BG-Sc, the response to vasorelaxantes agents such as acetylcholine (ACH; $E_{max} = 90,2 \pm 14,1\%$; $pD_2 = 6,36 \pm 0,30$ M) and sodium nitroprusside (SNP; $E_{max} = 92,3 \pm 2,4\%$; $pD_2 = 10,21 \pm 0,10$ M) were impaired compared to controls (ACH: $E_{max} = 100 \pm 7,5\%$; $pD_2 = 8,17 \pm 0,25$ M; SNP: $E_{max} = 100 \pm 9,5\%$; $pD_2 = 11,18 \pm 0,27$ M). However, treatment with CM-G ($E_{max} = 93,1 \pm 2,7\%$; $pD_2 = 11,71 \pm 0,07$ M) increased the potency of NPS when compared with the control ($E_{max} = 100 \pm 9,5\%$; $pD_2 = 11,18 \pm 0,27$). *In vitro* studies of platelet aggregation by light transmission reveals CM-G inhibited the aggregation stimulated by ADP in doses of 100 and 300 mg/ml, reaching $25,7 \pm 2,7\%$ and $14,8 \pm 3,2\%$ of aggregation, respectively. When aggregation was induced by collagen, only the dose 300 mg/ml had inhibitory activity ($33 \pm 6,2\%$). The antiplatelet effect was similar to acetylsalicylic acid when the aggregation was generate by ADP. Aggregation inhibition was also demonstrated by flow cytometry, however was observed that CM-G had no effect on platelet activation. In treated animals, there was inhibition of platelet aggregation induced by ADP ($45\% \pm 3,9$ and $45 \pm 6\%$, respectively). However, when induced by collagen, antiplatelet effect was observed only in animals receiving the BG-Sc ($22,6 \pm 7,7\%$). The treatment and *in vitro* aggregation assays suggest that CM-G appears to be more selective for ADP. The findings indicate the CM-G and BG-Sc feature antiplatelet effect and modulating vascular function. Thus, the use of these polysaccharides may be a possible tool for the prevention of cardiovascular diseases

Key words: β -Dglucan, *Saccharomyces Cerevisiae*, derivative carboxymethylated, platelet aggregation, activation, vascular reactivity

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Dissertação

Figura 1 – Componentes da parede celular de leveduras	19
Figura 2 – Ativação imune induzida pela β -D-glucana	23
Figura 3 - Representação estrutural da cadeia lateral da CM-G	25
Figura 4 - Participação das plaquetas no processo de hemostasia	28
Figura 5 - Representação da verificação da viabilidade do órgão e da integridade do endotélio vascular	42

Artigo

Figure 1: Cytokine levels in the blood plasma from animals treated with BG-Sc (20 mg/kg) and CM-G (20 mg/kg) for eight days. Data are expressed as the mean $\pm$ SEM (n=8). *P<0.05 vs control	64
Figure 2: Concentration-response curve in aortic rings from rats treated with CM-G (20 mg/kg) and BG-Sc (20 mg/kg). a) PHE (10^{-10} - 10^{-5} M); b) ACH (10^{-10} - 10^{-5} M); c) SNP (10^{-12} - 10^{-6} M). Data are expressed as the mean $\pm$ SEM (n=8). *P<0.05 vs control	65
Figure 3: <i>In vitro</i> effect of different concentrations of CM-G (100 and 300 μ g/mL) and ASA (50 μ M) on the platelet aggregation and activation induced by: a) 10 μ M ADP; b) 25 μ g/mL Collagen; c) 200 μ M ADP e d) 10 μ g/mL Collagen. Data are expressed as the mean $\pm$ SEM (n=8). *P<0.05 vs control	67
Figure 4: Effect of the oral administration of CM-G (20 mg/kg) and BG-Sc (20 mg/kg) for eight days on the platelet aggregation induced by: a) 10 μ M ADP b) 25 μ g/mL Collagen. Data are expressed as the mean $\pm$ SEM (n=8). *P<0.05 vs control	69

LISTA DE TABELAS

Dissertação

Tabela 1 - Agonistas envolvidos na ativação plaquetária e seus efeitos nas plaquetas	31
Tabela 2 - Classificação dos fármacos antiplaquetários de acordo com o mecanismo de ação	32
Tabela 3 – Composição da solução HEPES para Plasma Rico em Plaquetas	39
Tabela 4 – Composição da solução de Krebs para aorta torácica isolada de rato	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA – Ácido araquidônico
ACH - Acetilcolina
ADP – Adenosina difosfato
Akt – Proteína quinase B
AMPC – Adenosina monofosfato cíclico
ATP – Adenosina trifosfato
BG-Sc – β -D-glucana extraída de *Saccharomyces cerevisiae*
C₆H₁₂O₆ - Glicose
CaCl₂ - Cloreto de cálcio
Card 9-Caspase 9
CLEC – Receptor semelhante a lectina tipo C
CM-G – Carboximetil-glucana
COX – Cicloxigenase
CR-3 - Receptor do sistema complemento 3
DCV – Doenças Cardiovasculares
DL50 – Dose letal 50
Emax – Efeito máximo
EPM - Erro padrão da média
FEN - Fenilefrina
FvW – Fator von Willebrand
FHDE – Fator hiperpolarizante derivado de endotélio
GP - Glicoproteína
GMPc – monofosfato-3,5-guanosina cíclica
IL - Interleucina
IP3 – Trifosfato inositol
KCl - Cloreto de potássio
KH₂PO₄ - Fosfato monopotássico
LacCer: lactosil-ceramida
LDL – Lipoproteína de baixa densidade
LPS – Lipopolissacarídeo
MgSO₄ - Sulfato de magnésio

MAPK - Proteína quinase ativada por mitógenos

MDA – Malondialdeído

MIP2 - Proteína inflamatória de macrófagos-2

MRB – Modificadores da resposta biológica

MyD88 – Gene 88 de resposta primária de diferenciação mielóide

NaCl- Cloreto de sódio

NaHCO₃ - Bicarbonato de sódio

NFAT - Fator nuclear de células T ativadas

NF-kB - Fator nuclear kappa B

NO – Óxido nítrico

NOS – Óxido nítrico sintase

NPS – Nitroprussiato de sódio

NK – *Natural killers*

PAR – Receptores ativados por protease

PD₂ - Potência

PGG₂ – Prostaglandina G₂

PGH₂ – Prostaglandina H₂

PGI₂ - Prostaciclina

PMAP – Padrão molecular associado a patógenos

PKA – Proteína quinase A

PKC - Proteína quinase C

PI3K - Fosfoinositídeo 3 quinase

PPP – Plasma pobre em plaquetas

PRP – Plasma rico em plaquetas

RAPG – Receptor acoplado a proteína G

SYK - Proteína tirosina quinase

TLR – Receptor *Toll-like*

TNF – Fator de necrose tumoral

TRAF-6 - Fator 6 associado a receptor de TNF

TXA₂ – Tromboxano A₂

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVO GERAL	17
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
3.1. β -D-GLUCANAS DE LEVEDURAS	18
3.1.1. Aspectos estruturais e bioatividade	18
3.1.2. Forma Carboximetilada da β-D-glucana (CM-G)	24
3.2. SISTEMA HEMOSTÁSICO COMO UM POSSÍVEL ALVO PARA AÇÃO DE β -GLUCANAS	27
3.2.1. Receptores e Agonistas Plaquetários	29
3.2.2. Agentes Antiplaquetários	32
3.3. FUNÇÃO VASCULAR	34
4. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	37
4.1 TIPO DE ESTUDO E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	37
4.2 ANIMAIS	37
4.3 OBTENÇÃO DA β -D-GLUCANA E DA CM-G	37
4.4 ENSAIOS FARMACODINÂMICOS	38
4.4.1 Ensaio <i>in vitro</i>	39
4.4.1.1 Soluções Fisiológicas e Substâncias	39
4.4.1.2 Obtenção do sangue total e preparação das plaquetas lavadas de rato	40
4.4.1.3. Medida da agregação plaquetária por transmissão luminosa	40
4.4.1.4 Medida da agregação plaquetária por citometria de fluxo	41
4.4.1.5 Avaliação do tratamento com CM-G e BG-Sc na reatividade vascular	41
4.4.2. Dosagem de citocinas por citometria de fluxo	43
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
REFERÊNCIAS	49
APÊNDICE	55
ANEXOS	77

1.INTRODUÇÃO

As β -D-glucanas são constituintes estruturais da parede celular de leveduras, como a *Saccharomyces cerevisiae*, e consistem em homopolímeros de glicose que apresentam uma cadeia principal unidas em β 1-3 e ramificações com ligações β 1-6. Estes polímeros recebem uma especial atenção por sua bioatividade, principalmente no que se refere à imunomodulação. No Japão, β -D-Glucanas de leveduras são aprovadas pelo governo para serem usados na imunoterapia de pacientes com câncer, já que possuem a habilidade de ativar células do sistema imune, além de apresentar efeitos citotóxicos (OOI e LIU, 2000; BROWN et al., 2003; KRIZKOVÁ et al., 2003; AKRAMIENE et al., 2007; NAMEDA et al., 2007; CHAN et al., 2009; CLOETENS et al., 2012).

A literatura sugere que a estrutura, o peso molecular, a presença e a extensão de ramificação e solubilidade podem influenciar a atividade biológica da β -D-glucana. Assim, modificações químicas na estrutura desses polissacarídeos como a carboximetilação, pode ser uma ferramenta para potencializar sua bioatividade e aplicações terapêuticas (BOHN e BEMILLER, 1995; EL ENSHASY e HATTI-KAUL, 2013; KAGIMURA et al., 2014; ZHU et al., 2016). A carboximetil-glucana (CM-G) obtida da (1-3) (1-6) β -D-glucana de *S. cerevisiae* é um dos derivados solúveis mais estudados, apresentando ação antimutagênica, antígeno tóxica, antioxidante e anticâncer (MAGNANI, 2010; ARAUJO et al., 2015).

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 as doenças cardiovasculares (DCV), a exemplo da hipertensão e da aterosclerose, uma vez que produzem trombos de difícil tratamento agudo, muitas vezes ainda no ambiente intravascular. Uma forma de impedir estes eventos coagulantes é a utilização de drogas antiagregantes que podem atuar ativando enzimas inibidoras da coagulação, antagonizando a ação de agonistas pró-coagulantes endógenas, ou aumentando a disponibilidade do óxido nítrico (NO) (GURBEL et al., 2004; SALUK-JUSZCZAK et al., 2010a; b).

A recomendação de adoção de uma dieta saudável e rica em compostos como as β -D-glucanas que podem, dentre outras ações, melhorar o sistema hematológico e cardiovascular devido a sua ação imunomoduladora e antioxidante tem se destacado. Em geral, esses polissacarídeos são hábeis em proteger organismos vivos contra o ataque de espécies de radicais livres, uma vez que apresentam elevada atividade de captação destes radicais que são naturalmente formados no organismo, e assim podem reduzir o risco de diversas DCV (OOI e

LIU, 2000; BROWN et al., 2003; AKRAMIENE et al., 2007; CHEN e SEVIOUR, 2007; CHAN et al., 2009; MAGNANI, 2010; SALUK-JUSZCZAK et al., 2010b; 2011).

A classe de fármacos que compõem os antiagregantes é deficiente de integrantes, sendo preenchida por poucos componentes que também apresentam ação na função endotelial (SHARIS et al., 1998; MORALES VIDAL e RULAND, 2013). Desta forma, o apelo de uma investigação *in vivo* e *in vitro* sobre a atividade plaquetária da β -D-glucana como moduladora direta da função endotelial ou adjuvante da ação de antiagregantes disponíveis no mercado é relevante para a comunidade científica, pois pode gerar informações que direcionem o crescimento do uso destes polímeros tanto na área de fármacos como de alimentos.

No que se refere à ação das β -D-glucanas obtidas de *S. cerevisiae* na sua forma insolúvel ou solúvel (derivatizada) sobre as plaquetas e o endotélio, existe uma lacuna no conhecimento científico e pouco se pode inferir sobre esta possível atividade a partir dos dados disponíveis até o presente momento. Todavia, no presente estudo foi observado ação antiagregante tanto da insolúvel como da forma derivatizada em testes *in vivo* e *in vitro*, assim como melhora da responsividade do vaso a agonistas vasoativos e redução de citocinas pró-inflamatórias.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antiagregante da β -D-glucana extraída de *Saccharomyces cerevisiae* (BG-Sc) e da sua forma carboximetilada (CM-G), bem como o potencial inflamatório e a influência destes polímeros sobre a reatividade vascular em ratos.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a atividade antiagregante da BG-Sc e da CM-G em ratos;
- Avaliar a atividade antiagregante da CM-G in vitro;
- Comparar a sensibilidade e acurácia do efeito antiagregante das glucanas em teste através de duas diferentes técnicas: transmissão luminosa e citometria de fluxo;
- Avaliar o potencial inflamatório da BG-Sc e CM-G em ratos;
- Aferir a influência do tratamento com BG-Sc e CM-G sobre a reatividade vascular frente a ação de agonistas vasoativos.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. β -D-GLUCANAS DE LEVEDURAS

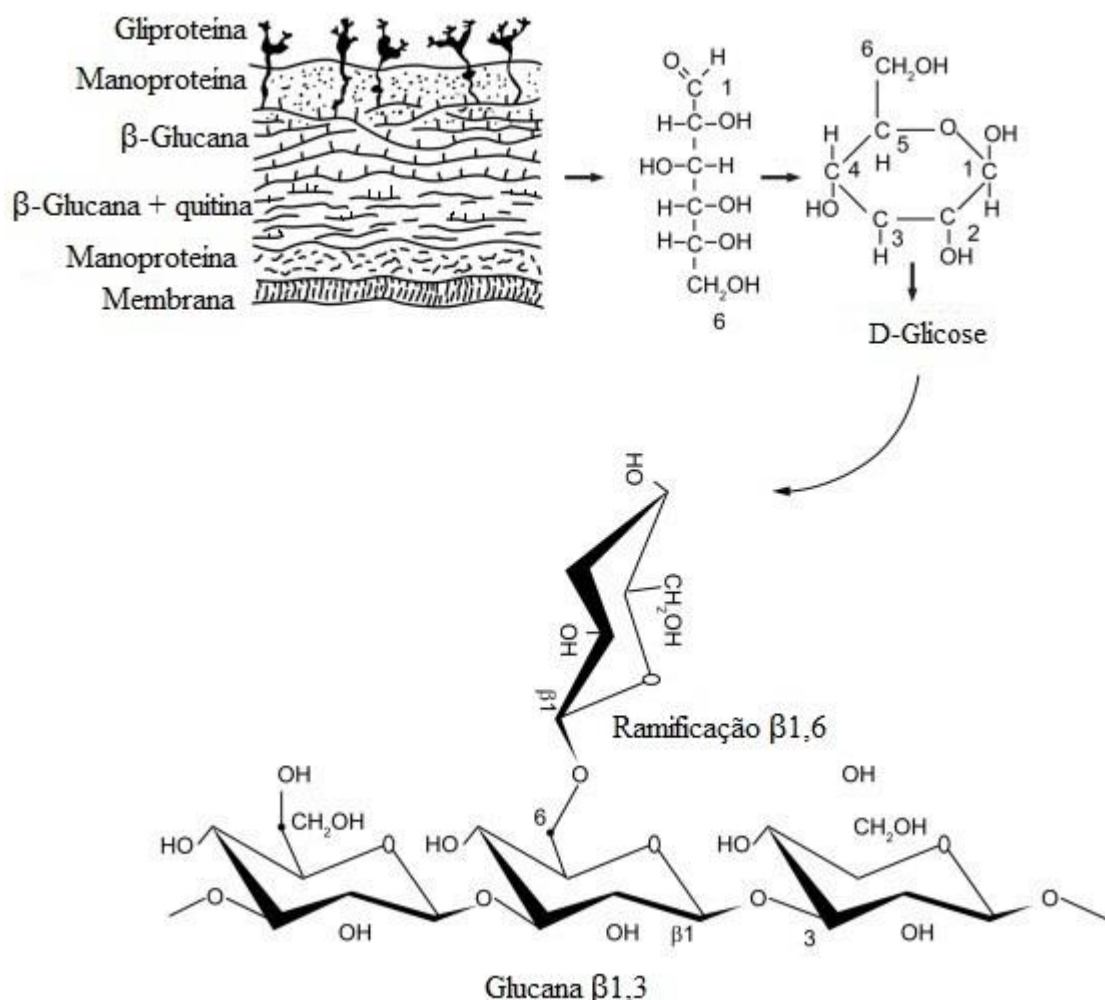
3.1.1. Aspectos estruturais e bioatividade

As leveduras são fungos unicelulares capazes de crescer em diversas fontes de carbonos gerando um grande volume de biomassa, com amplo potencial de exploração comercial. Esses microrganismos são utilizadas em vários processos biotecnológicos, como fabricação de produtos de panificação, farmacêuticos, cerveja, vinhos e outras bebidas alcoólicas (SCENI et al., 2009). Dentre as leveduras com potencial emprego biotecnológico, destacam-se as pertencentes ao gênero *Saccharomyces* devido a sua ampla aplicação na indústria, sobretudo em cervejarias. Leveduras deste gênero caracterizam-se pelo rápido crescimento, boa capacidade de produção de etanol e uma elevada tolerância ao estresse ambiental (PIKUR e LANGKJÆR, 2004).

Em cervejarias, as leveduras do gênero *Saccharomyces* são empregadas para realização da fermentação e após o processo elas são descartadas gerando grandes volumes de células excedentes (ZECHER-KRPAN et al., 2010; COSTA et al., 2011). Esta realidade desperta a busca de alternativas para utilização deste subproduto visando atenuar os impactos ambientais, e conseqüentemente, diminuir os custos de tratamento de resíduo-efluentes das indústrias.

A parede celular de *S. cerevisie* é uma importante fonte de β -D-glucana, que é constituída por um esqueleto linear central de unidades de glicose ligadas na posição β (1-3) com cadeias laterais unidas em β (1-6), que ocorrem em diferentes intervalos e têm tamanhos variados (MAGNANI e CASTRO-GÓMEZ, 2008) (Figura 1). Tais polissacarídeos representam, estruturalmente, uma classe diversa de macromoléculas com larga ocorrência na natureza. Elas contém unidades estruturais repetidas unidas por ligações glicosídicas que se projetam em várias direções e que os fazem possuir uma variabilidade estrutural altíssima carreando consigo grande capacidade bioativa (OOI e LIU, 2000). Estudos têm revelado que tanto a massa molar como a hidrosolubilidade destes polímeros, as quais dependem da ramificação estrutural e modificações químicas, são propriedades críticas para o uso clínico destas moléculas (SAMUELSEN et al., 2014; ZHU et al., 2016). A β -D-glucana alvo deste estudo, obtida de *S. cerevisiae*, possui massa molar em torno de 350 kDa (ŠANDULA et al., 1999b)

Figura 1 – Componentes da parede celular de leveduras



Fonte: adaptado de CHAN et al., 2009

Há relatos discordantes na literatura quanto a influência da massa molar sobre a eficácia da β-D-glucana (BOHN e BEMILLER, 1995; EL ENSHASY e HATTI-KAUL, 2013). Aparentemente, as mais eficazes clinicamente possuem massa molar acima de 200 kDa, principalmente devido a sua afinidade aos receptores das células imunes (EL ENSHASY e HATTI-KAUL, 2013). Por outro lado, a escleroglucana, uma fração ramificada (β1-6) com menos de 5 kDa, exibe uma potente atividade imunoestimulante, aumentando a produção do Fator de Necrose Tumoral (TNF) – alfa e a proliferação linfocitária (BIMCZOK et al., 2009) e a lentinana, de baixo peso molecular, apresenta uma elevada atividade antitumoral (ZHANG et al., 2005).

Apesar de haver descrição na literatura de β -D-glucanas lineares com significativa atividade biológica (JAMOIS et al., 2005; CHEN e SEVIOUR, 2007), as ramificadas geralmente apresentam uma maior variedade de efeitos biológicos e também uma maior potência e eficácia farmacológica (EL ENSHASY e HATTI-KAUL, 2013). Tem-se sugerido que os mais ativos apresentam grau de ramificação entre 20 e 33% (KIM, Y. T. et al., 2000; CHEN e SEVIOUR, 2007; MAGNANI et al., 2012). Outro aspecto que corrobora o aumento da eficácia é a modificação química que proporciona, no caso de formas carboximetiladas, um aumento da afinidade entre o polissacarídeo e o receptor da célula imune e, conseqüentemente, melhora a resposta biológica (TAO et al., 2006; CHEN et al., 2010; EL ENSHASY e HATTI-KAUL, 2013). No entanto, há pesquisadores que acreditam que este aumento da resposta é apenas devido ao aumento da solubilidade do composto em teste (TAO et al., 2006).

Em relação a toxicidade, estudos agudos em animais com β -D-Glucana de *S. cerevisiae* altamente purificada revelam que a administração de 2000 mg/kg não apresentou sinais de toxicidade, indicando que o valor da Dose Letal 50 (DL50) pode ser maior que 2000 mg/kg. No estudo de toxicidade sub-crônica, foram administradas as doses de 2,0; 33,3 ou 100 mg/kg por 91 dias consecutivos. Os resultados não apontaram efeitos nocivos na maior dose testada (BABÍČEK et al., 2007). A CM-G utilizada neste estudo não apresentou efeitos genotóxicos ou citotóxicos nas concentrações de 100 μ g/mL e 200 μ g/mL, respectivamente (MAGNANI et al., 2009).

Estudos indicam que as β -D-glucanas apresentam bioatividade, sobretudo no que se refere à imunomodulação. A história deste polissacarídeo, oriundo da levedura, como substância imunomoduladora teve início em torno de 1900, quando células de levedura inativaram o sistema complemento. Mais tarde, esse efeito foi atribuído ao zymosan, componente insolúvel da parede celular de leveduras, que contém glucana, manose, proteína, gordura e pequenas quantidades de glicosamina, fósforo e magnésio (SAMUELSEN et al., 2014).

Outros efeitos biológicos benéficos à saúde foram associados a β -D-glucanas. Dentre eles, há descrição de ação antitumoral, ativação leucocitária, antimutagênico, hipocolesterolêmico, antioxidante e hipoglicêmico (OOI e LIU, 2000; BROWN et al., 2003; KRIZKOVÁ et al., 2003; AKRAMIENE et al., 2007; CHAN et al., 2009; CLOETENS et al., 2012). Assim, o uso deste polissacarídeo possui um impacto positivo sobre cânceres e infecções, bem como são benéficas para indivíduos de meia idade, pessoas com vida potencialmente estressante e atletas (BROWN et al., 2003; CHEN e SEVIOUR, 2007; CHAN et al., 2009). Contudo, em relação aos seus efeitos sobre a função endotelial e plaquetária pouco

é compreendido e explorado (LOWE et al., 2002; SALUK-JUSZCZAK et al., 2010b).

As β -D-glucanas de leveduras também têm sido relacionadas a efeitos cardioprotetores, uma vez que demonstram ação anti-hipercolesterolêmica em humanos (NICOLOSI et al., 1999; EL KHOURY et al., 2012), capacidade de diminuir infarto em modelos de isquemia e reperfusão em porcos (AARSAETHER et al., 2012) e de reduzir o desenvolvimento de aterosclerose em ratos através da diminuição dos níveis sanguíneos de LDL oxidada (AOKI et al., 2015), porém a atividade sobre a pressão arterial parece não estar diretamente relacionada a estas moléculas (HAGIWARA et al., 2005).

Relatos na literatura que evidenciem atividade antiagregante da forma ramificada (β 1-3, β 1-6) extraída de *S. cerevisiae* e do derivado carboximetilado são ainda inexistentes. Observa-se apenas resultados relacionados à forma linear (β 1-3) da D-Glucana de *S. cerevisiae*, os quais demonstram uma significativa atividade antiplaquetária *in vitro* em diferentes concentrações de maneira dose-dependente, quando a agregação plaquetária foi induzida por Adenosina Difosfato (ADP), colágeno e trombina. Além disso, foi capaz de impedir a secreção plaquetária. As autoras especulam que esse efeito pode ser devido a inibição da via do ácido araquidônico (SALUK-JUSZCZAK et al., 2010b).

O consumo de β -D-glucanas causa melhorias na saúde do indivíduo e podem ser consideradas um componente biologicamente ativo. Farmacologicamente, esse polímero pertence à classe dos Modificadores de Resposta Biológica (MRB) e possuem a habilidade de estimular componentes celulares do sistema imune (BOHN e BEMILLER, 1995; SALUK-JUSZCZAK et al., 2010b). Embora algumas propriedades bioativas tenham sido atribuídas a estas moléculas, o mecanismo de ação mais compreendido e explícito na literatura são relacionados a atividade imunoestimulante.

Os Receptores de Reconhecimento Padrão (RRP) expressos nas células imunes (figura 2) são responsáveis por reconhecer Padrões Moleculares Associadas a Patógenos (PMAP) que são componentes da parede celular de organismos, como o lipopolissacarídeo (LPS) presente em bactérias gram-negativas e as β -glucanas nos fungos. Existem várias famílias desses receptores, dentre os de maior relevância encontram-se: Dectin-1; Receptor do Sistema Complemento 3, CR-3; “Scavengers”, grupo heterogêneo de moléculas; Lactosil – Ceramida (LacCer); Receptor “Toll-like” (TLR). O reconhecimento de PMAP por esses receptores desencadeia respostas celulares como aumento da fagocitose e da síntese de lisozima, aumento de espécies reativas de oxigênio, de intermediários de nitrogênio reativo, radicais livres, de citocinas próinflamatórias e de quimiocinas (TSONI e BROWN, 2008; THOMPSON et al., 2010).

O Dectin-1 e TLR têm sido considerados os principais RRP envolvidos no reconhecimento de β -D-glucanas, principalmente as do tipo linear. O Dectin-1 é, predominantemente, expresso em macrófagos, monócitos, neutrófilos, células T e dendríticas. Em humanos, também é expresso em células B, mastócitos e eosinófilos. A ligação da β -D-glucana com esse receptor desencadeia sinalizações intracelulares que resultam em respostas celulares, como maturação de células dendríticas, endocitose, fagocitose, *burst* respiratório, produção de metabólitos do ácido araquidônico e de várias citocinas e quimiocinas, como TNF, Interleucina (IL)-2, IL-6, IL-10 e IL-23. Em macrófagos, o dectin-1 é dependente da ativação de TLR para induzir tais repostas (TSONI e BROWN, 2008; REID et al., 2009).

O TLR, após a ligação com a beta-glucana, inicia uma via de sinalização que causa a ativação do Fator Nuclear Kappa B (NFkB) levando a produção de TNF e IL-2 e IL-12. Dentre os TLR, o TLR 2 e 4 são os mais envolvidos no reconhecimento de β -D-glucanas de leveduras. Esse receptor é expresso em macrófagos, células dendríticas, linfócitos e células epiteliais (LI et al., 2004; CHEN e SEVIOUR, 2007).

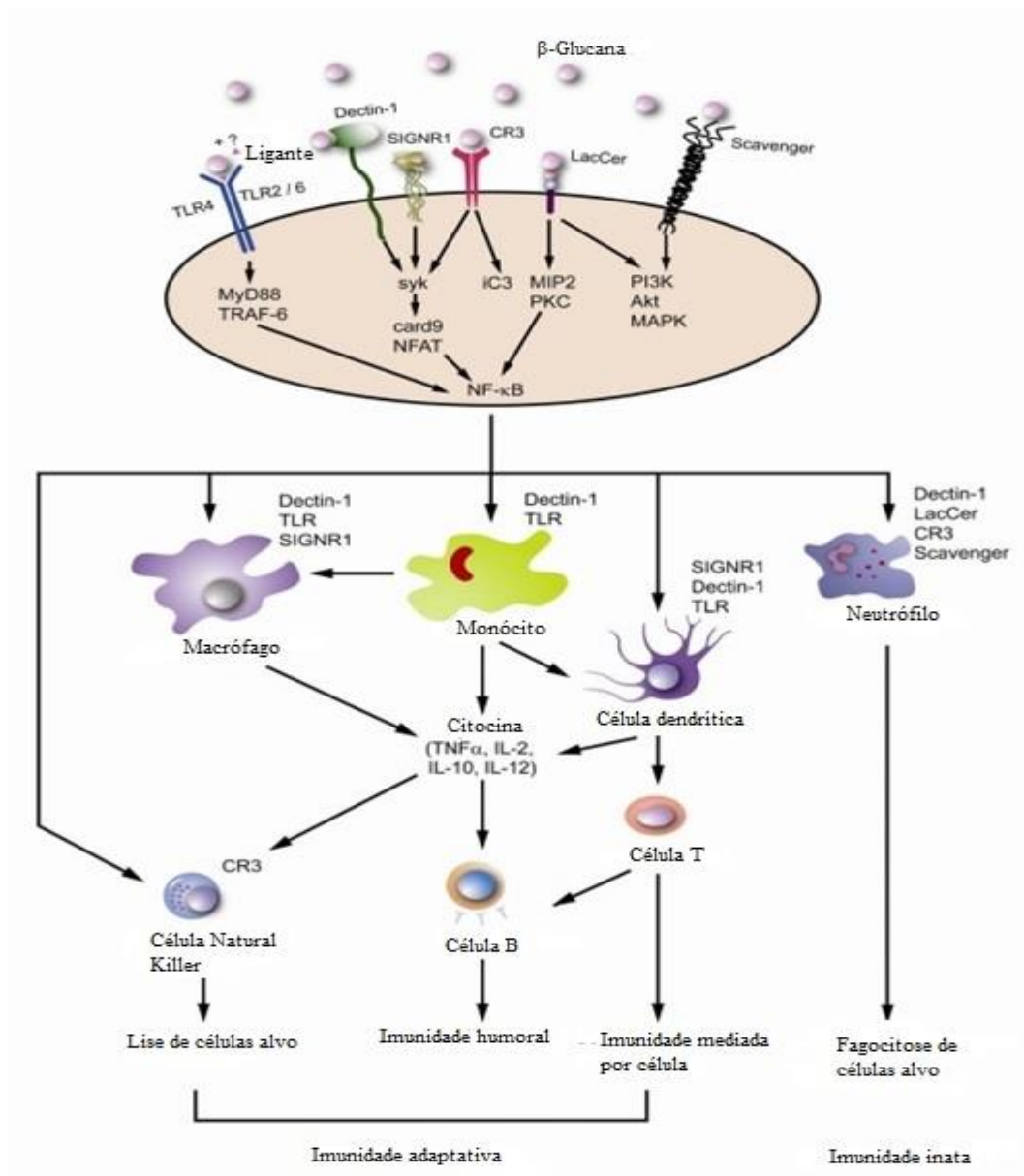
Há evidências que indicam a existência de RRP para β -D-glucans em células endoteliais vasculares humanas. Estudos de competição demonstraram a presença de locais de ligação para a laminarin, β -glucana de baixo peso molecular, e a forma sulfatada em culturas de células endoteliais da coronária e derme. Essa ligação foi saturável, dose dependente e específica. Além disso, essa interação resultou na ativação de vias de sinalização intracelular próinflamatória e aumento de citocinas, demonstrados pelo estímulo da expressão do NFkB e IL-8. Desse modo, esses polissacarídeos podem modular a atividade funcional de células endoteliais (LOWE et al., 2002).

As β -D-glucanas, através dos RRP, têm a capacidade de estimular a produção de citocinas, que apresentam um variedade de funções. As IL-2 e IL-6 têm ação pró-inflamatória, uma vez que podem ativar e proliferar células T, B e *natural killers* (NK) e induzir a diferenciação de células B e o surgimento de neoplasias, respectivamente. Já o TNF estimula a própria produção e de outras citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, estando envolvido em reações inflamatórias sistêmicas agudas e crônicas e no desenvolvimento de patologias autoimunes. Por outro lado, a IL-10 exerce ação anti-inflamatória através da redução da apresentação de antígenos e da inibição da ativação de células T (HIRANO et al., 1990; GAFFEN e LIU, 2004; GRÜTZ, 2005; CHU, 2013).

A quimiocina IL-8 está envolvida na degranulação e quimiotaxia de neutrófilos e, assim, tem atividade pró-inflamatória. Esta citocina ativa múltiplas vias de sinalização intracelular e sua expressão aumentada tem sido caracterizada em células cancerígenas, endoteliais,

infiltração de neutrófilos e macrófagos associados a tumor. A IL-8 promove angiogênese, aumenta a proliferação e sobrevivência de células endoteliais e cancerígenas. A expressão dessa citocina é aumentada diante de estímulos como o TNF, produtos virais ou bacterianos e estresse celular (HOFFMANN et al., 2002; WAUGH e WILSON, 2008).

Figura 2 - Ativação imune induzida pela β -D-glucana.



TLR: receptor *toll like*; CR3: receptor do sistema complemento-3; LacCer: lactosil-ceramida; TRAF-6: fator 6 associado a receptor de TNF; Syk: proteína tirosina quinase; card9- caspase 9; NFAT: fator nuclear de células T ativadas; MIP2: proteína inflamatória de macrófagos-2; PKC: proteína quinase C; PI3K: fosfoinositídeo 3 quinase; Akt: proteína quinase B; MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno; NF- κ B: fator nuclear kappa B. Fonte: adaptado de CHAN et al., 2009.

3.1.2 Forma Carboximetilada da β -D-glucana (CM-G)

A β -D-glucana, apesar de ser considerada um importante composto bioativo para a saúde, apresenta baixa solubilidade e isso tem estimulado o desenvolvimento de tecnologias que visam ampliar a sua aplicabilidade. Alguns métodos de modificação desse polissacarídeo são empregados no intuito de aumentar a funcionalidade e propriedades tecnológicas através de reações químicas e físicas. Desse modo, estes polissacarídeos podem ser submetidos a modificações químicas a fim de se obter derivados com potencial industrial ou com relevância biológica. No entanto, isso pode afetar as propriedades bioativas positivamente ou negativamente (ZHU et al., 2016).

Modificações químicas na estrutura de polissacarídeos como carboximetilação, fosforilação, acetilação e sulfonilação são consideradas importantes ferramentas para aumentar as propriedades, aplicações e bioatividade. Assim, β -D-glucanas modificadas podem mudar suas características químicas suficientemente para aprimorar a bioatividade, ampliando sua gama de aplicações. Dessa forma, a modificação química pode ser uma estratégia útil para o desenvolvimento de D-glucanos como agentes terapêuticos (KAGIMURA et al., 2014)

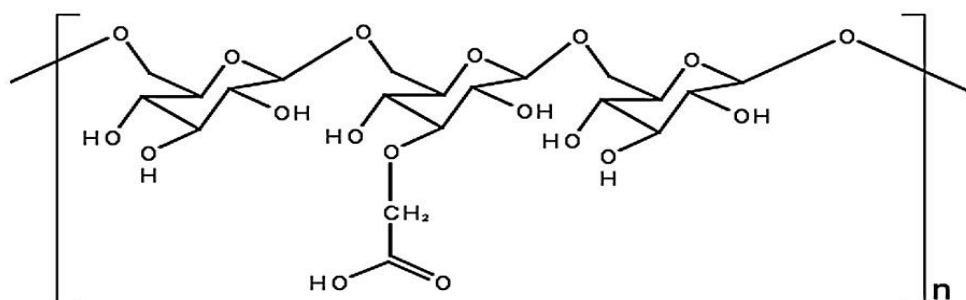
Em relação a bioatividade da CM-G (figura 3), a qual é obtida através da substituição dos grupos hidroxilas existentes por grupos carboxilas, tem-se demonstrado que essa modificação química em β -D-glucanas desencadeou melhora nas propriedades físico-químicas e biológicas. Observou-se aumento da sua solubilidade, da sua capacidade antioxidante e também aumento da atividade anticarcinogênica e imunomoduladora tanto *in vitro* como *in vivo* (KAGIMURA et al., 2014). A solubilidade dos derivados é proporcional ao grau de substituição no polímero. Assim, a forma carboximetilada (~220KDa) investigada no presente estudo apresenta um grau de substituição de 0,8 (ŠANDULA et al., 1999a; MAGNANI et al., 2009), o que lhe garante boa solubilidade em água (KIM, Y. T. et al., 2000; CHEMA et al., 2015).

Estudos demonstram potencial atividade antioxidante dos derivados carboximetilados de β -D-glucanas. Babincova *et al.*(2002) verificou que a CM-G da *S. cerevisiae* tem capacidade antioxidante com atividade sequestrante de radicais livres, sendo comparável com outros antioxidantes potentes já bem conhecidos, como tocoferol e manitol. Além disso, esse polímero exibiu efeito antioxidante em menores concentrações (5 a 20 μ M). Machová e Bystrický (2013) também mostraram que a CM-G de *S. cerevisiae* possui efeito antioxidante de maneira dose-dependente.

Efeito antioxidante também foi constatado com a CM-G oriunda da *Saccharomyces uvarum* em humanos saudáveis. A suplementação oral (50 mg) reduziu os níveis de malondialdeído (MDA), que é considerado um índice de peroxidação lipídica, após trinta e sessenta dias quando comparado ao grupo placebo (ARAÚJO et al., 2015).

Outras β -glucanas modificadas, como a carboximetilada oriunda de *Ganoderma atrum*, mostrou habilidade antioxidante e também melhorou a capacidade de fagocitose nos macrófagos bem como a secreção do TNF- α demonstrando, assim, ação imunomodulatória. Tais efeitos foram influenciados pelo grau de substituição na cadeia do polissacarídeo, indicando que o grau de modificação química é importante para a bioatividade desses derivados (CHEN et al., 2014).

Figura 3 – Representação estrutural da cadeia lateral da CM-G



Fonte: adaptado de KAGIMURA et al, 2014

A atividade antioxidante também foi observada na β -D-glucana modificada extraída da *Poria cocos*. Wang et al. (2014) testaram três diferentes tipos de derivados desse polissacarídeo, o sulfatado, carboximetilado e carboximetil sulfatado sobre a atividade antioxidante em ensaios *in vitro*. O derivado sulfatado apresentou ação antioxidante mais notável. Entretanto, o carboximetilado mostrou efeito semelhante à forma sulfatada, com inibição de ânion superóxido, de radical hidroxila e peroxidação lipídica superior a forma carboximetil sulfatada. Em estudo anterior, também observou-se efeito antioxidante e capacidade de ligação aos ácidos biliares *in vitro* (WANG et al., 2009). Recentemente, constatou-se que a forma carboximetil sulfatada possui melhor efeito imunomodulador e antitumoral *in vivo* em ratos (WANG et al., 2015).

O carboximetilado do polissacarídeo extraído do *Phellineus linteus* estimulou atividade citotóxica contra células de fibrosarcoma humano HT1080, sendo efetivo na supressão do

crescimento do tumor. Além disso, apresentou maior produção de óxido nítrico (NO) em células broncoalveolares em comparação com a β -glucana nativa. A indução da síntese de NO foi de maneira dose-dependente e a quantidade de NO produzido foi 1,8 vezes maior na concentração de 100 μ g/mL. Entretanto, também foi verificado uma leve redução na atividade sequestrante de radical livre (SHIN et al., 2007)

A literatura sugere que a carboximetilação também promove melhora da atividade antitumoral. O derivado carboximetil sulfatado de β -D-glucana extraída do *Poria cocos* em ratos com sarcoma foi avaliado e os resultados demonstraram que foi capaz de inibir o crescimento do tumor. O exame histológico do tumor tratado teve sinais de necrose e apoptose. Os autores especulam que a modificação química, provavelmente, melhorou o contato do polissacarídeo com os receptores das células imunes através de ligações de hidrogênio e atração eletrostática, levando a uma forte reposta imunológica que resultou na inibição da proliferação das células cancerígenas. Além disso, verificou-se aumento da atividade dos fagócitos, sugerindo uma ação imunomodulatória (CHEN et al., 2010).

Slameňová et al (2003) obtiveram CM-G, sulfoetil glucana da *S. cerevisiae* e o carboximetil quitina-glucana extraída do *Aspergillus niger* e avaliaram *in vitro* em células do pulmão de hamster. Os resultados apontam que a CM-G teve maior habilidade de reduzir atividade genotóxica, quando comparado com os outros derivados testados, indicando efeito protetor contra danos oxidativos no DNA.

Evidências mostram efeito protetor contra danos no DNA e aumento dos níveis de leucócitos, células sanguíneas vermelhas, plaquetas, hematócrito e hemoglobina de pacientes com câncer de próstata avançado que receberam CM-G obtida de *S. cerevisiae*. Além disso, foi demonstrado que ocorreu estímulo de células CD4 e CD8 no sangue periférico dos pacientes que carregavam o genótipo CCR5, receptor crucial para respostas imunes, sugerindo uma interação de imunomodulação da CM-G e o receptor (MAGNANI, 2010; MAGNANI et al., 2012). Dergunova et al, (2009) também evidenciaram propriedade imunomodulatória, uma vez que uma única administração intraperitoneal de CM-G estimulou macrófagos *in vivo* e causou aumento significativo de leucócitos.

3.2. SISTEMA HEMOSTÁSICO COMO UM POSSÍVEL ALVO PARA AÇÃO DE β -GLUCANAS

O funcionamento da hemostasia primária é influenciado pelas plaquetas, vasos sanguíneos e, principalmente, pelo endotélio vascular. As plaquetas são lançadas dos megacariócitos na medula óssea, apresentam diâmetro entre 2-3 μ e tem tempo de vida curto, circulando na corrente sanguínea por nove a dez dias. Possuem em sua estrutura um sistema microtubular, mitocôndrias, grânulos alfa, grânulos densos e lisossômicos e um intrínseco sistema de membranas internas. Possuem forma discóide e sua superfície encontra-se lisa. São especializadas na hemostasia sanguínea primária, na defesa imune inata, moduladores da resposta inflamatória e participam do processo de cicatrização. Assim, quando ocorre um dano na parede de um vaso, as plaquetas são recrutadas da circulação até a matriz subendotelial e formam um tampão hemostático. Esses componentes celulares têm como função primária a hemostasia, mas também estão envolvidas na trombose. As plaquetas podem apresentar, no mínimo, dois estágios de atividade: ativo ou de repouso (SMITH et al., 1981; JURK e KEHREL, 2005; PIERDONÁ, 2011; MOROI e WATSON, 2015).

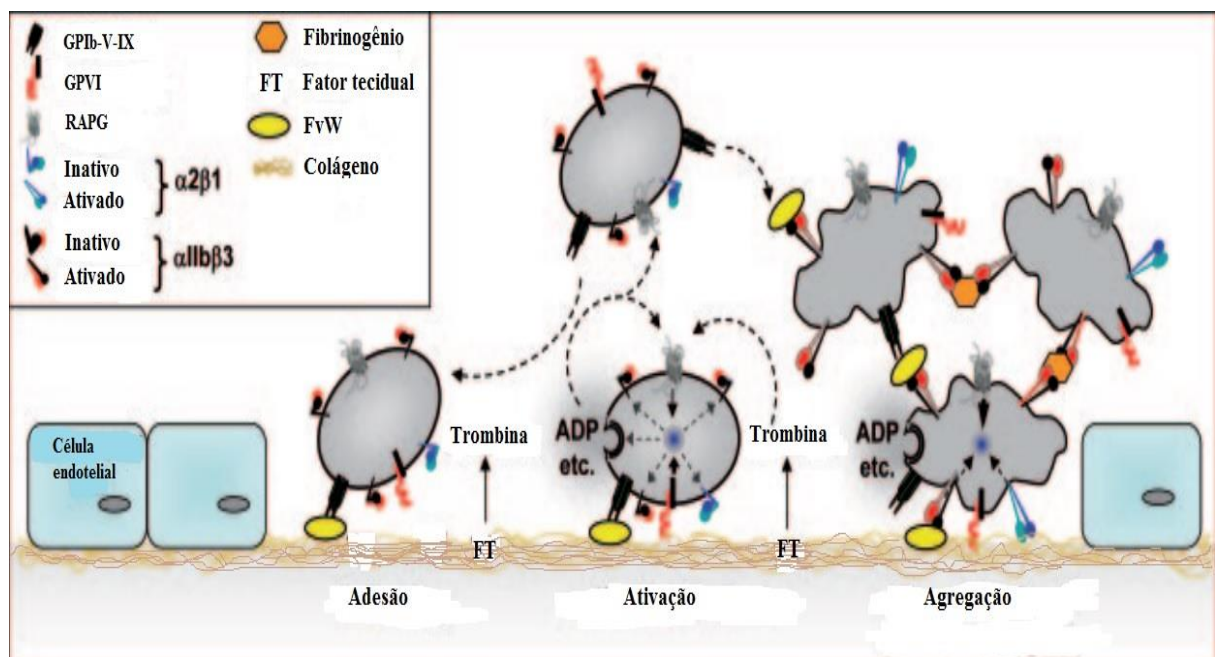
As glicoproteínas presentes na membrana das plaquetas e os grânulos secretados desempenham papel essencial na hemostasia e são marcadores laboratoriais de ativação plaquetária, que incluem mudança conformacional dependente de ativação no complexo glicoproteico GPIIb-IIIa (integrina α IIb β 3), exposição da proteína de membrana dos grânulos, ligação de proteínas plaquetárias secretadas e o desenvolvimento de superfície pró-coagulante. O complexo GPIIb-IIIa é um receptor para o fibrinogênio, fator von Willebrand (FvW), vitronectina e fibronectina, sendo fundamental para a agregação plaquetária. Já a glicoproteína (GP) Ib-V-IX é o receptor para FvW, leucócitos e P-selectina de plaquetas ou células endoteliais ativadas e está envolvida no início e na propagação da agregação. A P-selectina é uma proteína presente nos grânulos alfa das plaquetas e são expostas na sua membrana quando estão ativadas. Ela media a adesão de plaquetas ativadas a monócitos e neutrófilos (MICHELSON, Alan D et al., 2000; ANDREWS et al., 2006).

Sob condições fisiológicas, as plaquetas circulam em estado quiescente, protegidas da ativação graças a mediadores inibitórios liberados das células endoteliais intactas, como o NO, prostaciclina (PGI₂) e adenosina (ZARBOCK et al., 2007; PIERDONÁ, 2011). Um outro estágio que as plaquetas podem ser encontradas é o ativado, no qual a matriz subendotelial é uma superfície altamente reativa para elas, fazendo com que um processo lesivo possa desencadear reações de ativação. A resposta plaquetária durante a ativação pode ser reconhecida através de

vários eventos progressivos e superpostos que consistem em: alteração da forma das plaquetas e adesão no local de injúria, secreção do conteúdo presente em seus grânulos e agregação plaquetária (figura 4) (DOPHEIDE et al., 2001; PIERDONÁ, 2011; PROJAHN e KOENEN, 2012).

Quando um vaso sofre uma lesão, essas células se tornam ativadas e interagem com o colágeno subendotelial exposto (figura 4). Assim, as plaquetas se aderirão ao vaso lesado através da interação da GP Ib-V-IX com o FvW, que fica ligado ao colágeno exposto. Isso possibilita a interação do colágeno com a GP IV, que inicia eventos de sinalização que causam a mudança de conformação de integrinas (α Ib β 3 e α 2 β 1) permitindo, assim, a ligação do FvW ao fibrinogênio e colágeno. Após ativação desses receptores, mediadores secundários como ADP e Tromboxano A₂ (TxA₂) são secretados e ativam receptores, dando suporte a função hemostática e trombótica dessas células (MOROI e WATSON, 2015).

Figura 4 - Participação das plaquetas no processo de hemostasia



GP: glicoproteína; RAPG: receptor acoplado a proteína G; FvW: fator von Willebrand

Fonte: adaptado de VARGA-SZABO et al, 2008

O processo secretório é fundamental para a função das plaquetas e compreende a exocitose de três tipos de grânulos secretórios: grânulos alfa, lisossômicos e densos. Estes últimos são compostos por Adenosina Difosfato (ADP), Adenosina Trifosfato (ATP),

serotonina, fosfato inorgânico, polifosfatos, cálcio, entre outros que estimulam a atividade plaquetária. Esses fatores, liberados a partir dos grânulos, têm efeitos biológicos sobre outras células. Além disso, as plaquetas podem interagir com patógenos bacterianos e expressar receptores do complemento, e se convertem em células envolvidas na imunogenicidade do organismo (MCNICOL e ISRAELS, 1999; JURK e KEHREL, 2005; LÓPEZ FARRÉ e MACAYA, 2013).

A relação das plaquetas com o sistema imune é bem estabelecida, uma vez que expressam vários receptores imunes na superfície celular, tais como receptores do tipo *Toll-like*, receptores de imunoglobulina ou as proteínas co-estimuladoras CD40 e CD40L. Outra característica que as plaquetas apresentam em comum com células do sistema imunológico é a presença de grânulos no citoplasma que podem ser exocitados após estimulação específica. Isso permite a liberação orientada de mediadores e a regulação instantânea dos receptores de superfície nos locais de inflamação. Essas células também são capazes de modular as funções dos leucócitos, tais como fagocitose ou extravasamento direto ou em cooperação com células endoteliais de vasos inflamados. Evidências ainda mostram que as plaquetas são capazes de capturar e neutralizar os patógenos diretamente (DUERSCHMIED et al., 2014).

O endotélio também exerce influência na manutenção da hemostasia através da produção e liberação de moléculas vasoprotetoras. Em condições fisiológicas, o endotélio é antiaderante e antiagregante, uma vez que produz NO, PGI₂ e adenosina que agem inibindo a ativação e adesão plaquetária. Além disso, secretam substâncias que tem atividade anticoagulante e que promovem fibrinólise (KAZMI et al., 2015)

3.2.1. Receptores e Agonistas Plaquetários

O ADP é um agonista amplificador da ativação inicial das plaquetas através de dois receptores purinérgicos P2Y acoplados a proteína G. O receptor P2Y₁ contribui para o início da agregação plaquetária induzida por ADP por meio da ativação da fosfolipase C, provocando a mudança da forma da plaqueta e início da onda primária de agregação plaquetária através da mobilização de cálcio. Já o receptor P2Y₁₂ é considerado de maior relevância para a completa agregação de plaquetas, uma vez que atua estabilizando os agregados plaquetários através da inibição da adenilil ciclase que resulta na redução da formação de Adenosina Monofosfato Cíclico (AMPC) e, conseqüente, ativação plaquetária. Em virtude disso, é alvo de fármacos antiplaquetários (ZHOU e SCHMAIER, 2005; HECHLER e GACHET, 2011; LÓPEZ FARRÉ e MACAYA, 2013). Esse agonista também atua nos receptores P2Y das células endoteliais para

liberar prostaciclina e NO provocando, assim, vasodilatação. Já o TXA₂ é um dos principais amplificadores da ativação plaquetária e é sintetizado nas plaquetas como consequência da liberação de ácido araquidônico pela ação da fosfolipase A₂ (MCNICOL e ISRAELS, 1999; JURK e KEHREL, 2005).

Vários agonistas mobilizam cálcio através de receptores acoplados a proteína G que ativa a fosfolipase A₂, resultando na liberação de Ácido Araquidônico (AA) a partir da fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina e também ativa a cadeia leve de miosina. O ácido araquidônico é convertido em TXA₂ pela Cicloxigenase (COX) e sintase tromboxano, que mobiliza cálcio dos estoques intracelulares. O TXA₂, em conjunto com a cadeia leve de miosina ativada, estimula a secreção de produtos dos grânulos plaquetários envolvidos na coagulação (ZHOU e SCHMAIER, 2005).

A plaquetas apresentam receptores α_2 adrenérgicos para epinefrina que atua como agonista plaquetário por meio da inibição da adenil ciclase e liberação do cálcio do retículo endoplasmático através do inositol trifosfato e da fosforilação da plestrina pela proteína quinase C (PKC) por intermédio da via do diacilglicerol. A epinefrina também potencializa a agregação induzida por baixas concentrações de ADP, trombina, TXA₂ e colágeno (YUN-CHOI et al., 2000; ZHOU e SCHMAIER, 2005).

Outros agonistas da atividade plaquetária são a trombina e o colágeno. Este é responsável pelo início da adesão plaquetária e, subsequente, ativação na matriz extracelular do endotélio desnudo por meio de receptores na superfície das plaquetas como a GPIa/IIa (integrina $\alpha_2\beta_1$), que contribui para adesão e o receptor GP VI, o qual é responsável pela ativação e sinalização plaquetária levando a formação de TXA₂. A trombina é considerado um potente ativador plaquetário, com habilidade de estimular a secreção plaquetária quando não há agregação. A sinalização mediada pela trombina ocorre através de Receptores Ativados por Protease ligados a proteína G 1 (PAR-1) e 4 (PAR-4) (ZHOU e SCHMAIER, 2005; SAVAGE, Brian e RUGGERI, Zaverio M, 2007). O PAR-1 é o principal receptor de trombina e é capaz de ativar as plaquetas em concentrações baixas de trombina (LÓPEZ FARRÉ e MACAYA, 2013). A Tabela 1 apresenta os agonistas que participam da atividade plaquetária, seus respectivos receptores, bem como seus efeitos.

Além dos receptores para agonistas plaquetários acima descritos, as plaquetas também expressam RRP como TLR2, TLR4 e TLR9 e o CLEC-2 que pertencem a família de receptores transmembrana semelhante a lectina tipo C como o dectin-1. Este receptor tem como ligando a rodocitina, uma proteína encontrada em veneno de cobra, que desencadeia ativação plaquetária, agregação e subsequente coagulação sanguínea. Além disso, está implicado na atividade

fagocítica de neutrófilos, sugerindo potencial ação no sistema imune (ANDONEGUI et al., 2005; SALUK-JUSZCZAK et al., 2010b; PLATO et al., 2013).

Tabela 1- Agonistas envolvidos na ativação plaquetária e seus efeitos nas plaquetas

Ativador plaquetário	Receptor	Efeitos
ADP	P2Y ₁	Alteração da forma das plaquetas (P2Y ₁)
	P2Y ₁₂	Agregação transitória (P2Y ₁)
		Agregação irreversível (P2Y ₁₂)
		Expressão de P-selectina (P2Y ₁₂)
		Lançamento de tromboxano A ₂ (P2Y ₁ e P2Y ₁₂)
		Recrutamento de plaquetas para o local de lesão (P2Y ₁₂)
		Indução da atividade procoagulante e agregação (P2Y ₁₂)
Tromboxano A ₂	TP α	Recrutamento e agregação das plaquetas para formação de um tampão primário
	TP β	
Serotonina	5HT-2 ^A	Recrutamento das plaquetas para o local de lesão
		Indução da atividade procoagulante
Epinefrina	α_{2A}	Papel complementar na sinalização do receptor P2Y ₁₂
Colágeno	GPIb	Ativação do complexo GPIIb-IIIa
	GPIIb-IIIa	Liberação de ADP e tromboxano A ₂
		Disseminação e agregação plaquetária
	GPIa-IIa GPVI	Indução da atividade procoagulante via liberação de Ca ²⁺
Trombina	PAR-1	Agregação plaquetária (PAR-1)
	PAR-4	Liberação de ADP, tromboxano A ₂ (PAR-4), serotonina (PAR-1) e epinefrina (PAR-1)
		Ativação/mobilização de P-selectina e ligante CD40 (PAR-1)
		Indução da atividade procoagulante (PAR-1)

Fonte: adaptado de JENNINGS, 2009

3.2.2. Agentes Antiplaquetários

Os agentes antiplaquetários são utilizados para tratar e prevenir trombooses arteriais, aterosclerose, distúrbios cardiovasculares e cerebrovasculares, uma vez que a agregação plaquetária é um processo central no desenvolvimento dessas patologias. Contudo, esta classe farmacológica é deficiente de integrante quando relacionado ao aumento da função endotelial, além de apresentar algumas limitações de uso devido aos efeitos adversos. Assim, é de grande relevância o desenvolvimento de fármacos ou de compostos moduladores que atuem de forma positiva na redução da atividade plaquetária e melhora da função endotelial (SHARIS et al., 1998; METHAROM et al., 2015).

Dentre os fármacos com ação antiplaquetária, o ácido acetilsalicílico que inibe a síntese do TXA₂ por meio da acetilação irreversível da COX, é o mais comumente estudado e prescrito. Outros agentes antiplaquetários bem conhecidos são o dipiridamol, clopidogrel e cilostazol. Nos últimos anos, múltiplos ensaios clínicos têm avaliado a eficácia desses agentes em alguns cenários clínicos. Além disso, novos agentes como o prasugrel e trifusal, foram estudados em pacientes com história de acidente vascular cerebral ou ataque isquêmico transitório. (BADIMON e VILAHUR, 2013; MORALES VIDAL e RULAND, 2013).

Os fármacos antiplaquetários são classificados em dois grupos de acordo com o seu mecanismo de ação: inibidores de enzimas plaquetária e antagonistas de receptores plaquetários (tabela 2).

Tabela 2 – Classificação dos fármacos antiplaquetários de acordo com o mecanismo de ação

ANTIAGREGANTES PLAQUETÁRIOS	
INIBIDORES ENZIMÁTICOS	
Inibidor de ciclooxigenase	Aspirina
Inibidor de fosfodiesterase	Dipiridamol
ANTAGONISTAS DE RECEPTORES	
	Ticlopidina
Antagonistas de receptores ADP	Clopidogrel
	Prasugrel
	Eptifibatide
Inibidores de GPIIb-IIIa	Tirofiban
	Abciximab

Fonte: adaptado de PALOMO et al., 2009

A ativação plaquetária é modulada por sinais ativadores e inibidores, que são expostos na superfície celular. As plaquetas apresentam diversos mecanismos e estratégias para transmitir estímulos extracelulares ao interior da célula, resultando em uma resposta funcional apropriada. Para isso, há a participação de mecanismos complexos e altamente coordenados de transmissão de sinais que incluem: receptores, ativação de proteínas (proteínas G), metabolismo do fosfatidilinositol, metabolismo do AA, movimentos de cálcio, reorganização do esqueleto e diversos processos de fosforilação de proteínas (JENNINGS, 2009).

As enzimas que participam desse processo são: fosfolipase C, que desdobra o fosfatidilinositol 4,5 difosfato em diacilglicerol e inositol trifosfato; fosfolipase A₂, a qual libera AA dos fosfolípidos da membrana plaquetária; COX-1, que metaboliza o AA em endoperóxidos cíclicos, prostaglandinas G₂ (PGG₂) e H₂ (PGH₂); tromboxano sintetase, que transforma os endoperóxidos em tromboxano (TXA₂); Adenilil-ciclase, a qual produz AMPc a partir da ATP; fosfodiesterase, que metaboliza AMPc a AMP; e as quinases (PKC), tirosinas quinase, proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) e quinases lipídicas, que participam dos processos de transdução de sinais no citosol plaquetário. Assim, algumas drogas antiplaquetárias agem inibindo a atividade dessas enzimas (JENNINGS, 2009; PALOMO et al., 2009).

Outros agentes antiplaquetários atuam inibindo receptores das GP de membrana, como as GPIa-IIa, GPIV e GPVI, que estão envolvidas na adesão plaquetária ao colágeno da matriz endotelial. O complexo GPIb-IX-V tem um papel importante para ativação das plaquetas pela trombina e também atua como receptor para o FvW, que é essencial para a adesão das plaquetas ao vaso lesado. Já o complexo GPIIb-IIIa é um receptor para o fibrinogênio, FvW, fibronectina e vitronectina. Esse receptor é fundamental para ativação plaquetária. Há ainda outros fármacos que têm como mecanismo de ação inibir receptores não glicoproteicos, os quais são classificados em: receptores ativadores (receptores de ADP: P2Y₁ e P2Y₁₂, receptores ativados por proteases, receptores de trombina: PAR1 e PAR4 e receptor de TXA₂) e receptores inibidores (receptores para prostaglandinas I₂ ou prostaciclina (E₁ e D₂) e adenosina)(BORN e PATRONO, 2006; PALOMO et al., 2009).

3.3. FUNÇÃO VASCULAR

O endotélio, constituído pela camada de células endoteliais que reveste a superfície dos vasos sanguíneos, é considerado um órgão com funções relevantes que envolvem a regulação da permeabilidade e do tônus vascular, da coagulação sanguínea, da ativação de leucócitos, hemostasia e a reatividade das plaquetas. Essas células contribuem para a regulação dos tônus vascular através da liberação de poderosos vasodiladores como a PGI₂, NO, Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio (FHDE) e também por meio da metabolização de substâncias vasoativas como catecolaminas, angiotensina, bradicinina e prostaglandinas. Tais funções são executadas devido a presença de receptores ligados a membrana para várias moléculas, incluindo proteínas, partículas de transporte de lipídeos, metabólitos e hormônios, bem como através de proteínas juncionais específicas e receptores que comandam as interações célula-célula e matriz-célula (MONCADA et al., 1988; MONCADA e HIGGS, 2006; RAJENDRAN et al., 2013).

A PGI₂ é o principal metabólito produzido pela via do ácido araquidônico sob ação da COX em células endoteliais. Essa molécula inibe a agregação plaquetária e a contração induzida por TXA₂. Tal efeito ocorre pela sua ligação com receptor de membrana acoplado a proteína G específico, o receptor PGI₂ tipo 1 (IP), que ativa a adenilil ciclase e gera AMPc, o qual funciona como um segundo mensageiro para ativar a proteína quinase A (PKA), resultando no relaxamento das células musculares lisas vasculares e inibição da reatividade plaquetária. Essa via é essencial para manter o estado pró-trombótico (CHU et al., 2015).

O FHDE, que hiperpolariza as membranas celulares e provoca o relaxamento da célula lisa muscular, tem ação vasodilatadora por meio da ativação dos canais de potássio ativados por cálcio presentes no endotélio. Esse fenômeno tem origem primariamente elétrico e impulsiona a hiperpolarização endotelial que se espalha por dentro da parede dos vasos. O FHDE pode ser modulado pelo NO (KOBUCHI et al., 2015).

Alterações na produção desses mediadores podem desenvolver disfunção endotelial, a qual é caracterizada por algumas condições patológicas, incluindo alterações das propriedades anticoagulantes e anti-inflamatórias do endotélio, menor modulação do crescimento vascular e desregulação da remodelação vascular. Contudo, esse termo tem sido utilizado para se referir a uma redução no vasorelaxamento dependente de endotélio causado pela perda da bioatividade do NO (CAI e HARRISON, 2000). Essas alterações estão associadas principalmente a DCV, como hipertensão, doença da artéria coronária, doença vascular periférica, insuficiência

cardíaca crônica, diabetes, insuficiência renal crônica, infecções virais severas e estresse oxidativo (RAJENDRAN et al., 2013).

Diversos fármacos com atividade sobre a função endotelial foram desenvolvidos visando a melhora da disfunção endotelial. Esses agentes terapêuticos agem inibindo e regulando receptores ou enzimas, como a COX e a óxido nítrico sintase (NOS), envolvidas nas vias de sinalização dos mediadores liberados pelo endotélio, principalmente sobre a via do NO (SUDANO et al., 2006), que é um gás altamente lipofílico e difusível, podendo permear membranas biológicas e atingir alvos fora do compartimento celular em que foram gerados. Essa molécula foi descrita pela primeira por Furchgott e Zawadzki (1980) e denominado como fator relaxante derivado do endotélio. Atualmente, o NO é reconhecido como um importante fator antiaterogênico no sistema vascular devido a sua ação vasoprotetora (SCHMITT e DIRSCH, 2009).

O NO é sintetizado somente após ativação da NOS, a qual apresenta três isoformas: a endotelial (eNOS), a neuronal (nNOS) e a indutível (iNOS). Esta é ativada após estímulos patológicos como bactérias e citocinas, sendo expressas em macrófagos, linfócitos, neutrófilos, células de Kupffer, hepatócitos e células epiteliais. A nNOS é expressa nos neurônios e a eNOS no endotélio. A ativação dessas enzimas depende de co-fatores como fosfato adenina dinucleotídeo (NADPH), flavina mononucleótido, flavina adenina dinucleótido, tetra-hidrobiopterina (BH4) e calmodulina. Estímulos físicos como a tensão de cisalhamento e químico como agonistas endógenos e exógenos (acetilcolina, ATP e bradicinina) podem também desencadear a ativação de NOS (ZAGO e ZANESCO, 2006; FÖRSTERMANN e SESSA, 2012).

Após ser produzido, o NO se difunde através da membrana da célula endotelial e entra na célula muscular lisa vascular, onde ativa a guanilato ciclase causando o aumento da concentração intracelular de monofosfato-3,5-guanosina cíclica (GMPc) que resulta na redução do cálcio intracelular e, conseqüentemente, ocasiona a vasodilatação. Outros mecanismos pelos quais essa via pode induzir o vasorelaxamento incluem: inibição da geração de trifosfato inositol (IP3), desfosforilação da cadeia leve de miosina, inibição de influxo de cálcio, ativação de proteína quinase, estimulação da membrana Ca^{2+} -ATPase e abertura de canais de potássio. Assim, o GMPc age como um segundo mensageiro mediando alguns efeitos biológicos do NO, incluindo a regulação do tônus vascular e da função plaquetária (ZAGO e ZANESCO, 2006; SCHMITT e DIRSCH, 2009; BONDONNO et al., 2015).

O NO derivado do endotélio é um potente vasodilatador e o equilíbrio entre o NO, os vasoconstrictores derivados do endotélio e o sistema nervoso simpático mantém o tônus do vaso

sanguíneo. Essa molécula também tem a capacidade de inibir a agregação plaquetária, a migração de leucócitos, a adesão celular ao endotélio e atenua a migração e proliferação das células musculares lisas vasculares. Também pode suprimir a ativação e expressão de moléculas de adesão e influenciar a produção de ânion superóxido (VALLANCE e CHAN, 2001; BONDONNO et al., 2015). Além disso, observou-se em testes *in vitro* que o NO inibiu a secreção de IL-6 e IL-8 pelo endotélio, sugerindo propriedade anti-inflamatória (DE CATERINA et al., 1995)

O endotélio é o principal tecido de contato de qualquer substância absorvida na corrente sanguínea e, desse modo, representa um potencial local de ação de compostos ingeridos diariamente. Uma vez que a eNOS se tornou conhecida por sua ação anti-inflamatória e anti-aterogênica, a busca por produtos naturais e fármacos com propriedade moduladora da produção de NO pelo endotélio têm aumentado significativamente (SCHMITT e DIRSCH, 2009).

4. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

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*. Para execução da pesquisa, o projeto foi submetido à análise da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-IPeFarm) da UFPB sendo aprovado sob parecer nº 0511/14 (anexo 1).

4.2 ANIMAIS

Todos os protocolos foram desenvolvidos utilizando ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) pesando entre 250-300 g, provenientes da Unidade de Produção de Animais do IPeFarm/UFPB, onde foram mantidos sob condição controlada de temperatura (21 ± 1 °C), em ciclo claro-escuro de 12 horas e com livre acesso à alimentação e água.

Os animais foram acomodados em gaiolas plásticas microisoladoras de dimensão 49x34x16 (CxLxA, em cm), cada uma com no máximo 4 ratos. Sinais clínicos tais como: aparência (asseio, piloereção, corrimento ocular ou nasal), consumo de ração e água, frequência cardíaca e respiratória, mobilidade, vocalização e automutilação foram avaliados para determinar o nível de estresse, dor ou sofrimento. Somente animais considerados saudáveis foram utilizados neste estudo.

4.3 OBTENÇÃO DA β -D-GLUCANA E DA CM-G

A β -D-glucana e a CM-G foram obtidas 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, 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 ressuspendido 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 Protamax® 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 presente em um, 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 et al., 1999a). A β -D-glucana e a CM-G obtidas foram dializadas 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.

4.4 ENSAIOS FARMACODINÂMICOS

Os animais foram divididos em três grupos (n=8): Controle, Carboximetil-Glucana (CM-G; 20 mg/Kg) e β -D-Glucana de *S. cerevisiae* (BG-Sc; 20 mg/kg). As substâncias foram diluídas em água e administradas oralmente por gavagem (i.g.) uma vez ao dia, durante oito dias. O grupo controle recebeu salina (i.g.) como placebo.

Cada grupo incluiu oito animais, para atender as exigências estatísticas de testes matemáticos utilizados com nível de confiança de 95%, e de acordo com o cálculo preconizado por Altman (1990).

A dose de 20 mg/kg foi escolhida em virtude da atividade protetora contra infecção bacteriana, contra injúria renal e hepática e redução da pressão arterial em modelos de choque induzido por LPS em ratos (SANDVIK et al., 2007).

4.4.1 Ensaios *in vitro*

4.4.1.1 Soluções Fisiológicas e Substâncias

Para o preparo das soluções nutritivas, utilizadas nos protocolos *in vitro*, foram utilizadas as seguintes substâncias: cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio (CaCl₂), sulfato de magnésio (MgSO₄), glicose (C₆H₁₂O₆), bicarbonato de sódio (NaHCO₃), fosfato monopotássico (KH₂PO₄) e HEPES, conforme demonstrado nas tabelas 3 e 4. Durante a realização dos experimentos foram utilizadas as seguintes substâncias: cloridrato de L (-) fenilefrina (FEN); cloridrato de acetilcolina (ACH); nitroprussiato de sódio (NPS); adenosina difosfato (ADP); colágeno. Todos esses sais e drogas foram adquiridos na Sigma-Aldrich Brasil Ltda (São Paulo-SP, Brasil). A xilazina e cetamina foram adquiridos na Syntec (São Paulo, Brasil) e a heparina na Blau (São Paulo, Brasil). O kit de *Cytometric Bead Array* (CBA) e o anticorpo anti-GPIIb-FITC foram adquiridos na BD Bioscience (São Paulo, Brasil) e o anti-P-selectin-PE na Santa Cruz Biotechnology (São Paulo, Brasil)

Tabela 3 – Composição da solução HEPES para plasma rico em plaquetas

SAIS	CONCENTRAÇÃO (mM)
NaCl	132,0
KCl	6,0
MgSO ₄	1,0
KH ₂ PO ₄	1,2
HEPES	20,0
Glicose	5,0

Fonte: DE CUYPER et al, 2013

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

SAIS	CONCENTRAÇÃO (mM)
NaCl	118,0
KCl	4,6
CaCl ₂	2,5
MgSO ₄	5,7
KH ₂ PO ₄	1,1
NaHCO ₃	25,0
Glicose	11,0

Fonte: GUEDES et al, 2004

4.4.1.2 Obtenção do sangue total e preparação das plaquetas lavadas de rato

O sangue foi coletado da veia cava inferior nos ratos anestesiados com cetamina e xilazina (75mg/kg:10 mg/kg, i.p), usando seringas estéreis (3 mL) heparinizadas. O sangue obtido foi dividido em duas amostras. A primeira foi depositada em tubo de plástico siliconado contendo solução HEPES com aproximadamente o dobro de seu volume. Em seguida, foi centrifugado a 2300g por 10 minutos para obtenção do Plasma Pobre em Plaquetas (PPP). Com a outra parte foi obtido o Plasma Rico em Plaquetas (PRP) por centrifugação a 120g por 15 minutos, sendo ajustado para 2×10^7 plaquetas/mL (SHATTIL et al., 1987; DE CUYPER et al., 2013).

4.4.1.3 Medida da agregação plaquetária por transmissão luminosa

Com a finalidade de avaliar o efeito direto da CM-G sobre a atividade plaquetária, o PRP foi incubado a 37 °C durante 15 minutos no agregômetro com agitação contínua a 1000 rpm na presença de ácido acetilsalicílico (ASA; 50 µM) ou de CM-G nas concentrações de 100 ou de 300 µg/mL (SALUK-JUSZCZAK et al., 2010b) e, então, estimulado com ADP (10 µM) ou colágeno (25 µg/mL) ao longo de 5 minutos (YONEDA et al., 2004; HUANG et al., 2007). A agregação plaquetária foi medida utilizando agregômetro (AgreGO, São Paulo, Brasil). Mudanças na transmissão da luz foram registradas e a agregação máxima foi estimada. O percentual de agregação plaquetária foi expresso pela transmissão máxima de luz obtida na

amostra. Os valores basais de agregação foram determinados usando uma amostra de PPP (YONEDA et al., 2004).

4.4.1.4 Medida da agregação e ativação plaquetária por citometria de fluxo

O PRP foi preparado em meio HEPES com 2% de heparina e ajustado para 2×10^7 plaquetas/mL (SHATTIL et al., 1987; DE CUYPER et al., 2013). Após isso, foi adicionado CM-G nas concentrações 100 µg/mL e 300 µg/mL e os anticorpos Anti-GPIb-FITC (Anti-Integrina Beta-3-isotiocianato de fluoresceína) (BD Pharmingen™, EUA, cod. 554952) para identificação das plaquetas e Anti-P-Selectina-PE (Santa Cruz, EUA, cod. sc-8419) para verificar a ativação das plaquetas com exteriorização dos grânulos, na diluição de 1:100. Em seguida, foi incubado por 25 minutos a 37°C sob agitação e, logo após, estimulado com ADP (200 µM) ou colágeno (10 µg/mL). Logo após, foram fixados em paraformaldeído tamponado a 2% em diferentes tempos (1, 2, 5, 10 e 15 minutos), mantidos a 4°C por uma hora e levados ao citômetro FACS Canto-II equipado com laser de argônio com 15mW e $\lambda = 488\text{nm}$ para leitura das amostras e análise no software DIVA 6.0 (BD, Santa Mônica, CA, EUA). Foram adquiridos 10.000 eventos, com exclusão de debris e restos celulares definidos pelo “threshold” do FSC (Forward scatter), e sinais de fluorescência foram captados nas seguintes faixas de comprimento de onda: 515-545 para o FITC e 564-606 para o PE. Os agregados plaquetários foram representados por um aumento do tamanho (FSC) e expressão da GP-Ib (AULT et al., 1989). A expressão da P-selectina foi quantificada para determinar a via de ativação plaquetária (MICHELSON, A. D. et al., 2000). Mudanças na fluorescência (F1) foram normalizadas com a fluorescência obtida na amostra tratada com PBS (F0) e foram expressas como F1/F0.

4.4.1.5 Avaliação do tratamento com CM-G e BG-Sc na reatividade vascular

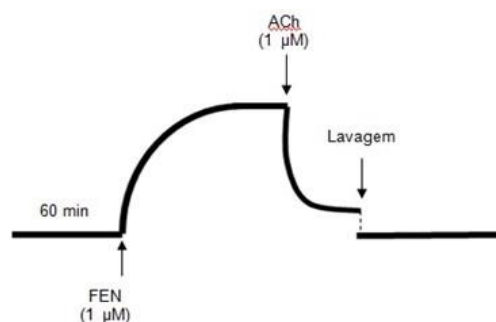
Os animais foram eutanasiados e, por meio de uma incisão na região ventral do animal, a artéria aórtica torácica foi identificada, removida e imediatamente posta em solução de Krebs a 4°C, para dissecação e secção dos vasos em anéis (1-2 mm de comprimento). Cada anel foi imerso em cubas (10 mL) e suspenso verticalmente por uma haste de platina, fixadas a um transdutor de força (MLT020, ADInstruments, Austrália). Os tecidos foram mantidos em solução de Krebs, a 37 °C, aeradas com uma mistura de 95% de O₂ e 5% de CO₂ (carbogênio; White Martins, Brasil). Todos os anéis foram submetidos a uma tensão basal de aproximadamente 2,0 g, por um período de estabilização de 60 minutos (FURCHGOTT e

ZAWADZKI, 1980), com troca da solução nutritiva a cada 15 minutos e ajuste da linha de base, quando necessário (ALTURA e ALTURA, 1970).

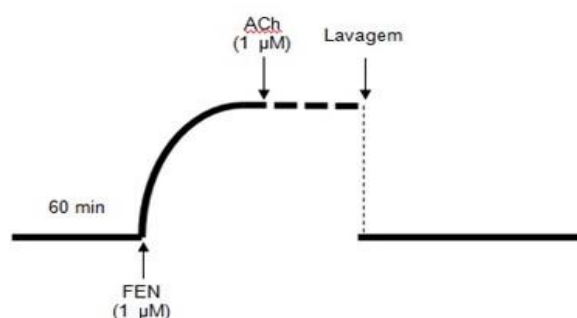
Para verificar a viabilidade do tecido e presença da funcionalidade do endotélio, após o período de estabilização, foi obtida uma contração com PHE (1 μ M). Na fase tônica da contração, a ACH (1 μ M) foi adicionada à cuba para avaliar a integridade do endotélio vascular. Anéis sem endotélio funcional foram obtidos pela remoção mecânica da camada endotelial através do atrito provocado pela fricção 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 60% sobre a pré-contracção com 1 μ M de PHE e a retirada do endotélio foi confirmada quando o relaxamento foi inferior a 10% (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980). Em seguida, foram obtidas curvas concentração-resposta para PHE (10^{-10} - 10^{-5} M) e para ACH (10^{-10} - 10^{-5} M) e NPS (10^{-12} - 10^{-6} M), logo após a contração induzida por PHE (1 μ M) atingir sua fase tônica.

Figura 5 - Representação da verificação da viabilidade do órgão e da integridade do endotélio vascular. A) Presença do endotélio e B) Ausência do endotélio funcional

A)



B)



4.4.2. Dosagem de citocinas por citometria de fluxo

O kit *Cytometric Bead Array* foi adquirido na Becton Dickinson (São Paulo, Brasil) e os ensaios foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. As amostras do plasma foram descongeladas em banho-maria a 37°C e 50 µL das amostras do plasma ou 50 µL de uma mistura de citocinas padrão foi adicionado a uma mistura de 5 µL de cada esfera de captura (APC). Após 30 minutos, foi adicionado 50 µL do reagente de detecção anticorpo-ficoeritrina (PE). Em seguida, a mistura resultante foi incubada por 3 horas no escuro à temperatura ambiente, depois foram lavadas para remoção do reagente de detecção anticorpo-PE não ligado antes da aquisição de dados utilizando um FACS Canto-II com dois lasers.

Os dados foram adquiridos e analisados utilizando software DIVA 6.0. Tamanho (FSC) versus complexidade (SSC) foi utilizada para excluir qualquer outra partícula além das esferas de poliestireno 7,5 µm (*beads*) da amostra. Os dados foram apresentados como gráficos de pontos de duas cores (PE versus APC), de tal forma que as cinco micropartículas com emissão de fluorescência em APC foram distribuídos ao longo do eixo Y. As curvas-padrão representando a concentração de citocina versus a intensidade da fluorescência PE foram traçadas usando um modelo logístico de ajustamento de curvas. As concentrações de citocinas das amostras-teste foram determinadas a partir destas curvas-padrão.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram expressos como média $\pm$ EPM (erro padrão da média). Os valores do logaritmo (Log) negativo em cuja concentração se tem 50% do E_{max} (pD₂) para as curvas concentração-resposta foram obtidos através de regressões não-lineares, fitando o Log das concentrações versus a resposta correspondente em um modelo sigmoidal de “slope” variável utilizando o “software Graphpad Prism 6.0”. Os valores de relaxamento foram mostrados como percentagem do nível de pré-contracção. As comparações estatísticas foram realizadas usando o teste de t Student, quando comparados dois grupos, ou análise de variância ordinária, quando comparados três ou mais grupos, ambos seguidos do pós-teste de Tukey, com a significância atribuída se $P < 0,05$.

Os gráficos de histograma e dot-plot da Citometria de Fluxo para os dados de agregação foram analisados pelo “software DIVA 6.0”. Para a análise da citocinas foi usado o “software FCAP 3.0”.

REFERÊNCIAS

- AARSAETHER, E. et al. Oral beta-glucan reduces infarction size and improves regional contractile function in a porcine ischaemia/reperfusion model. **European Journal Cardiothoracic Surgery**, v. 41, n. 4, p. 919-925, 2012.
- AIMANIANDA, V. et al. Cell Wall β -(1,6)-Glucan of *Saccharomyces cerevisiae*: structural characterization and in situ synthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 20, p. 13401-13412, 2009.
- AKRAMIENE, D. et al. Effects of beta-glucans on the immune system. **Medicina-Lithuania**, v. 43, n. 8, p. 597-606, 2007.
- ALTMAN, D. G. **Practical statistics for medical research**. CRC Press, 1990.
- ALTURA, BURTON M.; ALTURA, BELLA T. Differential effects of substrate depletion on drug-induced contractions of rabbit aorta. **American Journal of Physiology--Legacy Content**, v. 219, n. 6, p. 1698-1705, 1970.
- ANDONEGUI, G. et al. Platelets express functional Toll-like receptor-4. **Blood**, v. 106, n. 7, p. 2417-2423, 2005.
- ANDREWS, R. K.; BERNDT, M. C.; LÓPEZ, J. A. The glycoprotein Ib-IX-V complex. **Platelets**, v. 2, p. 145-163, 2006.
- ANGIOLILLO, D.J.; UENO, M.; GOTO, S. Basic principles of platelet biology and clinical implications. **Circulation Journal**, v. 74, n. 4, p. 597-607, 2010.
- 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, Part A, 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, 2015.
- AULT, K. A. et al. Correlated measurement of platelet release and aggregation in whole blood. **Cytometry**, v. 10, n. 4, p. 448-55, 1989.

- BABÍČEK, K. et al. Toxicological assessment of a particulate yeast (1,3/1,6)- β -d-glucan in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 9, p. 1719-1730, 2007.
- BABINCOVA, M. et al. Antioxidant properties of carboxymethyl glucan: comparative analysis. **Journal of medicinal food**, v. 5, n. 2, p. 79-83, 2002
- BIMCZOK, D. et al. Short chain regioselectively hydrolyzed scleroglucans induce maturation of porcine dendritic cells. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 2, p. 321-331, 2009.
- BOHN, J. A.; BEMILLER, J. N. (1 $\rightarrow$ 3)- β -d-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. **Carbohydrate Polymers**, v. 28, n. 1, p. 3-14, 1995.
- BONDONNO, C. P. et al. Dietary flavonoids and nitrate: effects on nitric oxide and vascular function. **Nutrition Reviews**, v. 73, n. 4, p. 216-235, 2015.
- BORCHANI, C. et al. Physical, functional and structural characterization of the cell wall fractions from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Chemistry**, v. 194, p. 1149-1155, 2016.
- BORN, G.; PATRONO, C. Antiplatelet drugs. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, n. S1, p. S241-S251, 2006.
- BROWN, G. D. et al. Dectin-1 mediates the biological effects of β -glucans. **The Journal of experimental medicine**, v. 197, n. 9, p. 1119-1124, 2003.
- CAI, H.; HARRISON, D. G. Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases: The Role of Oxidant Stress. **Circulation Research**, v. 87, n. 10, p. 840-844, 2000.
- CATTANEO, M. et al. Recommendations for the standardization of light transmission aggregometry: a consensus of the working party from the platelet physiology subcommittee of SSC/ISTH. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 11, n. 6, p. 1183-1189, 2013.
- 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.
- CHEMA, B. et al. Structural Characterization, Technological Functionality and Physiological Aspects of Fungal beta-D-Glucans: A Review. **Critical reviews in food science and nutrition**, p. 00-00, 2015.

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, 2007.

CHEN, X.; ZHANG, L.; CHEUNG, P. C. K. Immunopotential and anti-tumor activity of carboxymethylated-sulfated β -(1 $\rightarrow$ 3)-d-glucan from *Poria cocos*. **International Immunopharmacology**, v. 10, n. 4, p. 398-405, 2010.

CHEN, Y. et al. Acetylation and carboxymethylation of the polysaccharide from *Ganoderma atrum* and their antioxidant and immunomodulating activities. **Food chemistry**, v. 156, p. 279-288, 2014.

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.

CHU, W.M. Tumor necrosis factor. **Cancer Letters**, v. 328, n. 2, p. 222-225, 2013.

CLOETENS, L. et al. Role of dietary beta-glucans in the prevention of the metabolic syndrome. **Nutrition Reviews**, v. 70, n. 8, p. 444-458, 2012.

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.

DE CATERINA, R. et al. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. **Journal of Clinical Investigation**, v. 96, n. 1, p. 60, 1995.

DE CUYPER, I. M. et al. A novel flow cytometry-based platelet aggregation assay. **Blood**, v. 121, n. 10, p. e70-80, 2013.

DERGUNOVA, M. A. et al. Characterization of the novel chemically modified fungal polysaccharides as the macrophage stimulators. **International immunopharmacology**, v. 9, n. 6, p. 729-733, 2009.

DOPHEIDE, S. M.; YAP, C. L.; JACKSON, S. P. Dynamic aspects of platelet adhesion under flow. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 28, n. 5-6, p. 355-363, 2001.

DUERSCHMIED, D.; BODE, C.; AHRENS, I. Immune functions of platelets. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 112, n. 4, p. 678-691, 2014.

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

EL KHOURY, D. et al. Beta glucan: health benefits in obesity and metabolic syndrome. **Journal of Nutrition and Metabolism**, v. 2012, p. 851362, 2012.

ENGSTAD, C. S. et al. The effect of soluble β -1, 3-glucan and lipopolysaccharide on cytokine production and coagulation activation in whole blood. **International immunopharmacology**, v. 2, n. 11, p. 1585-1597, 2002.

FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **European Heart Journal**, v. 33, n. 7, p. 829-837, 2012.

FRASNELLI, M. E. et al. TLR2 modulates inflammation in zymosan-induced arthritis in mice. **Arthritis Research and Therapy**, v. 7, n. 2, p. R370-9, 2005.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, p. 373-376, 1980.

GAFFEN, S. L.; LIU, K. D. Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. **Cytokine**, v. 28, n. 3, p. 109-123, 2004.

GRÜTZ, G. New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 77, n. 1, p. 3-15, 2005.

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.

HAGIWARA, S. et al. A phytochemical in the edible Tamogi-take mushroom (*Pleurotus cornucopiae*), D-mannitol, inhibits ACE activity and lowers the blood pressure of spontaneously hypertensive rats. . **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 69, p. 1603-1605, 2005.

HASHIMOTO, T. et al. Enhanced production of inducible nitric oxide synthase by β -glucans in mice. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 19, n. 2, p. 131-135, 1997.

- HECHLER, B.; GACHET, C. P2 receptors and platelet function. **Purinergic Signalling**, v. 7, n. 3, p. 293-303, 2011.
- HIRANO, T. et al. Biological and clinical aspects of interleukin 6. **Immunology Today**, v. 11, p. 443-449, 1990.
- HOFFMANN, E. et al. Multiple control of interleukin-8 gene expression. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 72, n. 5, p. 847-855, 2002.
- HUANG, J. et al. Cinnamaldehyde reduction of platelet aggregation and thrombosis in rodents. **Thrombosis Research**, v. 119, p. 337-342, 2007.
- 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.
- JENNINGS, L. K. Mechanisms of platelet activation: need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 102, n. 2, p. 248-257, 2009.
- JURK, K; KEHREL, B. E. Platelets: physiology and biochemistry. In: **Seminars in thrombosis and hemostasis**. New York: Stratton Intercontinental Medical Book Corporation, p. 381-392, 2005
- KAGIMURA, F. Y. et al. Biological activities of derivatized D-glucans: A review. **International journal of biological macromolecules**, v. 72, p. 588-598, 2015.
- KAZMI, R. S.; BOYCE, S.; LWALEED, B. A. Homeostasis of Hemostasis: The Role of Endothelium. **Seminars in thrombosis and hemostasis**, v. 41, n. 6, p. 549-555, 2015.
- KIM, Y. T. 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.
- 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.
- KRIZKOVÁ, L. et al. Fungal beta-(1-3)-D-glucan derivatives exhibit high antioxidative and antimutagenic activity in vitro. **Anticancer research**, v. 23, n. 3B, p. 2751-2756, 2003.

LI, B. et al. Yeast glucan particles activate murine resident macrophages to secrete proinflammatory cytokines via MyD88-and Syk kinase-dependent pathways. **Clinical Immunology**, v. 124, n. 2, p. 170-181, 2007.

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, 2004.

LJUNGMAN, A. G.; LEANDERSON, P.; TAGESSON, C. (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Glucan stimulates nitric oxide generation and cytokine mRNA expression in macrophages. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 5, n. 4, p. 273-281, 1998.

LÓPEZ FARRÉ, A.; MACAYA, C. Plaqueta: fisiología de la activación y la inhibición. **Revista Española de Cardiología Suplementos**, v. 13, S. 2, p. 2-7, 2013.

LOWE, E. P. et al. Human vascular endothelial cells express pattern recognition receptors for fungal glucans which stimulates nuclear factor (kappa) B activation and interleukin. **The American Surgeon**, v. 68, n. 6, p. 508, 2002.

MACHOVÁ, E.; BYSTRICKÝ, S. Antioxidant capacities of mannans and glucans are related to their susceptibility of free radical degradation. **International journal of biological macromolecules**, v. 61, p. 308-311, 2013.

MAGNANI, M. Effects of carboxymethyl-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* on the peripheral blood cells of patients with advanced prostate cancer. **Experimental and Therapeutic Medicine**, 2010.

MAGNANI, M. et al. 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**, v. 78, n. 4, p. 658-665, 2009.

MAGNANI, M. et al. Analysis of peripheral T cells and the CC chemokine receptor (CCR5) delta32 polymorphism in prostate cancer patients treated with carboxymethyl-glucan (CM-G). **Natural Product Research**, v. 26, n. 10, p. 945-51, 2012.

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.

- MCNICOL, A.; ISRAELS, S. J. Platelet Dense Granules: Structure, Function and Implications for Haemostasis. **Thrombosis Research**, v. 95, n. 1, p. 1-18, 1999.
- METHAROM, P. et al. Current state and novel approaches of antiplatelet therapy. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 35, n. 6, p. 1327-1338, 2015.
- MICHELSON, A. D. et al. Evaluation of platelet function by flow cytometry. **Methods**, v. 21, n. 3, p. 259-270, 2000.
- MONCADA, S.; HIGGS, E. A. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, n. S1, p. S193-S201, 2006.
- MONCADA, S.; RADOMSKI, M. W.; PALMER, R. M. Endothelium-derived relaxing factor: identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet unction. **Biochemical pharmacology**, v. 37, n. 13, p. 2495-2501, 1988.
- MORALES VIDAL, S. G.; RULAND, S. Platelet antiaggregants in stroke prevention. **Neurologic Clinics**, v. 31, n. 3, p. 633-57, 2013.
- MOROI, A. J.; WATSON, S. P. Impact of the PI3-kinase/Akt pathway on ITAM and hemITAM receptors: haemostasis, platelet activation and antithrombotic therapy. **Biochemical Pharmacology**, v. 94, n. 3, p. 186-94, 2015.
- NAMEDA, S. et al. Antibiotics Protect against Septic Shock in Mice Administered β -Glucan and Indomethacin. **Microbiology and Immunology**, v. 51, n. 9, p. 851-859, 2007.
- NICOLOSI, R. et al. Plasma lipid changes after supplementation with b-glucan fiber from yeast. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, p. 208-212, 1999.
- OHNO, N. et al. Effect of β -Glucans on the Nitric Oxide Synthesis by Peritoneal Macrophage in Mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 19, n. 4, p. 608-612, 1996.
- OOI, V. E. C.; LIU, F. Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes. **Current Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 7, p. 715-729, Jul 2000.
- PALOMO, I. F. et al. Antiagregantes plaquetarios: mecanismos de acción y riesgos asociados al uso. **Vitae (Medellín)**, v. 16, n. 1, p. 133-143, 2009.
- PIERDONÁ, T. M. **Avaliação das atividades antiagregante plaquetária e anticoagulante em estudo de bioprospecção de *Opercutina macrocarpa* (L.) Urb. (Jalapa) em plasma**

humano: determinação do mecanismo de ação. 2011. 104 f (Mestrado). Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

PIKUR, J.; LANGKJÆR, R. B. Yeast genome sequencing: the power of comparative genomics. **Molecular Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 381-389, 2004.

PLATO, A.; WILLMENT, J. A.; BROWN, G. D. C-type lectin-like receptors of the dectin-1 cluster: ligands and signaling pathways. **International Review Immunology**, v. 32, n. 2, p. 134-56, 2013.

PROJAHN, D.; KOENEN, R. R. Platelets: key players in vascular inflammation. **Journal of leukocyte biology**, v. 92, n. 6, p. 1167-1175, 2012.

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

REID, D. M.; GOW, N. A. R.; BROWN, G. D. Pattern recognition: recent insights from Dectin-1. **Current Opinion in Immunology**, v. 21, n. 1, p. 30-37, 2009.

SALUK-JUSZCZAK, J.; KROLEWSKA, K.; WACHOWICZ, B. beta-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* as a blood platelet antioxidant. **Platelets**, v. 21, n. 6, p. 451-9, 2010a.

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, 2010b.

SALUK-JUSZCZAK, J.; KROLEWSKA, K.; WACHOWICZ, B. (1 $\rightarrow$ 3)-beta-D-Glucan inhibits a dual mechanism of peroxynitrite stroke. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 48, n. 3, p. 488-94, 2011.

SAMUELSEN, A. B. C.; SCHREZENMEIR, J.; KNUTSEN, S. H. Effects of orally administered yeast-derived beta-glucans: A review. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 58, n. 1, p. 183-193, 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, 1999.

SANDVIK, A. et al. Oral and systemic administration of beta-glucan protects against lipopolysaccharide-induced shock and organ injury in rats. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 148, n. 1, p. 168-77, 2007.

SAVAGE, B.; RUGGERI, Z. M. Platelet thrombus formation in flowing blood. **Platelets**, p. 359-367, 2007.

SCENI, P. et al. Thermal and surface behavior of yeast protein fractions from *Saccharomyces cerevisiae*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, p. 1098-1106, 2009.

SCHMITT, C. A.; DIRSCH, V. M. Modulation of endothelial nitric oxide by plant-derived products. **Nitric Oxide**, v. 21, n. 2, p. 77-91, 2009.

SHARIS, P. J.; CANNON, C. P.; LOSCALZO, J. The Antiplatelet Effects of Ticlopidine and Clopidogrel. **Annals of Internal Medicine**, v. 129, n. 5, p. 394-405, 1998.

SHATTIL, S. J.; CUNNINGHAM, M.; HOXIE, J. A. Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry. **Blood**, v. 70, n. 1, p. 307-315, 1987.

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.

SLAMEŇOVÁ, D. et al. Protective effects of fungal (1→3)-β-D-glucan derivatives against oxidative DNA lesions in V79 hamster lung cells. **Cancer letters**, v. 198, n. 2, p. 153-160, 2003.

SMITH, J.; MCKEAN, M.; SILVER, M. Platelet physiology—facts and fiction. **Progress in lipid research**, v. 20, p. 425-431, 1981.

SUDANO, I. et al. Protection of Endothelial Function: Targets for Nutritional and Pharmacological Interventions. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 47, p. S136-S150, 2006.

TAO, Y.; ZHANG, L.; CHEUNG, P. C. K. Physicochemical properties and antitumor activities of water-soluble native and sulfated hyperbranched mushroom polysaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 341, n. 13, p. 2261-2269, 2006.

- THOMPSON, I.J.; OYSTON, P. C.; WILLIAMSON, D.E. Potential of the β -glucans to enhance innate resistance to biological agents. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 8, n. 3, p. 339-352, 2010.
- TSONI, S. V.; BROWN, G. D. β -Glucans and Dectin-1. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1143, n. 1, p. 45-60, 2008.
- VALLANCE, P.; CHAN, N. Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. **Heart**, v. 85, n. 3, p. 342-350, 2001.
- VARGA-SZABO, D.; PLEINES, I.; NIESWANDT, B. Cell Adhesion Mechanisms in Platelets. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 28, n. 3, p. 403-412, 2008.
- WANG, H. et al. In vivo immunological activity of carboxymethylated-sulfated (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucan from sclerotium of *Poria cocos*. **International journal of biological macromolecules**, v. 79, p.511-517, 2015.
- WANG, Q. et al. Antioxidant activity of carboxymethyl (1 $\rightarrow$ 3)- β -d-glucan (from the sclerotium of *Poria cocos*) sulfate (in vitro). **International journal of biological macromolecules**, v. 69, p. 229-235, 2014.
- WANG, Y.; YU, Y.; MAO, J. Carboxymethylated β -glucan derived from *Poria cocos* with biological activities. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 22, p. 10913-10915, 2009.
- WAUGH, D. J. J.; WILSON, C. The Interleukin-8 Pathway in Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 21, p. 6735-6741, 2008.
- WHO. **Global status report on noncommunicable diseases 2010**. Geneva, Switzerland: 2011.
- YONEDA, K. et al. Identification of the active metabolite of ticlopidine from rat in vitro metabolites. **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 3, p. 551-557, 2004.
- YUN-CHOI, H. S.; PARK, K. M.; PYO, M. K. Epinephrine induced platelet aggregation in rat platelet-rich plasma. **Thrombosis Research**, v. 100, n. 6, p. 511-518, 2000.
- ZAGO, A. S.; ZANESCO, A. Óxido nítrico, doenças cardiovasculares e exercício físico. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 87, p. e264-e270, 2006.

ZARBOCK, A.; POLANOWSKA-GRABOWSKA, R. K.; LEY, K. Platelet-neutrophil-interactions: linking hemostasis and inflammation. **Blood reviews**, v. 21, n. 2, p. 99-111, 2007.

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.

ZHANG, L. et al. Correlation between antitumor activity, molecular weight, and conformation of lentinan. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 1515-1521, 2005.

ZHOU, L.; SCHMAIER, A. H. Platelet aggregation testing in platelet-rich plasma: description of procedures with the aim to develop standards in the field. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 123, n. 2, p. 172-83, 2005.

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.

APÊNDICE

APÊNDICE**ARTIGO ORIGINAL**

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

Periódico: Journal of Ethnopharmacology

ISSN: 0378-8741

FI: 2,998

QUALIS: A2 na área de Nutrição
(ANO-BASE 2014)

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

Lorena Soares Bezerra^a, Marciane Magnani^{a,b}, Raul Jorge Hernan Castro-Gomez^c, Hassler Clementino Cavalcante^d, Tays Amanda Felisberto da Silva^e, Renata Layne Paixão Vieira^a, Isac Almeida de Medeiros^{e,f}, Robson Cavalcante Veras^{a,e} *

^a Graduate Program in Nutritional Sciences, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba (Universidade Federal da Paraíba - UFPB), Campus I, 58059-900, João Pessoa, Paraíba – Brazil

^b Department of Chemical and Food Technology, Technology Center, UFPB, Campus I, 58059-900, João Pessoa, Paraíba – Brazil

^c Department of Sciences and Technology, State University of Londrina (Universidade Estadual de Londrina - UEL), 6001, Londrina, Paraná – Brazil

^d Department of Nutrition, Health Sciences Center, UFPB, Campus I, 58059-900, João Pessoa, Paraíba – Brazil

^e Department of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences Center, UFPB, Campus I, 58059-900, João Pessoa, Paraíba – Brazil

^f Graduate Program in Natural and Synthetic Bioactive Products, Health Sciences Center, UFPB, Campus I, 58059-900, João Pessoa, Paraíba – Brazil

* Corresponding Author: Robson Cavalcante Veras
Universidade Federal da Paraíba – Campus I, 58059-900, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas
João Pessoa, Paraíba, Brazil

Tel.: +55 (83) 3216-7417 E-mail: drrobveras@gmail.com

Conflict of Interest Statement: All authors declare that this study was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance

β -D-Glucans are polysaccharides found in the cell walls of yeasts, such as *Saccharomyces cerevisiae*, and they have been studied because of their beneficial effects on health, mainly in terms of immunomodulation. However, information on the action of these polymers on vascular and platelet function is still scarce.

Objective

To evaluate the effect of (1-3) (1-6) β -D-glucan (BG-Sc) and its carboxymethylated derivative (CM-G) on vascular and platelet function in rats.

Materials and Methods

The animals received daily oral treatments with BG-Sc (20 mg/kg) and CM-G (20 mg/kg) for eight days. Next, cytokine quantification, vascular reactivity and adenosine diphosphate (ADP)- and collagen-induced platelet aggregation studies were performed. *In vitro* platelet aggregation and activation assays were conducted using 100 and 300 μ g/mL CM-G.

Results

The CM-G-treated group had less IL-8 than did the control. In reactivity experiments, CM-G and BG-Sc treatments did not change the contractile response of the vessel induced by PHE. Moreover, only CM-G improved the vasorelaxation response to Nitroprusside (SPN, an nitric oxide donor). The *in vitro* aggregation studies showed that at the highest concentration (300 μ g/mL), CM-G inhibited the agonist-induced platelet aggregation with an effect similar to that of acetylsalicylic acid and without affecting activation.

The treatments with BG-Sc or CM-G inhibited the platelet aggregation stimulated by ADP, but only BG-Sc treatment was effective in affect the collagen-stimulated aggregation.

Conclusions

These findings suggest that CM-G modulate positively the vascular function, mainly in responses NO-dependent. CM-G and BG-Sc have an anti-aggregation effect, being CM-G more selective to ADP-induced platelet aggregation.

Keywords: β -D-glucan, *Saccharomyces cerevisiae*, carboxymethylated derivative, vascular reactivity, platelet aggregation

1. INTRODUCTION

Yeast β -D-glucans are glucose homopolymers linked via β (1-3) linkages in the main chain and branches that are linked via β (1-6) linkages. The cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* is an important source of this polysaccharide (Borchani et al., 2016), which may be obtained through extraction processes, such as enzymatic treatment and treatment with bases and acids (Magnani et al., 2009). Chemical modifications of the structure are important tools for increasing the biologic activity. Therefore, carboxymethylation may be a useful strategy for the development of β -D-glucans as therapeutic agents with higher potency or efficacy compared with those of their precursors (Kagimura et al., 2014).

β -D-Glucans receive special attention because of their bioactivity, particularly in terms of immunomodulation. Several countries worldwide has approved their use for this purpose as an adjuvant in the treatment of cancer (Nameda et al., 2007). β -D-glucans are known to act on dectin-1 receptors; upon activation, these receptors initiate signaling events, thus triggering a series of cell responses, such as dendritic cell maturation, endocytosis and phagocytosis, and the production of metabolites of arachidonic acid and of several cytokines and chemokines, such as tumor necrosis factor (TNF), interleukin (IL)-2, IL-6, IL-10 and IL-23 (Tsoni and Brown, 2008). In addition to immunomodulation, other beneficial biological effects, such as antitumor activity, leucocyte activation, and antimutagenic, hypocholesterolemic, antioxidant and hypoglycemic activities, have been attributed to these polysaccharides (Akramiene et al., 2007; Brown et al., 2003; Chan et al., 2009; Cloetens et al., 2012; Krizková et al., 2003; Ooi and Liu, 2000). Although their bioactivity is well known, information on the action of these polymers on vascular and platelet function is still scarce.

Vascular damage, particularly endothelial damage, and excessive platelet aggregation are central events in the development of cardiovascular complications, which may lead to acute conditions, such as those observed during sepsis, and to chronic conditions, such as cardiovascular diseases, for example hypertension and atherosclerosis (GURBEL et al., 2004; Kim et al., 2016; Saluk-Juszczak et al., 2010). Upon rupture of the atherosclerotic plaque, the process of platelet adhesion, activation and aggregation starts, with subsequent thrombus formation and microembolization. These diseases are responsible for approximately one third of deaths worldwide (WHO, 2011). When preventive strategies fail, pharmacological intervention is required to attempt to reduce the morbidity and mortality associated with these diseases; hence, lipid-lowering, anti-hypertensive and platelet anti-aggregation agents are used. However, these compounds are expensive for those who require long-term use

(Metharom et al., 2015). Therefore, the search for compounds of natural origin that can be obtained at a lower cost, improve endothelial function and have antiplatelet action is important for controlling cardiovascular disorders (Angiolillo et al., 2010).

Considering this scenario, the objective of this study was to investigate the effect of (1-3) (1-6) β -D-glucan obtained from *S. cerevisiae* (BG-Sc) and its carboxymethylated derivative (CM-G) on the vascular and platelet function in rats, as well as to evaluate their inflammatory potential and effects on vascular reactivity and platelet aggregation and activation.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Reagents and drugs

Sodium bicarbonate (NaHCO_3), sodium chloride (NaCl), calcium chloride (CaCl_2), potassium chloride (KCl), magnesium sulfate (MgSO_4), monopotassium phosphate (KH_2PO_4), HEPES, glucose, phenylephrine hydrochloride (PEH), acetylcholine hydrochloride (ACH), sodium nitroprusside (SPN), adenosine diphosphate (ADP) and collagen were obtained from Sigma-Aldrich (São Paulo, Brazil). Xylazine and ketamine were acquired from Syntec (São Paulo, Brazil) and heparin from Blau (São Paulo, Brazil). The Cytometric Bead Array (CBA) kit and the anti-GPIIb-FITC (anti-integrin β -3-fluorescein isothiocyanate) antibody were obtained from BD Bioscience (São Paulo, Brazil), and the anti-P-selectin-PE antibody was from Santa Cruz Biotechnology (São Paulo, Brazil).

2.2. Obtaining β -D-glucans

BG-Sc and CM-G were obtained from the *S. cerevisiae* yeast cream discarded at breweries according to the procedures described by Magnani et al. (2009). The BG-Sc and CM-G used have molecular weights of 350 and 220 kDa, respectively. The substitution degree of CM-G is 0.8 (Magnani et al., 2009; Šandula et al., 1999).

2.3. Animals

All the protocols were developed using Wistar rats (*Rattus norvegicus*) obtained from the animal production unit at the Drug and Medication Research Institute (Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos - IPeFarm)/Federal University of Paraíba (Universidade

Federal da Paraíba – UFPB), Brazil. The rats weighed 250-300 g and were maintained under controlled temperature ($21\pm 1^{\circ}\text{C}$), with a light-dark cycle of 12 hours and free access to food and water. The experiments were conducted in accordance with Federal Brazilian Law no. 11794/08, which sets of procedures for the scientific use of laboratory animals, and with the opinion of the Ethics Committee on the Use of Animals of UFPB (CEUA 0511/14). The animals were divided into three groups ($n=8$): Control, Carboxymethylated (CM-G; 20 mg/kg) and β -D-glucan (BG-Sc; 20 mg/kg). The substances were diluted in water and administered once a day orally by intragastric gavage (i.g.). The control group received saline (i.g.) as a placebo. After eight days of treatment, blood samples were collected and used for cytokine quantification and platelet aggregation studies by light transmission and flow cytometry, and the thoracic aorta was used for vascular reactivity studies.

2.4. Obtaining whole blood and preparing washed platelets from rats

Blood was collected from the inferior vena cava in rats anesthetized using ketamine and xylazine (75 mg/kg; 10 mg/kg, respectively, intraperitoneally [i.p.]) with heparinized sterile syringes (3 mL). The obtained blood was divided into two samples. The first was placed in a silicone-lined plastic tube containing HEPES solution (132 mM NaCl; 6 mM KCl; 1 mM MgSO_4 ; 1.2 mM KH_2PO_4 ; 5 mM Glucose; and 20 mM HEPES, pH 7.4) with approximately twice its volume. Next, this sample was centrifuged at 2300 g for 10 minutes to obtain platelet-poor plasma (PPP). Platelet-rich plasma (PRP) was obtained from the other sample by centrifugation at 120 g for 15 minutes and adjusted to 2×10^7 platelets/mL (De Cuyper et al., 2013; Shattil et al., 1987). Plasma aliquots were frozen for subsequent cytokine quantification.

2.5. Cytokine quantification by flow cytometry

The inflammatory potential of BG-Sc and CM-G was analyzed using CBA kits according to the manufacturer's instructions. The plasma samples were thawed in a water bath at 37°C , and 50 μL of the plasma samples or 50 μL of a standard cytokine mix was added to a mix of 5 μL of each capture bead (APC). After 30 minutes, 50 μL of the antibody-phycoerythrin (PE) detection reagent was added. Next, the resulting mixture was incubated for 3 hours in the dark at room temperature and then washed for removal of the unbound antibody-PE detection reagent before data acquisition using a FACS Canto-II flow cytometer with two lasers.

Data were acquired and analyzed using the software DIVA 6.0. A size (forward scatter, FSC) *versus* complexity (SSC) comparison was used to exclude particles other than the 7.5 μ m polystyrene beads of the sample. The data were presented as dot plots with two colors (PE *versus* APC), such that the five microparticles with fluorescence emission in APC were distributed along the Y axis. The standard curves representing cytokine concentration *versus* PE fluorescence intensity were plotted using a logistic model for curve fitting. The cytokine concentrations of the test samples were determined from these standard curves.

2.6. Evaluation of the effect of the BG-SC and CM-G treatments on vascular reactivity

After blood collection, the animals were euthanized through incision in the ventral region of the animal, the thoracic aorta was identified, removed and immediately placed 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 for dissection and sectioning of the vessels into rings (1-2 mm length). Each ring was immersed in tanks (10 mL) and vertically suspended with a platinum rod, which was fixed to a force transducer (MLT020, ADInstruments, Australia). The tissues were maintained in Krebs solution at 37°C and aerated with a mixture of 95% O₂ and 5% CO₂ (carbogen; White Martins, Brazil). All the rings were subjected to a basal tension of approximately 2.0 g for a 60-minute stabilization period (FURCHGOTT and ZAWADZKI, 1980), with exchange of the nutrient solution every 15 minutes and baseline adjustment when needed (ALTURA and ALTURA, 1970).

To evaluate tissue viability and the presence of endothelium functionality after the stabilization period, a contraction was obtained using PHE (1 μ M). During the tonic phase of the contraction, ACH (1 μ M) was added to the tank to evaluate the integrity of the vascular endothelium. Rings without functional endothelium were obtained by mechanically removing the endothelial layer using the attrition caused by the friction between the rod and the inner wall of the vessel. The vascular endothelium was considered intact when the aortic rings exhibited an ACH-induced relaxation greater than 60% over the pre-contraction caused by 1 μ M PHE, and endothelium removal was confirmed when relaxation was less than 10% (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980). Next, concentration-response curves were obtained for PHE (10⁻¹⁰-10⁻⁵ M) and for ACH (10⁻¹⁰-10⁻⁵ M) and SNP (10⁻¹²-10⁻⁶ M) immediately after the contraction induced by PHE (1 μ M) reached its tonic phase.

2.7. Evaluation of platelet aggregation through light transmission

To evaluate the direct effect of CM-G on platelet activity, PRP was incubated at 37°C for 15 minutes in an aggregometer with continuous stirring at 1000 rpm in the presence of acetylsalicylic acid (ASA; 50 μ M) or CM-G at concentrations of 100 or 300 μ g/mL (Saluk-Juszczak et al., 2010). The sample was then stimulated with ADP (10 μ M) or collagen (25 μ g/mL) for 5 minutes (Gadi et al., 2009; Huang et al., 2007; YONEDA et al., 2004). Platelet aggregation was measured using an aggregometer (AgreGO, São Paulo, Brazil). Changes in light transmission were recorded, and the maximum aggregation was estimated. The percentage of platelet aggregation was expressed as the maximum light transmission obtained in the sample. The baseline aggregation values were determined using a PPP sample (YONEDA et al., 2004).

2.8 Evaluation of platelet aggregation and activation by flow cytometry

PRP was prepared in HEPES medium with 2% heparin and adjusted to 2×10^7 platelets/mL (De Cuyper et al., 2013; Shattil et al., 1987). Then, CM-G, at a concentration of 100 μ g/mL or 300 μ g/mL, and anti-GPIb-FITC (BD Pharmingen™, USA, cod. 554952) and anti-P-selectin-PE (Santa Cruz, USA, sc-8419) antibodies were added for platelet identification and to check for platelet activation with granule release, respectively, with both at a 1:100 dilution. Next, the solution was incubated for 25 minutes at 37°C under stirring and stimulated with ADP and collagen. The reaction was stopped with 2% buffered paraformaldehyde added at different times (1, 2, 5, 10 and 15 minutes) and then maintained at 4°C for 1 hour. Next, the samples were placed in a FACS Canto-II flow cytometer equipped with a 15 mW argon laser at $\lambda = 488$ nm for sample reading, and the analysis was performed using DIVA 6.0 (BD, Santa Monica, CA, USA). A total of 10,000 events were acquired, excluding debris and cell remains defined by the FSC threshold, and the fluorescence signals were captured in the following wavelength intervals: 515-545 nm for FITC and 564-606 nm for PE. The platelet aggregates were indicated by an increase in the size and expression of GPIb (Ault et al., 1989). P-selectin expression was quantified to evaluate the platelet activation pathway (Michelson et al., 2000). Changes in fluorescence (F_1) were normalized to the fluorescence obtained in the sample treated with PBS (F_0) and were expressed as $F_1 - F_0$.

2.9. Statistical analysis

All the data are expressed as the mean $\pm$ SEM (standard error of the mean). The concentration that induced 50% of the maximum effect (E_{max}) was determined from concentration-response curves through non-linear regressions. The negative logarithm (Log) of these concentrations (pD_2) versus the corresponding response was plotted for a variable slope sigmoidal model using GraphPad Prism 6.0 software.

The statistical comparisons were made using Student's *t* test for comparisons of two groups or the ordinary analysis of variance for comparisons of three or more groups, and both were followed by Tukey's post-test. *P* values <0.05 were considered significant.

The histograms and dot plots from the flow cytometry results for the aggregation data were analyzed using DIVA 6.0. For the analysis of cytokine quantification, FCAP 3.0 was used.

3. RESULTS

3.1. Effect of BG-Sc and CM-G treatments on cytokine levels

The detection limit (based on the value obtained for a zero calibrator + 3 standard-deviations (SD)) for IL-6, IL-10 and IL-8 was < 5 ng/L for the CBA.

Figure 1 shows that treatment with BG-Sc did not have a significant effect on the evaluated cytokines. However, the IL-8 levels were significantly reduced in the CM-G-treated animals (4.18 ± 0.72 pg/mL; $p < 0.05$) compared with the control (22.7 ± 6.9 pg/mL) and BG-Sc-treated animals (16.4 ± 2.4 pg/mL).

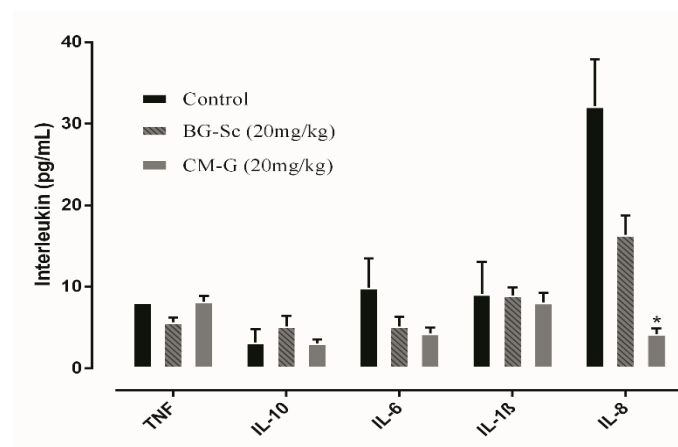


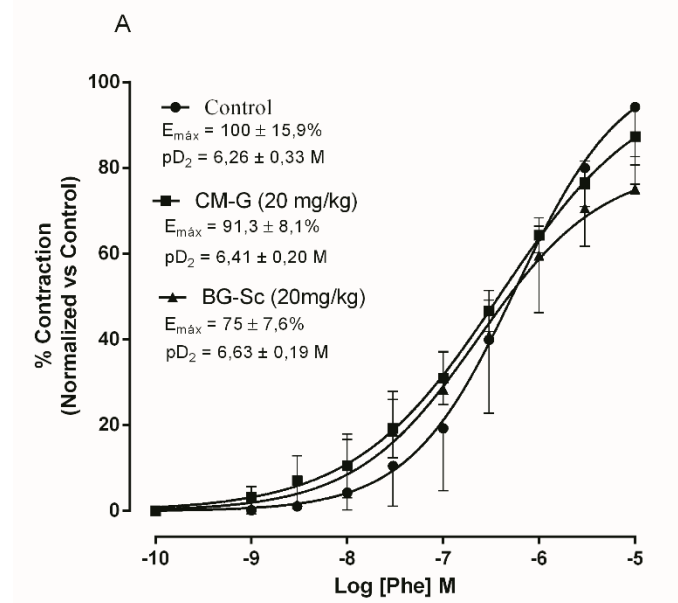
Figure 1: Cytokine levels in the blood plasma from animals treated with BG-Sc (20 mg/kg) and CM-G (20 mg/kg) for eight days. Data are expressed as the mean $\pm$ SEM ($n=8$). * $P < 0.05$ vs control

3.2. Effect of BG-Sc and CM-G treatments on vascular reactivity

The vascular reactivity evaluation was based on the maximum effect (E_{max}) and potency (pD_2) values for PHE, ACH and SNP. The results show that the BG-Sc ($E_{max}=75\pm7.6\%$; $pD_2=6.63\pm0.19$ M) and CM-G ($E_{max}=91.3\pm8.1\%$; $pD_2=6.41\pm0.20$ M) treatments did not change the contractile response of the vessel induced by PHE (10^{-10} - 10^{-5} M) compared with that of the control ($E_{max}=100\pm15.9\%$; $pD_2=6.26\pm0.33$ M) because there was no significant difference in E_{max} and pD_2 (Figure 2A).

In the aortic rings with functional endothelium that were pre-contracted with PHE, cumulative and increasing concentrations of ACH (10^{-10} - 10^{-5} M) induced a vasorelaxation response that was similar between the control ($E_{max}=100\pm7.5\%$; $pD_2=8.17\pm0.25$ M) and for the CM-G treatment ($E_{max}=86.5\pm16\%$; $pD_2=8.40\pm0.19$ M); there was no significant difference in E_{max} and pD_2 between the evaluated groups (Figure 2B). In contrast, BG-Sc ($E_{max}=90.2\pm14.1\%$; $pD_2=6.36\pm0.30$ M; $p<0.05$) reduced the potency of ACH without affecting the maximum response.

For cumulative and increasing doses of SNP (10^{-12} - 10^{-6} M), the vasorelaxation response in aortic rings without functional endothelium that were pre-contracted with PHE was similar, as indicated by the E_{max} values of the tested groups. However, treatment with CM-G ($E_{max}=93.1\pm2.7\%$; $pD_2=11.71\pm0.07$ M; $p<0.05$) increased the pD_2 of SNP compared with that of the control ($E_{max}=100\pm9.5\%$; $pD_2=11.18\pm0.27$ M). In contrast, for the BG-Sc treatment ($E_{max}=92.3\pm2.4\%$; $pD_2=10.21\pm0.10$ M; $p<0.05$), there was reduction in the potency of this nitric oxide (NO) donor without any changes in E_{max} (Figure 2C).



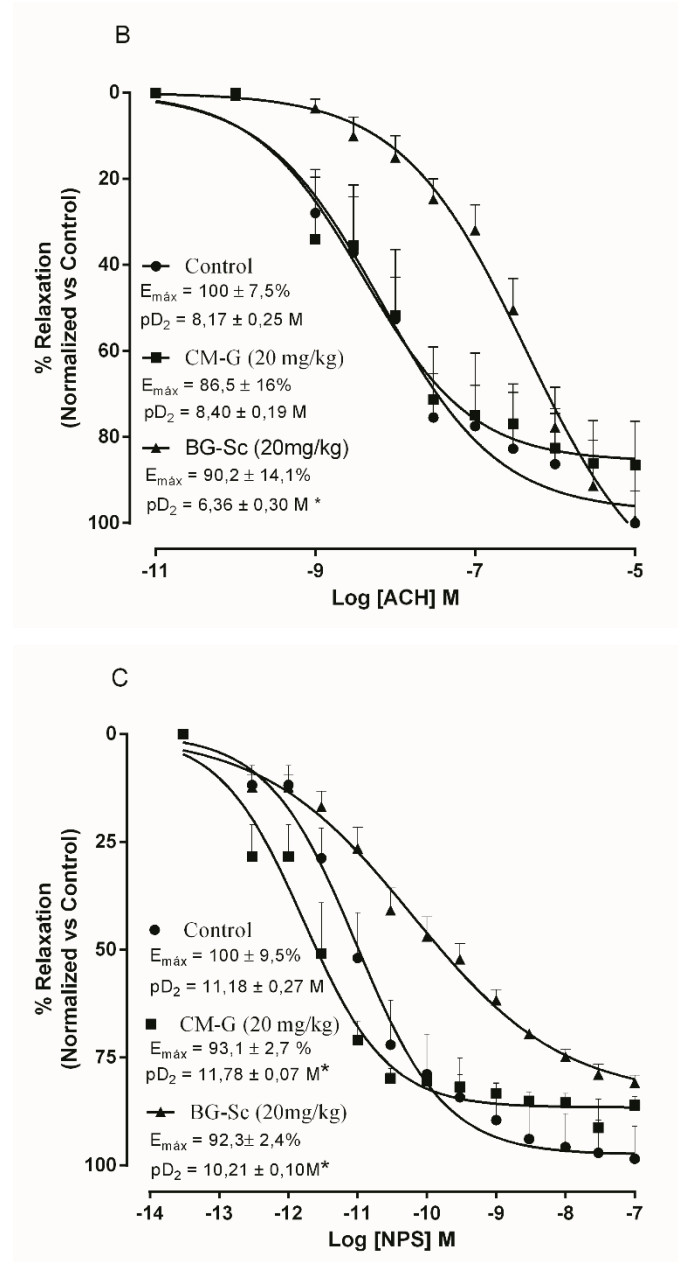


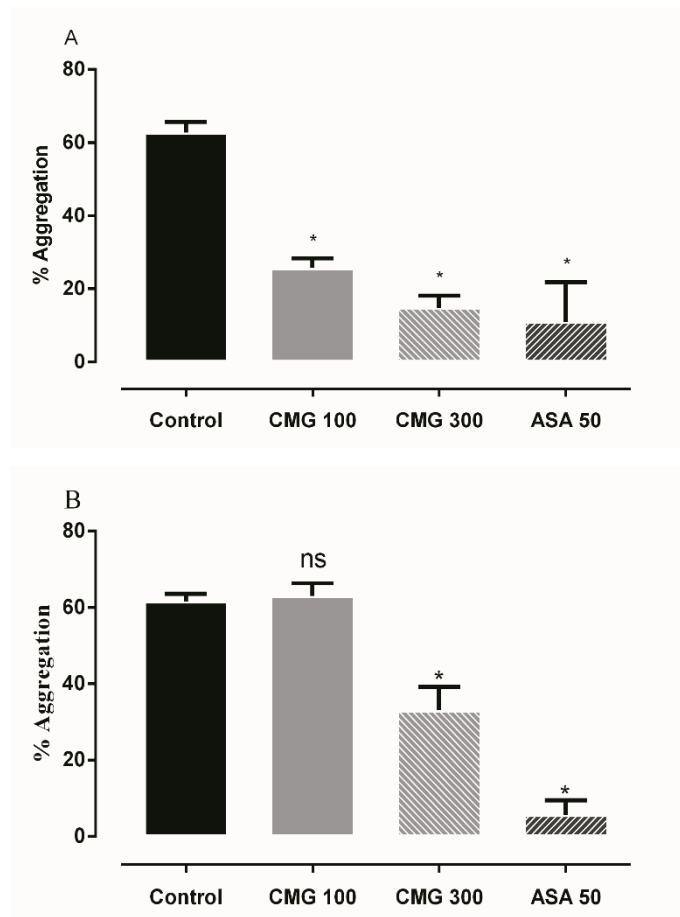
Figure 2: Concentration-response curve in aortic rings from rats treated with CM-G (20 mg/kg) and BG-Sc (20 mg/kg). a) PHE (10⁻¹⁰-10⁻⁵ M); b) ACH (10⁻¹⁰-10⁻⁵ M); c) SNP (10⁻¹²-10⁻⁶ M). Data are expressed as the mean ± SEM (n=8). *P<0.05 vs control

3.3.Effect of CM-G on platelet aggregation and activation

Figure 3A shows that CM-G, at concentrations of 100 µg/mL and 300 µg/mL, was capable of inhibiting ADP-induced platelet aggregation (10 µM) (25.7±2.7% and 14.8±3.2%, respectively; p <0.05) compared with that of the control (62.7±2.9%) and of ASA (11±6.2%; p<0.05). However, there were no significant differences between the tested concentrations or between CM-G and ASA. When aggregation was stimulated by collagen (25 µg/mL), only the

300 µg/mL concentrations of CM-G ($33\pm6.2\%$; $p<0.05$) and ASA ($5.7\pm 2.1\%$; $p<0.05$) showed an inhibitory effect (Figure 3B).

When aggregation and activation were assessed by flow cytometry, CM-G also prevented ADP-induced platelet aggregation (Figure 3C) at the two concentrations tested (100 µg/mL: $54.8\pm6.1\%$; 300 µg/mL: $54.3\pm5.9\%$; $p<0.05$) relative to the aggregation of the control ($100.0\pm18.9\%$), but it did not affect the platelet activation (100 µg/mL= $75.9\pm1.2\%$; 300 µg/mL= $95.2\pm13.6\%$, $p>0.05$) compared with that of the control ($100.0\pm8.5\%$). For collagen-induced aggregation (Figure 3D), the 300 µg/mL concentration only reduced aggregation ($47.2\pm8.5\%$; $p<0.05$) relative to that of the control ($100.0\pm24.9\%$) without interfering in platelet activation (control: $100.0\pm11.7\%$; CM-G 300 µg/mL: $61.1\pm20.7\%$). The 100 µg/mL concentration was incapable of inhibiting platelet aggregation ($93.0\pm23.4\%$) or activation ($78.0\pm4.1\%$).



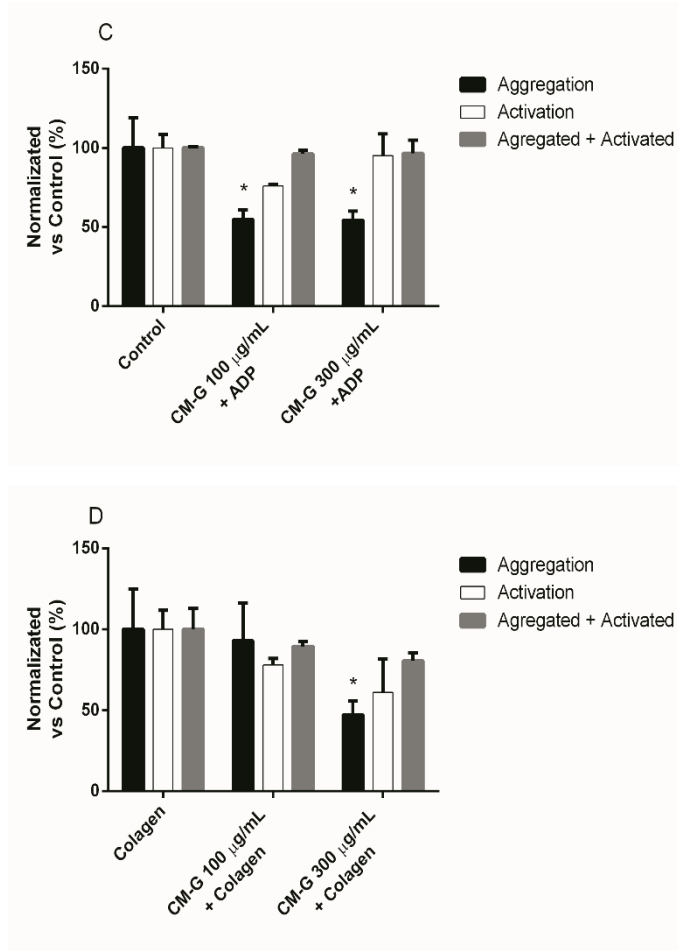


Figure 3: *In vitro* effect of different concentrations of CM-G (100 and 300 µg/mL) and ASA (50 µM) on the platelet aggregation and activation induced by: a) 10 µM ADP; b) 25 µg/mL Collagen; c) 200 µM ADP e d) 10 µg/mL Collagen. Data are expressed as the mean $\pm$ SEM (n=8). *P<0.05 vs control

3.4. Effect of BG-Sc and CM-G treatments on platelet aggregation

The effect of BG-Sc and CM-G on platelet aggregation was also evaluated in treated rats. Oral administration (20 mg/kg) for eight days inhibited ADP-induced platelet aggregation (Figure 4A) both in rats that received CM-G ($45 \pm 3.9\%$; $p < 0.05$) and in those treated with BG-Sc ($45 \pm 6\%$; $p < 0.05$) compared with the control ($62.7 \pm 2.9\%$). However, for collagen-stimulated platelet aggregation (Figure 4B), inhibition was only observed in the animals treated with BG-Sc ($22.6 \pm 7.7\%$; $p < 0.05$) compared with the control ($61.3 \pm 2.4\%$).

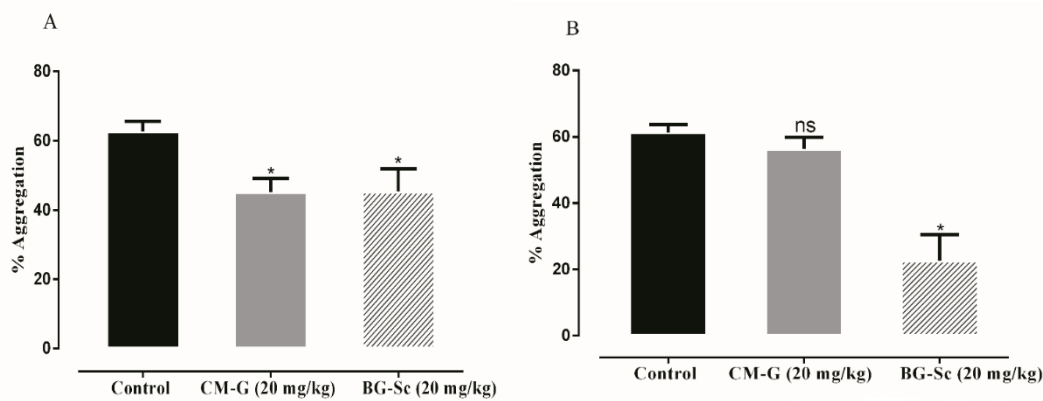


Figure 4: Effect of the oral administration of CM-G (20 mg/kg) and BG-Sc (20 mg/kg) for eight days on the platelet aggregation induced by: a) 10 μ M ADP b) 25 μ g/mL Collagen. Data are expressed as the mean $\pm$ SEM (n=8). *P<0.05 vs control

4. DISCUSSION

The results of this study provide pharmacological evidence supporting the hypothesis that CM-G and BG-Sc exert a modulatory effect on endothelial function and an anti-aggregation effect in rats. The main findings were as follows: CM-G potentiated the vascular response to a NO donor (e.g., SNP), whereas BG-Sc worsened it and inhibited the action of ACH; CM-G inhibited the ADP- and collagen-induced platelet aggregation, without affecting platelet activation and with an effect similar to that of ASA; the oral administration of BG-Sc and CM-G inhibited ADP-induced platelet aggregation, but only BG-Sc reduced the collagen-induced aggregation; and CM-G showed higher selectivity for ADP.

The CM-G used in this study was described as having a molecular weight of approximately 220 kDa and a substitution degree of 0.8 (Magnani et al., 2009), and BG-Sc had a molecular weight of 350 kDa (Šandula et al., 1999). The use of these two forms of β -D-glucan increase the relevance because these polysaccharides are more effective biologically at molecular weights greater than 200 kDa. Moreover, the substitution degree of CM-G ensures good solubility in water (Chema et al., 2015; Kim et al., 2000).

Prior studies showed that some β -D-glucans are implicated in the development of inflammation (Engstad et al., 2002; Frasnelli et al., 2005; Li et al., 2007). For example, zymosan, which is commonly used to induce inflammation in animal models through parenteral administration and in *in vitro* studies of innate immune response, is capable of

stimulating the production of inflammatory cytokines, such as IL-2, IL-6, IL-18 and interferon- γ (IFN- γ) (Frasnelli et al., 2005). In this study, the inflammation potential of BG-Sc and CM-G was evaluated. BG-Sc was incapable of changing the plasma levels of the measured cytokines, whereas CM-G reduced the IL-8 levels. This cytokine is considered a chemokine and is involved in neutrophil degranulation and chemotaxis, thus having pro-inflammatory action. IL-8 activates multiple intracellular signaling pathways, and its increased expression has been reported in cancer cells, neutrophil infiltrates and tumor-associated macrophages (Hoffmann et al., 2002). In endothelial cells, NO seems to act as an inhibitor of IL-8 and adhesion molecules involved in inflammation processes (De Catarine et al., 1988).

After demonstrating that the tested β -D-glucans did not induce pro-inflammatory responses, at least through significant changes in the concentration of pro-inflammatory cytokines, we sought to evaluate their effect on vascular function. Possible actions include mimicking an adrenergic action, through alpha-adrenergic receptor activation; a cholinergic action, through muscarinic receptor activation; and NO production, due to NO donation. The results indicate that treatment with both β -D-glucans did not interfere with the response induced by alpha-adrenergic agonists, such as PHE. However, for the vasodilating agents, the relaxation induced by SNP which is mediated by NO was potentiated in animals treated with CM-G for eight days. In contrast, BG-Sc inhibited the vascular response, both the vessel relaxation produced by ACH and that induced by SNP: CM-G treatment reduced the vasodilation potency of these compounds. This finding demonstrates that the use of BG-Sc may result in a reduction in the vasodilation response that is not mediated by NO and that CM-G has a beneficial effect on the cardiovascular system, in addition to its immunomodulating activity. The literature clearly indicates that NO, when available, diffuses across the endothelial cell membrane and enters vascular smooth muscle cells, where it activates guanylate cyclase (GC), causing an increase in the intracellular concentration of cyclic guanosine 3,5-monophosphate (cGMP), which results in PKG activation and induces phosphorylation of several target proteins and, consequently, induces vasodilation (Bondonno et al., 2015). This finding corroborates *in vitro* studies associating β -D-glucans, either linear or branched, of fungal and bacterial origin with increased NO production (Hashimoto et al., 1997; Ljungman et al., 1998; Ohno et al., 1996).

Lowe et al. (2002) observed that linear β -D-glucans are capable of modulating human vascular endothelial cells by stimulating the activation of the nuclear factor kappa B (NF κ B)-dependent signaling pathway. These authors also observed the presence of standard

recognition receptors for these polymers in endothelial cells, suggesting that the response to glucans may not be restricted to cells of the immune system, such as leukocytes. Nonetheless, this study is the first to show that branched β -D-glucans can modulate the vascular response. It is important to keep in mind that blood vessels are not the only factors that influence the health of the cardiovascular system. It is clear that the use of natural compounds that increase the sensitivity of the vasculature to NO, either endogenous or exogenous, are of great value, but maintaining adequate hemostasis and reducing the possibility of platelet aggregate formation also seems to be a good strategy for avoiding strokes and thrombi (Amrani et al., 2009).

When a vessel is damaged, platelets become active and interact with the exposed subendothelial tissue, thus forming a hemostatic tamponade. However, platelets are also responsible for the formation of pathogenic thrombi, thus triggering atherothrombotic disease, which may ultimately cause acute myocardial infarction, stroke or peripheral artery disease (Moroi and Watson, 2015).

A prior study described the anti-aggregation activity of β -glucans but only for the linear form (β 1-3) of D-glucan extracted from *S. cerevisiae*. Saluk-Juszczak et al. (2010) showed that different concentrations of β (1-3)-D-glucan inhibited ADP-, collagen- and thrombin-induced aggregation and platelet secretion *in vitro* in a dose-dependent manner. The authors attributed that effect to the inhibition of the arachidonic acid pathway. This study is the first to demonstrate the anti-aggregation action of the branched form and of the carboxymethylated form of β -D-glucan originating from *S. cerevisiae*. Some studies reported that the arrangement of the branches in this polysaccharide has a greater influence on the recognition by specific receptors and that carboxymethylation possibly increases the contact between the modified polymer and the receptor through hydrogen bonds and electrostatic attractions, improving the biological response (Aimanianda et al., 2009; El Enshasy and Hatti-Kaul, 2013).

In this study, CM-G at different concentrations inhibited ADP-induced platelet aggregation *in vitro*, with an effect similar to that of ASA, which is considered a classic antiplatelet agent. This result was demonstrated using light transmission aggregometry and flow cytometry. However, CM-G did not interfere in platelet activation, i.e., it did not alter the exposure of their granules, indicating that this polymer possibly acts by inhibiting only aggregation and that it does not interfere in the transport of cytoplasmic vesicles to the cell membrane or even in the molecular mechanisms that mediate this response.

ADP is an agonist that amplifies initial platelet activation through purinergic P2Y receptors coupled to protein Gq/11. The P2Y₁ receptor contributes to the initiation of platelet aggregation induced by ADP through the activation of phospholipase C (PLC), causing a change in platelet shape and aggregation through calcium mobilization. In contrast, the P2Y₁₂ receptor, which interacts with the protein G_{0/i}, is thought to have greater relevance for the full aggregation of platelets because it acts by stabilizing the platelet aggregates through inhibition of adenylyl cyclase, thus decreasing the formation of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and, consequently, platelet activation (Hechler and Gachet, 2011; López Farré and Macaya, 2013; Zhou and Schmaier, 2005).

Collagen is responsible for the initiation of platelet adhesion and subsequent activation in the extracellular matrix of the denuded endothelium through receptors on the surface of the platelets, such as GPIa/IIa (integrin $\alpha 2\beta 1$), which contributes to adhesion, and the GP VI receptor, which is responsible for platelet activation and signaling leading to the production of thromboxane A₂ (TXA₂) (Savage and Ruggeri, 2007; Zhou and Schmaier, 2005). In the *in vitro* assays, CM-G, at the highest concentration, inhibited the aggregation stimulated by collagen, as indicated by the two techniques employed to assess aggregation, without affecting platelet activation. This effect may be due to the inhibition of platelet receptors for collagen. However, the *in vitro* studies show that CM-G is more effective when platelet aggregation is induced by ADP, thus showing higher selectivity for this agonist. Therefore, the hypothesis of purinergic receptor blockade cannot be discarded and raises the need for additional studies to demonstrate this potential affinity.

In this study, two different techniques were used to evaluate platelet aggregation and thus compare the sensitivity and accuracy of the effect. Although it is considered the gold standard for evaluating platelet function, light transmission aggregometry presents some disadvantages, such as the need to prepare PRP, which uses large volumes of sample. Moreover, it has the limitation of not identifying changes in platelet shape or the occurrence of secondary platelet aggregation or a disaggregation wave (Cattaneo et al., 2013). Flow cytometry, in contrast, enables the detection of platelet aggregates from small volumes of blood and with a low platelet number, as well as the identification of activated platelets and the elucidation of platelet receptor function upon combination with agonists and antagonists (De Cuyper et al., 2013).

The oral administration of BG-Sc at a dose of 20 mg/kg was capable of inhibiting the platelet aggregation induced by either ADP or collagen. CM-G did not prevent collagen-induced platelet aggregation, but it was effective at reducing ADP-stimulated aggregation. The main

finding regarding this treatment is that the results corroborate the selectivity of CM-G for ADP that has been observed in *in vitro* studies. Therefore, CM-G would affect the initial phase of platelet activation and not the adhesion phase. In humans, the oral administration of CM-G improved hematopoiesis and showed immunomodulating action, with an increase in blood cells, hematocrit, hemoglobin, platelets and leukocytes (Magnani, 2010).

5. CONCLUSION

The findings of this study suggest that BG-Sc and CM-G have the ability to modulate vascular function and show significant anti-aggregation activity, with an effect similar to that of ASA and without influencing platelet activation. Therefore, these polysaccharides are a potential adjuvant agent in the treatment of cardiovascular diseases. However, further studies are needed to elucidate the mechanism of action of these polymers.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Brazilian Federal Agency for the Support and Evaluation of Graduate Education (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior - CAPES), the National Council for Scientific and Technologic Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq) and the Paraíba Development Institute (Instituto de Desenvolvimento da Paraíba - IDEP-PB) for the financial, technical and infrastructure support needed to conduct this study.

REFERENCES

- Aimanianda, V., Clavaud, C., Simenel, C., Fontaine, T., Delepierre, M., Latgé, J.-P., 2009. Cell Wall β -(1,6)-Glucan of *Saccharomyces cerevisiae*: structural characterization and in situ synthesis. *Journal of Biological Chemistry* 284(20), 13401-13412.
- Akramiene, D., Kondrotas, A., Didziapetriene, J., Kevelaitis, E., 2007. Effects of beta-glucans on the immune system. *Medicina-Lithuania* 43(8), 597-606.
- ALTURA, B.M., ALTURA, B.T., 1970. Differential effects of substrate depletion on drug-induced contractions of rabbit aorta. *Am. J. Physiol.* 219, 1698-1705.
- Amrani, S., Harnafi, H., Gadi, D., Mekhfi, H., Legssyer, A., Aziz, M., Martin-Nizard, F., Bosca, L., 2009. Vasorelaxant and anti-platelet aggregation effects of aqueous *Ocimum basilicum* extract. *Journal of Ethnopharmacology* 125(1), 157-162.
- Angiolillo, D.J., Ueno, M., Goto, S., 2010. Basic principles of platelet biology and clinical implications. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* 74(4), 597-607.
- Ault, K.A., Rinder, H.M., Mitchell, J.G., Rinder, C.S., Lambrew, C.T., Hillman, R.S., 1989. Correlated measurement of platelet release and aggregation in whole blood. *Cytometry* 10(4), 448-455.
- Bondonno, C.P., Croft, K.D., Ward, N., Considine, M.J., Hodgson, J.M., 2015. Dietary flavonoids and nitrate: effects on nitric oxide and vascular function. *Nutrition Reviews* 73(4), 216-235.
- Borchani, C., Fonteyn, F., Jamin, G., Paquot, M., Thonart, P., Blecker, C., 2016. Physical, functional and structural characterization of the cell wall fractions from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chemistry* 194, 1149-1155.
- Brown, G.D., Herre, J., Williams, D.L., Willment, J.A., Marshall, A.S., Gordon, S., 2003. Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J Exp Med* 197(9), 1119-1124.
- Cattaneo, M., Cerletti, C., Harrison, P., Hayward, C., Kenny, D., Nugent, D., Nurden, P., Rao, A.K., Schmaier, A., Watson, S., 2013. Recommendations for the standardization of light transmission aggregometry: a consensus of the working party from the platelet physiology subcommittee of SSC/ISTH. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 11(6), 1183-1189.
- Chan, G.C.-F., Chan, W.K., Sze, D.M.-Y., 2009. The effects of beta-glucan on human immune and cancer cells. *Journal of Hematology & Oncology* 2.
- Chema, B., Fabienne, F., Guilhem, J., Jacqueline, D., Luc, W., Michel, P., Christophe, B., Philippe, T., 2015. Structural Characterization, Technological Functionality and Physiological Aspects of Fungal beta-D-Glucans: A Review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 0.
- Cloetens, L., Ulmius, M., Johansson-Persson, A., Åkesson, B., Önning, G., 2012. Role of dietary beta-glucans in the prevention of the metabolic syndrome. *Nutrition Reviews* 70(8), 444-458.
- De Catarine, R., Giannessi, D., Mazzone, A., Bernini, W., 1988. Mechanisms for the in vivo antiplatelet effects of isosorbide dinitrate. *Eur. Heart. J.* 9A, 45-49.
- De Cuyper, I.M., Meinders, M., van de Vijver, E., de Korte, D., Porcelijn, L., de Haas, M., Eble, J.A., Seeger, K., Rutella, S., Pagliara, D., Kuijpers, T.W., Verhoeven, A.J., van den Berg, T.K., Gutierrez, L., 2013. A novel flow cytometry-based platelet aggregation assay. *Blood* 121(10), e70-80.
- El Enshasy, H.A., Hatti-Kaul, R., 2013. Mushroom immunomodulators: unique molecules with unlimited applications. *Trends in biotechnology* 31(12), 668-677.
- Engstad, C.S., Engstad, R.E., Olsen, J.-O., Østerud, B., 2002. The effect of soluble β -1, 3-glucan and lipopolysaccharide on cytokine production and coagulation activation in whole blood. *International immunopharmacology* 2(11), 1585-1597.
- Frasnelli, M.E., Tarussio, D., Chobaz-Péclat, V., Busso, N., So, A., 2005. TLR2 modulates inflammation in zymosan-induced arthritis in mice. *Arthritis Res Ther* 7(2), R370-379.
- FURCHGOTT, R.F., ZAWADZKI, J.V., 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373-376.

- Gadi, D., Bnouham, M., Aziz, M., Ziyat, A., Legssyer, A., Legrand, C., Lafève, F.F., Mekhfi, H., 2009. Parsley extract inhibits in vitro and ex vivo platelet aggregation and prolongs bleeding time in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 125(1), 170-174.
- GURBEL, P.A., BLIDEN, K.P., HAYES, K.M., TANTRY, U., 2004. Platelet activation in myocardial ischemic syndromes. *Expert Review of Cardiovascular Therapy* 2(4), 535-545.
- Hashimoto, T., Ohno, N., Adachi, Y., Yadomae, T., 1997. Enhanced production of inducible nitric oxide synthase by β -glucans in mice. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 19(2), 131-135.
- Hechler, B., Gachet, C., 2011. P2 receptors and platelet function. *Purinergic Signalling* 7(3), 293-303.
- Hoffmann, E., Dittrich-Breiholz, O., Holtmann, H., Kracht, M., 2002. Multiple control of interleukin-8 gene expression. *Journal of Leukocyte Biology* 72(5), 847-855.
- Huang, J., Wang, S., Xiaoxing, L., Yanhua, X., Xinyou, S., 2007. Cinnamaldehyde reduction of platelet aggregation and thrombosis in rodents. *Thromb.Res.* 119, 337-342.
- Kagimura, F.Y., da Cunha, M.A., Barbosa, A.M., Dekker, R.F., Malfatti, C.R., 2014. Biological activities of derivatized d-glucans: A review. *Int J Biol Macromol* 72c, 588-598.
- Kim, T.H., Lee, K.M., Hong, N.D., Jung, Y.S., 2016. Anti-platelet and anti-thrombotic effect of a traditional herbal medicine Kyung-Ok-Ko. *J Ethnopharmacol* 178, 172-179.
- Kim, Y.-T., Kim, E.-H., Cheong, C., Williams, D.L., Kim, C.-W., Lim, S.-T., 2000. Structural characterization of β -D-(1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 6)-linked glucans using NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research* 328(3), 331-341.
- Krizková, L., Duracková, Z., Sandula, J., Slamenová, D., Sasinková, V., Sivonová, M., Krajčovic, J., 2003. Fungal beta-(1-3)-D-glucan derivatives exhibit high antioxidative and antimutagenic activity in vitro. *Anticancer research* 23(3B), 2751-2756.
- Li, B., Cramer, D., Wagner, S., Hansen, R., King, C., Kakar, S., Ding, C., Yan, J., 2007. Yeast glucan particles activate murine resident macrophages to secrete proinflammatory cytokines via MyD88- and Syk kinase-dependent pathways. *Clinical immunology* 124(2), 170-181.
- Ljungman, A.G., Leanderson, P., Tagesson, C., 1998. (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Glucan stimulates nitric oxide generation and cytokine mRNA expression in macrophages. *Environmental toxicology and pharmacology* 5(4), 273-281.
- López Farré, A., Macaya, C., 2013. Plaqueta: fisiología de la activación y la inhibición. *Revista Española de Cardiología Suplementos* 13, Supplement 2, 2-7.
- Lowe, E.P., Wei, D., Rice, P.J., Li, C., 2002. Human vascular endothelial cells express pattern recognition receptors for fungal glucans which stimulates nuclear factor (κ) B activation and interleukin. *The American Surgeon* 68(6), 508.
- Magnani, M., 2010. Effects of carboxymethyl-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* on the peripheral blood cells of patients with advanced prostate cancer. *Experimental and Therapeutic Medicine*.
- Magnani, M., Calliari, C.M., de Macedo Jr, F.C., Mori, M.P., de Syllos Cólus, I.M., Castro-Gomez, R.J.H., 2009. 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), 658-665.
- Metharom, P., Berndt, M.C., Baker, R.I., Andrews, R.K., 2015. Current state and novel approaches of antiplatelet therapy. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 35(6), 1327-1338.
- Michelson, A.D., Barnard, M.R., Krueger, L.A., Frelinger, A.L., 3rd, Furman, M.I., 2000. Evaluation of platelet function by flow cytometry. *Methods (San Diego, Calif.)* 21(3), 259-270.
- Moroi, A.J., Watson, S.P., 2015. Impact of the PI3-kinase/Akt pathway on ITAM and hemITAM receptors: haemostasis, platelet activation and antithrombotic therapy. *Biochemical pharmacology* 94(3), 186-194.
- Nameda, S., Miura, N.N., Adachi, Y., Ohno, N., 2007. Antibiotics Protect against Septic Shock in Mice Administered β -Glucan and Indomethacin. *Microbiology and Immunology* 51(9), 851-859.
- Ohno, N., Egawa, Y., Hashimoto, T., Adachi, Y., Yadomae, T., 1996. Effect of β -Glucans on the Nitric Oxide Synthesis by Peritoneal Macrophage in Mice. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 19(4), 608-612.
- Ooi, V.E.C., Liu, F., 2000. Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes. *Current Medicinal Chemistry* 7(7), 715-729.

- Saluk-Juszczak, J., Krolewska, K., Wachowicz, B., 2010. Response of blood platelets to beta-glucan from *Saccharomyces cerevisiae*. *Platelets* 21(1), 37-43.
- Šandula, J., Kogan, G., Kačuráková, M., Machová, E., 1999. Microbial (1→ 3)- β -D-glucans, their preparation, physico-chemical characterization and immunomodulatory activity. *Carbohydrate polymers* 38(3), 247-253.
- Savage, B., Ruggeri, Z.M., 2007. Chapter 18 - Platelet thrombus formation in flowing blood, in: Michelson, A.D. (Ed.) *Platelets* (Second Edition). Academic Press, Burlington, pp. 359-376.
- Shattil, S.J., Cunningham, M., Hoxie, J.A., 1987. Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry. *Blood* 70(1), 307-315.
- Tsoni, S.V., Brown, G.D., 2008. beta-Glucans and dectin-1. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1143, 45-60.
- WHO, 2011. Global status report on noncommunicable diseases 2010, Geneva, Switzerland.
- YONEDA, K., IWAMURA, R., KISHI, H., MIZUKAMI, Y., MOGAMI, K., KOBAYASHI, S., 2004. Identification of the active metabolite of ticlopidine from rat in vitro metabolites. *British Journal of Pharmacology* 142(3), 551-557.
- Zhou, L., Schmaier, A.H., 2005. Platelet aggregation testing in platelet-rich plasma: description of procedures with the aim to develop standards in the field. *American journal of clinical pathology* 123(2), 172-183.

ANEXOS

Anexo 1 – Certidão emitida pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFPB



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS****CERTIDÃO**

João Pessoa, 12 de dezembro de 2014

CEUA Nº 0511/14

Ilmo(a). **Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros**

Departamento Ciências Farmacêuticas - CCS - UFPB

Orientando(a): **Lorena Soares Bezerra, (Mestrado)**

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba em sua reunião ordinária de **11/12/2014** analisou e **APROVOU** a execução do projeto **ESTUDO PRÉ-CLÍNICO DA AÇÃO DE β -D-GLUCANAS SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR E ATIVIDADE AGREGANTE DE PLAQUETAS.**

Com previsão de empregar **64 Ratos WISTAR - ANIMAIS DO BIOTÉRIO Prof. Thomas George.**

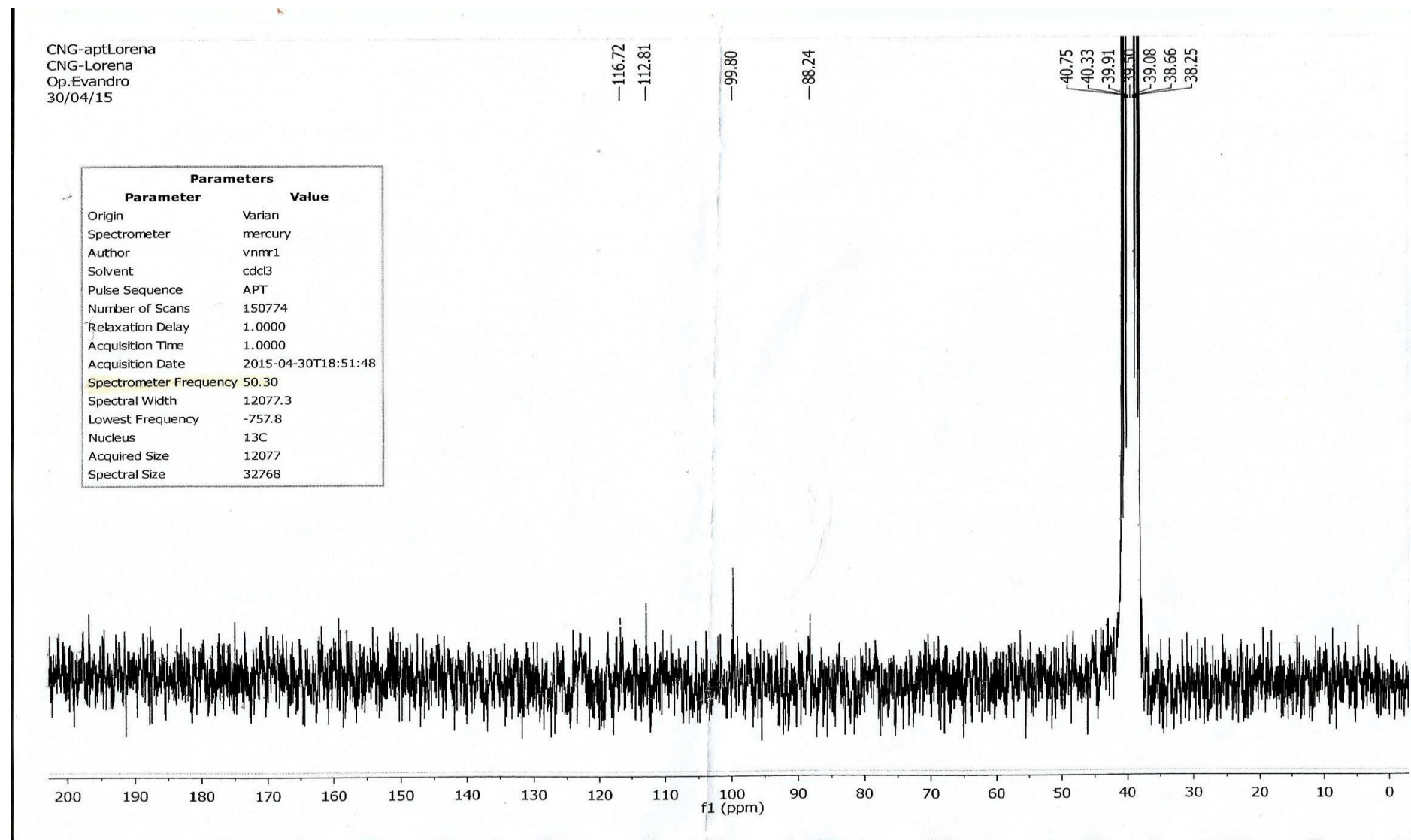
Para serem utilizados no período de **10/06/2014 a 01/03/2016**

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luis Cezar Rodrigues
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animal do CBiotec/UFPB

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA – CBiotec
Centro de Biotecnologia – Universidade Federal da Paraíba
<https://sites.google.com/site/ceuaacbiotec/> – ceua@cbiotec.ufpb.br

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



Anexo 3 – Espectroscopia por infravermelho da CM-G

