

# Ação da glucana *in vivo* sobre a atividade de células inflamatórias peritoniais de camundongos balb/c

**Renata Maria Rocha Ribeiro**  
Graduada em Ciências Biológicas – UNINOVE.  
reibu@ig.com.br, São Paulo [Brasil]

**Tânia Aguiar Passeti**  
Doutora em Ciências – USP;  
Professora na graduação – UNIBAN.  
taniapa@directnet.com.br, São Paulo [Brasil]

**Terezinha Regina Prúpere Ogata**  
Doutora em Patologia Experimental e Comparada – USP;  
Pesquisadora científica – Laboratório de Imunogenética, Instituto Butantan.  
staogata@uol.com.br, São Paulo [Brasil]

O conceito de inflamação como fenômeno localizado para neutralizar o agente agressor tem adquirido sentido mais amplo. Nesse contexto, ressalte-se o papel fundamental das células macrofágicas, por sua alta capacidade fagocítica e de destruição do agente fagocitado. Devido à importância do macrófago no desenrolar do processo inflamatório, muitos estimulantes têm sido propostos para aumentar sua ativação, independentemente do sistema linfocitário. A glucana, polissacarídeo derivado de fragmentos de parede de *Saccharomyces cerevisiae*, é um desses compostos e tem-se mostrado eficiente em experimentos *in vivo*. Neste trabalho, avaliamos a influência dessa molécula sobre células inflamatórias na cavidade peritoneal. Os resultados obtidos mostraram que a glucana aumentou a capacidade de espreadimento e fagocitose dessas células ante a *Klebsiella pneumoniae*, em relação ao seu controle. Não foi observado um aumento significativo do número de células na cavidade peritoneal comparativamente às células não tratadas. Os resultados demonstram que a glucana é capaz de ativar as células inflamatórias na cavidade peritoneal e, com isso, facilitar a destruição de qualquer agente que nela penetre.

**Palavras-chave:** Células inflamatórias. Fagocitose. Glucana. Macrófago.

## 1 Introdução

O conceito de inflamação como um fenômeno localizado e com a finalidade de neutralizar o agressor tem adquirido um sentido mais amplo. Trata-se de um evento complexo de interações entre o tecido conjuntivo e os sistemas sanguíneo e nervoso que visam à restauração da homeostase.

As alterações vasculares que dão início à resposta inflamatória permitem a migração das células inflamatórias para o tecido lesado, no qual, por meio das substâncias reativas que o próprio tecido libera, destroem e degradam o agente agressor. Entre esses agentes, o macrófago, após ativação, tem por função principal destruir e fagocitar as partículas agressoras. A ativação do macrófago está relacionada com sua capacidade inespecífica de resistência às infecções, uma vez que nesse estado ele possui maior capacidade de destruição (SELJELID; BUSUND, 1994).

A ativação macrofágica resulta em um aumento no tamanho da célula, elevação dos níveis de enzimas lisossomais, ativação metabólica, maior capacidade para fagocitar e destruir microorganismos ingeridos, além da secreção de uma variedade de produtos biologicamente ativos, que são importantes mediadores da destruição tecidual, da proliferação vascular e da fibrose, características da inflamação crônica (BIER, 1984).

Como esse estado ativo pode ser mediado tanto por moléculas liberadas pelo próprio macrófago quanto por outras células envolvidas no processo, tais como linfócitos e fibroblastos, qualquer substância com propriedades estimulantes inespecíficas sobre o Sistema Fagocitário Mononuclear (SFM) poderia influenciar a ativação macrofágica (CRAWFORD et al., 1994).

A glucana, polissacarídeo derivado de fragmentos da parede de *Saccharomyces cerevisiae*, é um desses agentes. Ela é capaz de induzir a hiperfuncionabilidade do SFM pelo aumento da função fagocítica, imunidade celular e humoral, produção de citocinas e fatores citotóxicos do macrófago. A glucana é um agente não imunogênico capaz de influenciar o sistema imunológico do hospedeiro, regulando o número de funções celulares por meio de interações entre o macrófago, células T e B, granulócitos, células *natural-killer* (NK) e fatores humorais. Esse polissacarídeo é capaz de modificar a resposta a infecções em animais normais ou imunossuprimidos bem como controlar o crescimento de tumores (BROWDER; MCNAMEE; DI LUZIO, 1977; COOK et al., 1997; DI LUZIO, MCNAMEE; WILLIAMS, 1980; HARIMA, 1990;).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da glucana sobre a atividade de macrófagos peritoniais e sua capacidade fagocítica na evolução da infecção causada pela bactéria *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) em camundongos.

## 2 Material e método

- **Glucana:** foi preparada pelo Departamento de Microbiologia, Imunobiologia e Parasitologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), a partir do fungo *Saccharomyces cerevisiae* contido no fermento biológico, segundo Hassid, Hoslyn e McCready (1941).
- **Animais:** foram utilizados camundongos isogênicos balb/c machos de quatro a oito semanas de idade, fornecidos pelo biotério da UNIFESP, divididos em dois grupos de quatro animais: animais-controle – receberam 0,1 mililitro (mL)

de tampão fosfato (PBS) intraperitonealmente (ip); animais-tratado – receberam 0,1 mL de glucana ip na concentração de 150 microgramas por animal ( $\mu\text{g}/\text{animal}$ ), 24 horas antes da inoculação da bactéria. Os grupos foram observados diariamente durante duas semanas, para avaliar a mortalidade, celularidade peritoneal, espriamento de macrófagos e fagocitose.

- **Bactérias:** cultura fresca da bactéria *K. pneumoniae*, homogeneizada em salina estéril, na concentração de  $1 \times 10^8$  bactérias por 0,2 mL, inoculada ip nos animais-controle e nos tratados previamente com glucana. Depois de 15 dias, foi repetida a inoculação de bactérias.
- **Sacrifício:** os animais foram sacrificados sete dias após a segunda inoculação, por sangria.
- **Avaliação da celularidade:** após a lavagem da cavidade peritoneal com 5 microlitros ( $\mu\text{L}$ ) de PBS, as células de cada animal foram coletadas em tubos plásticos mantidos em banho de gelo, fixadas e coradas com solução de cristal violeta 0,5%, em ácido acético 30%, na proporção de 10  $\mu\text{L}$  do corante para 90  $\mu\text{L}$  da suspensão celular e contadas em câmara de Neubauer, em microscopia óptica (MO). Considerou-se como resultado o número total de células livres e porcentagem de diferentes tipos celulares, discriminados em células mononucleares e polimorfonucleares.
- **Espraiamento de macrófagos:** alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  de suspensão de células peritoneais de animais-controle e animais-tratado foram coladas sobre lamínulas de vidro, acondicionadas em placas de cultura de 20 poços e incubadas por 20 minutos à temperatura ambiente. Após

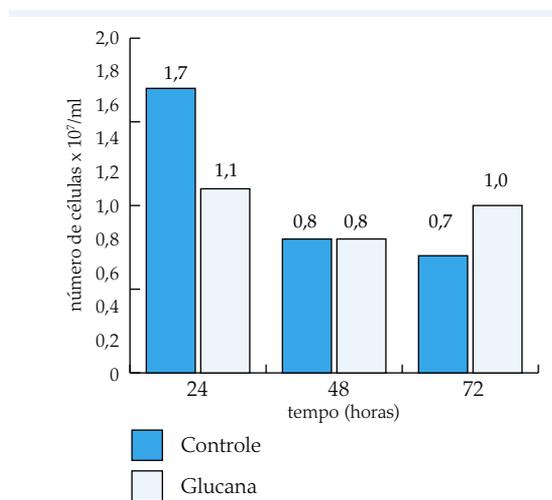
lavagem com PBS a  $40^\circ\text{C}$ , as lamínulas foram recobertas com PBS e incubadas por 60 minutos a  $370^\circ\text{C}$ , lavadas e fixadas com glutaraldeído (0,25% em PBS) por dez minutos. Depois da análise e quantificação em microscopia de fase, foi estabelecida a porcentagem de células espiadas e não espiadas (100 células por lamínula).

- **Fagocitose:** células da cavidade peritoneal aderidas a lamínulas (conforme descrito no espriamento) foram incubadas com solução de bactérias opsonizadas ( $1 \times 10^6$  células por mL), por 60 minutos, a  $370^\circ\text{C}$ . Em seguida, lavadas, fixadas com glutaraldeído por dez minutos (coradas Gram), analisadas em MO, estabelecendo-se posteriormente a porcentagem de células espiadas que fagocitaram bactérias.
- **Análise estatística:** os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de comparações múltiplas pelo método de Tukey. Valores significantes =  $p < 0,05$ .

### 3 Resultados

O Gráfico 1 mostra que a inoculação de glucana no peritônio de camundongos gera uma pequena variação no número total de células livres nesta cavidade. No período de 24 horas, observamos, no grupo animais-tratado, uma diminuição significativa do número total de células em relação ao grupo animais-controle. Já no período de 48 horas, o número total de células peritoneais não apresentava variação significativa, enquanto no período de 72 horas a variação na quantidade de células no peritônio mostrou-se substancialmente aumentada no grupo

animais-tratado, em comparação com o grupo animais-controle.



**Gráfico 1: Número células livres na cavidade peritoneal**

Número de células livres na cavidade peritoneal, estimuladas com a inoculação ip de 150 µg/animal de glucana. Os resultados mostram o aumento significativo no aumento de células, apenas no controle 24 horas ( $p < 0,05$ ). Nos demais tempos avaliados, não observamos diferenças significativas entre o grupo-controle e o grupo-tratado com glucana.

Fonte: Os autores.

O diferencial dos tipos celulares encontrados no lavado peritoneal de camundongos tratados com glucana e com controle mostrou uma diminuição significativa na quantidade total de célula mononuclear dos grupos inoculados com glucana em relação aos grupos-controle, em todos os períodos avaliados (Tabela 1).

**Tabela 1: Porcentagem de células mononucleares presentes no peritônio**

Tempo (horas)	Controle (%)	Glucana (%)
24	88	63,5
48	99,75	92,75
72	100	87,5

Fonte: Os autores.

Os resultados apresentados na Tabela 2 indicam um aumento significativo da quantidade total das células polimorfonucleares comparativamente entre grupos animais-tratado com glucana e grupos animais-controle.

**Tabela 2: Porcentagem de células polimorfonucleares presentes no peritônio**

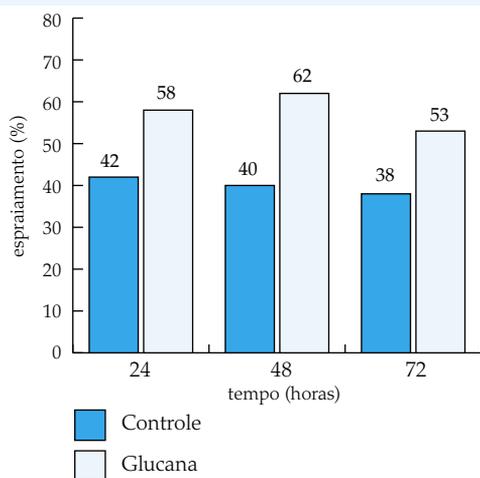
Tempo (horas)	Controle (%)	Glucana (%)
24	12	36,5
48	0,25	7,25
72	0	12,5

Fonte: Os autores.

As células peritoneais retiradas de animais inoculados ip com glucana e de animais-controle tiveram seu nível de espraio avaliado nos períodos de 24, 48 e 72 horas após a inoculação. Os resultados mostrados no Gráfico 2 indicam que, nos períodos avaliados, obtivemos um aumento significativo na porcentagem de espraio de células no grupo inoculado com glucana em relação ao grupo-controle.

A morfologia diferencial entre macrófagos espraio e não espraio é mostrada na Fotografia 1. Observam-se o aumento do tamanho da célula e a amplitude do citoplasma das células peritoneais espraio, comparados com o pequeno tamanho das células não espraio.

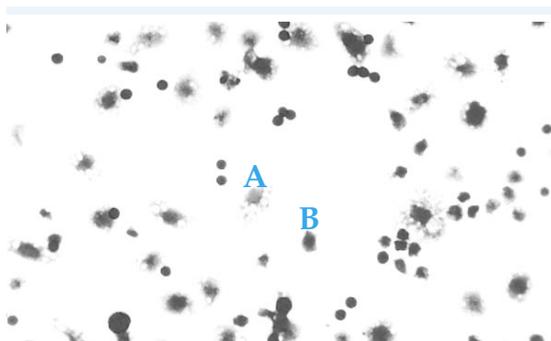
As células do peritônio dos animais inoculados ip com glucana e de grupos-controle tiveram sua capacidade de fagocitose avaliada ante a bactéria *K. pneumoniae*. O Gráfico 3 mostra um aumento significativo na porcentagem de fagocitose de células peritoneais nos grupos animais-tratado em relação ao grupo animais-controle.



**Gráfico 2: Espraçamento de células peritonias**

Espraçamento de células peritonias estimuladas com a inoculação de 150 µg/animal de glucana ip. Os resultados indicam o aumento significativo na porcentagem de espraçamento do grupo-tratado em relação ao grupo-controle ( $p < 0,05$ ). Esta diferença foi observada nos três períodos avaliados.

Fonte: Os autores.



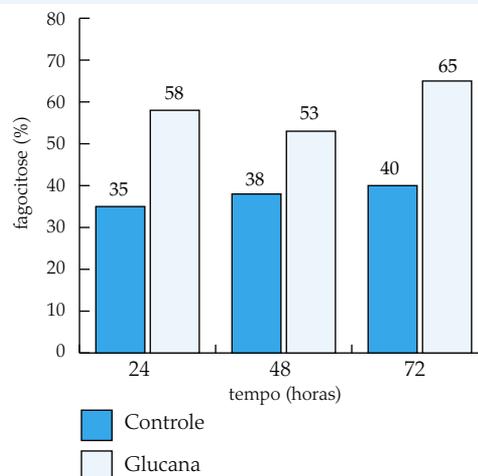
**Fotografia 1: Células espraçadas e não espraçadas**

Células do lavado peritonial de camundongos, após 72 horas da inoculação de glucana. Nesta fotomicrografia, destacamos a diferença entre células espraçadas (A) e não espraçadas (B) (36x).

Fonte: Os autores.

Na Fotografia 2, observam-se células peritonias aderidas às lamínulas que fagocitaram bactérias opsonizadas. Nas células espraçadas, encontramos, em seu interior, va-

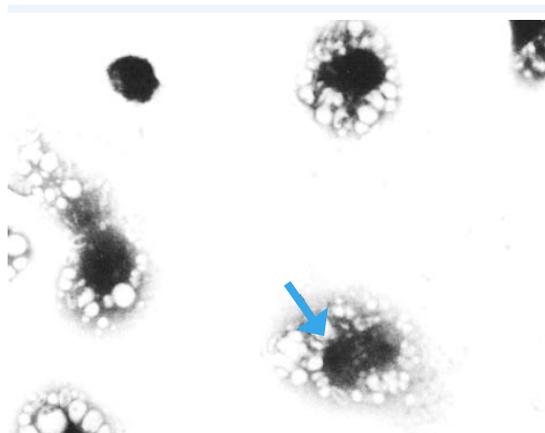
cúolos citoplasmáticos com bactérias recém-fagocitadas.



**Gráfico 3: Fagocitose de células peritonias**

Fagocitose de células peritonias, estimuladas com a inoculação 150 µg/animal de glucana ip, sobre a bactéria *K. pneumoniae* opsonizada. Os resultados mostram o aumento significativo na porcentagem de fagocitose no grupo-tratado em relação ao grupo-controle ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Os autores.



**Fotografia 2: Vacúolos fagocíticos**

Células do lavado peritonial de camundongos, após 72 horas da inoculação. Nesta foto, destaca-se a presença de vacúolos fagocíticos com bactérias *K. pneumoniae* e macrófagos espraçados (100x).

Fonte: Os autores.



## 4 Discussão

O processo inflamatório é uma resposta do organismo que tende a restituir tecidos lesados por agentes físicos, químicos ou biológicos. Contudo, o curso da reação inflamatória depende de propriedades específicas do agente etiológico, do processo e do *background* genético do hospedeiro (MARIANO, 1995). A fase inicial de toda a reação inflamatória é caracterizada por um aumento da permeabilidade vascular, edema e migração de leucócitos. Nesta fase, denominada aguda, observamos um fluxo preferencial de células polimorfonucleares até as primeiras 24 horas da lesão. Depois desse período, a celularidade é substituída por um infiltrado mononuclear.

A reação inflamatória aguda tem caráter inespecífico, não envolvendo assim a participação do sistema linfocitário e suas citocinas. Vários trabalhos na literatura têm demonstrado a importância dessa fase do processo na destruição de agentes agressores e no restabelecimento da ordem e normalidade tecidual. Dentre esses trabalhos podemos destacar o de Harima e outros (1997) que demonstrou que a inoculação de agente estimulante inespecífico, a glucana, na cavidade peritoneal, modifica a resposta de animais ante a septicemia por *K. pneumoniae*, aumentando sua sobrevivência de 81% a 95%, respectivamente, quando comparados com os grupos-controle, cujos índices variaram entre 10% e 20%. Como esses autores não avaliaram quais eram as alterações metabólicas nas células peritoneais inflamatórias, produzidas pela inoculação da glucana antes da septicemia por *K. pneumoniae*, propusemo-nos a avaliar a influência dessa substância sobre as atividades das células peritoneais que migram para a cavidade peritoneal.

Nossos resultados demonstraram que a glucana não produz um aumento significativo no número de leucócitos que migram para a cavidade peritoneal. Quanto aos tipos celulares encontrados, observamos um aumento de polimorfonucleares nas primeiras 24 horas que decresce, com o passar do tempo, até níveis semelhantes ao controle. Os resultados sobre a capacidade de espraio e fagocitose revelaram ainda um aumento significativo de ambos os parâmetros, mostrando que essas células foram estimuladas ou ativadas pela inoculação da glucana.

A estimulação inespecífica, causada pela glucana nos leucócitos da cavidade peritoneal, produziu um aumento na atividade profissional dessas células. Quando entram em contato com um agente estranho, este é rapidamente fagocitado e destruído pelas espécies reativas do oxigênio e enzimas líticas (ROBINSON; BADWEY, 1994). A maior capacidade de fagocitar a bactéria *K. pneumoniae* é oriunda da maior ativação inespecífica dos leucócitos peritoneais, impedindo, com isso, a disseminação da bactéria pelo organismo do animal.

## 5 Conclusão

A glucana alterou o metabolismo das células inflamatórias peritoneais de camundongos balb/c;

A glucana não induziu um aumento significativo do número total de células inflamatórias livres que migraram para a cavidade peritoneal;

Nas primeiras 24 horas, houve um aumento no número de células polimorfonucleares que migraram para a cavidade peritoneal dos animais inoculados com glucana, decrescendo com o passar do tempo até atingir níveis semelhantes ao do controle;

Observou-se um aumento significativo na capacidade de espraiamento das células inflamatórias peritoniais dos animais que receberam inoculação de glucana;

A capacidade fagocítica das células livres do peritônio de animais inoculados com glucana, ante a bactéria *K. pneumoniae*, aumentou significativamente;

A glucana produziu uma estimulação inespecífica nos leucócitos da cavidade peritoneal, que resultou em um aumento na atividade profissional dessas células.

### The effect *in vivo* of glucan on the peritoneal inflammatory cells activity of the balb/c mice

The concept of inflammation as a localized phenomenon that neutralizes an aggressive agent has acquired a broader meaning. In this context, the role of macrophage cells is relevant due to their high phagocytic capacity and the destruction of phagocytized agent. Considering the importance of the macrophage in the unfolding inflammatory process, many stimulants have been considered to increase the activation independently from leucocytic system. The glucan, a polysaccharide derived from fragments of the wall of *Saccharomyces cerevisiae* is a compound that has shown effective *in vivo* experiments. In this work, it was evaluated the influence of this molecule on inflammatory cells of the peritoneal socket. The results had shown a marked enhance in the distribution capacity and of the phagocytosis of the active macrophages over the *Klebsiella pneumoniae* as a direct effect form the glucan, compared with

the control group. As the total number of cells from the peritoneal cavity, it was not observed a significative enhancement compared with the control. The results show that the glucan has the capacity to activate the inflammatory cells in the peritoneal cavity and easily promote the destruction of any invading agent.

**Key words:** Glucan. Inflammatory cells. Macrophages. Phagocytosis.

### Referências

- BIER, O. G. *Microbiologia e imunologia*. 23. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1984.
- BROWDER, I. W.; MCNAMEE, R. B.; DI LUZIO, N. R. Glucan immunotherapy as adjunct in the surgical excision of experimental melanoma. *Surgical Forum*, Chicago, v. 28, p. 171-173, 1977.
- COOK, J. A. et al. Evaluation of effector cells mediating the antitumor action of glucan. *Journal of the Reticuloendothelial Society*, New York, v. 22, n. 1, p. 21-34, 1997.
- CRAWFORD, R. M. et al. Macrophage activation: a riddle of immunological resistance. In: ZWILLING, B. S.; EISENSTEIN, T. K. (Ed.). *Macrophage-pathogen interactions*. 1. ed. New York: Marcel Dekker, 1994. p. 29-46.
- DI LUZIO, N. R.; MCNAMEE, R. B.; WILLIAMS, D. L. Glucan induced inhibition of tumor growth and enhancement murine tumor models. *Advances in Experimental Medicine & Biology*, New York, v. 121, p. 269-290, 1980.
- HARIMA, H. A. *Influência da glucana na evolução do lúpus murino*. 1990. Tese (Doutorado)—Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 1990.
- \_\_\_\_\_ et al. Effect of glucan on murine lupus evolution and on host resistance to *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, Richmond, v. 11, n. 3, p. 175-178, 1997.



---

HASSID, W. Z.; HOSLYN, M. A.; MCCREARY, R. M. The molecular constitution of an insoluble polysaccharide from yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of the American Chemical Society*, Columbus, v. 63, n. 1, p. 295-298, 1941. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/cgi-bin/archive.cgi/jacsat/1941/63/i01/pdf/ja01846a071.pdf>>. Acesso em: 11 abr. 2005.

MARIANO, M. The experimental granuloma. A hypothesis to explain the persistence of the lesion. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, São Paulo, v. 37, n. 2, p. 161-176, 1995.

ROBINSON, J. M.; BADWEY, J. A. Production of active oxygen species by phagocytic leukocytes. In: ZWILLING, B. S.; EISENSTEIN, T. K. (Ed.). *Macrophage-pathogen interactions*. 1. ed. New York: Marcel Dekker, 1994. p. 158-178.

SELJELID, R.; BUSUND, L-T. R. The biology of macrophages: II inflammation and tumors. *European Journal of Haematology*, v. 52, n. 1, p. 1-12, 1994.

recebido em: 11 abr. 2005 / aprovado em: 30 jun. 2005

---

**Para referenciar este texto:**

RIBEIRO, R. M. R.; PASSETI, T. A.; OGATA, T. R. P. Ação da glucana *in vivo* sobre a atividade de células inflamatórias peritoniais de camundongos balb/c. *ConScientiae Saúde*, São Paulo, v. 4, p. 63-70, 2005.