



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

**Influência de polissacarídeos obtidos do
basidiomiceto *Auricularia auricula* na
Resposta Imune Inata**

Dissertação

Luísa Coutinho Coelho

Brasília, DF

29 de agosto de 2023

Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

Influência de polissacarídeos produzidos pelo basidiomiceto *Auricularia auricula* na Resposta Imune Inata

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Biologia
Molecular do Instituto de Biologia da
Universidade de Brasília, como parte dos
requisitos necessários para obtenção do
título de Mestre em Biologia Molecular.

Autora: Luísa Coutinho Coelho

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Anamélia Lorenzetti Bocca

Brasília, DF

29 de agosto de 2023

Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

Influência de polissacarídeos obtidos do basidiomiceto *Auricularia auricula* na Resposta Imune Inata

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Biologia
Molecular do Instituto de Biologia da
Universidade de Brasília, como parte dos
requisitos necessários para obtenção do
título de Mestre em Biologia Molecular.

Orientadora: Prof.^a Dra. Anamélia Lorenzetti Bocca (Universidade de Brasília – UnB)

Avaliadora: Prof.^a Dra. Maria de Fátima Borin (Universidade de Brasília – UnB)

Avaliadora: Prof.^a Dra. Elaine Rosechrer Carbonero (Universidade Federal de Catalão -
UFCAT)

Avaliadora suplente: Prof.^a Dra. Larissa Fernandes Matos (Universidade de Brasília – UnB)

Agradecimentos

Obrigada a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a execução deste projeto. Àqueles que acompanharam essa saga quase shakespeariana dos últimos dois anos, afinal, é ou não é uma glucana?

Agradeço à minha mãe por todo incentivo e cada “puxão de orelha”. Obrigada por me ouvir divagar sobre coisas complexas do mestrado e se maravilhar com outras que talvez nenhuma de nós compreendesse. Obrigada por tudo que não foi dito e que eu não preciso dizer. Enfim, obrigada!

À minha avó Sônia, que foi uma presença sólida na minha criação e, junto com minha mãe, contribuiu para que eu me tornasse quem sou hoje. Infelizmente, a senhora não está aqui para me acompanhar nessa etapa, mas saiba que eu não estaria aqui sem você.

Às minhas irmãs, Berenice, Cora, Júlia e Madalena, por todo suporte emocional e alívio cômico, fundamentais para superar até os dias mais conturbados.

À minha família, pelo incentivo ao longo do projeto, mesmo que usar esse cogumelo para preparar um risoto ao funghi ainda lhes pareça uma ideia mais interessante e promissora.

À minha avó Germana, que me incentivou e me deu suporte ao longo da minha jornada. Obrigada por me mostrar que as maiores aventuras da vida podem estar escondidas em livros e que às vezes precisamos deles para entender aspectos sutis da realidade. Obrigada também ao seu filho canino, Loki, que por algum motivo se sentava ao meu lado e olhava para a tela do meu computador como se entendesse tudo que eu estava escrevendo.

Ao meu pai pelo apoio e por me incentivar da melhor forma que você conseguiu.

Às minhas amigas da vida, Bia, Gabi e Lu Guimarães, que me aguentam desde os longínquos anos do ensino fundamental e jardim de infância. Obrigada pela amizade que conseguiu superar todas as barreiras temporais e se estender para vida.

Aos meus amigos da graduação que me apoiaram em todas as escolhas que me guiaram na decisão de seguir a vida acadêmica da pós-graduação. Especialmente, quero agradecer a Blu, Pepeu, Hagui, Deba, Marina e Bárbara pela companhia e conselhos durante o mestrado, que tornaram tudo mais leve.

À minha orientadora, professora Anamélia Bocca, pela confiança e pelas oportunidades que me proporcionou ao longo desse mestrado. Obrigada por toda paciência, por todas discussões e conselhos que propiciaram minha construção como cientista.

À Dra. Maria Carolina Bezerra que me acolheu em São Carlos e embarcou na tentativa de elucidar a estrutura de minha amostra. Seu apoio e orientação foram essenciais para esta jornada que, acredito, só melhore daqui para frente para nós e para Glück. Obrigada por me introduzir no mundo da ressonância e por todas as vezes que você foi para a bancada comigo, fosse dia ou madrugada, em Brasília, Goiânia, Catalão e São Carlos. Obrigada por todas as discussões, críticas construtivas e infinitas horas dedicadas a este projeto. Ele não teria sido possível sem sua ajuda.

Aos meus amigos, que são ou já foram do Laboratório de Imunologia Aplicada, por tornarem os dias no laboratório mais leves e divertidos. Obrigada Clara, Filipe, Lucas, Luísa Dan, Pedro Bürgel, Pedro Leonardo, Raffael, Thaís e Tatiana por todo apoio emocional, experimental, por todas as pausas para tomar café. Em especial, quero agradecer a Luísa Dan e a Thaís pelo apoio em todos os experimentos, inclusive os que duraram até de madrugada, e a minha xará por sempre oferecer “5 minutos de porrada sem perder a amizade”. Vale também agradecer ao conselho de anciões, também conhecidos como pós-docs (Clara, Pedro B. e Raffa) pelos sábios conselhos (pitacos muito bem colocados), pela fina escolha de trilha sonora da sala de cultura e por mostrarem que fazer um projeto “show-show” não é fácil, “é-difícil”.

Aos demais alunos, ex-alunos e professoras do Laboratório de Imunologia Aplicada pelo apoio no laboratório, pelas discussões construtivas e pela troca de conhecimento.

Ao técnico Chiquinho por todo apoio cotidiano e por me lembrar sempre de fazer uma pausa para tomar café.

Aos demais laboratórios do Instituto de Ciências Biológicas, que auxiliaram este projeto de alguma forma pelo empréstimo de equipamentos, troca de protocolos e empréstimo de reagentes (café conta?).

A todos camundongos que foram utilizados nos experimentos realizados e aos responsáveis pelo cuidado deles no biotério do Instituto de Biologia.

Ao Laboratório de RMN (UFSCar) e ao Dr. Antonio Gilberto Ferreira por permitirem as análises das minhas amostras que me introduziram na caracterização mais aprofundada da molécula.

Aos Laboratórios de Química de Polímeros e de Ressonância Magnética Nuclear (UFG) e seus coordenadores, Dra. Kátia Flávia Fernandes e Dr. Luciano Moraes Lião, por concederem o uso de espaço, equipamentos e reagentes para a otimização do processo de extração e caracteriza de minha amostra.

Ao Laboratório de Bioquímica e Química Orgânica e especialmente a Dra. Elaine Carbonero, pelo auxílio no preparo das amostras e pela análise de GC-MS.

Ao Dr. Christian Hoffmann por fazer e analisar os dados sequenciamento, que agregaram muito a proposta deste trabalho.

Ao Dr. Cláudio Francisco Tormena, do Laboratório de Ressonância do Instituto de Química (Unicamp) pelas análises de difusão.

À banca examinadora, Dra. Maria de Fátima Borin, Dra. Elaine Carbonero e a Dra. Larissa Fernandes Matos, por aceitarem avaliar o projeto final.

Às agências de fomento CAPES e FAP-DF pela viabilização desses projetos e à Universidade de Brasília por ser parte da minha construção profissional e formação científica.

Resumo

O uso de cogumelos como agentes benéficos à saúde humana remonta a milhares de anos, especialmente na cultura asiática. A prospecção do uso de polissacarídeos, investigados como potenciais mediadores de diferentes respostas imunológicas associadas a sistemas de inflamação e infecção tem sido foco de pesquisa nos últimos anos. Estudos recentes demonstram que o basidiomiceto *Auricularia auricula*, considerado o terceiro cogumelo comestível de maior importância cultivado no mundo, é utilizado não só no contexto alimentício, como alimentos funcionais, mas também apresenta valor para a indústria farmacêutica por seus compostos bioativos, como os polissacarídeos, vitaminas, proteínas, polifenóis e minerais. Polissacarídeos obtidos deste cogumelo apresentam atividade antioxidante, antitumoral, anticoagulante, hipoglicêmica, radioprotetora, antiviral e imunomodulatória.

A modulação da resposta imune por polissacarídeos é bem descrita na literatura, com a atuação de receptores celulares responsáveis pela ligação de açúcares que levam a ativação e sinalização celular, desencadeando ativando resposta imune inata e adaptativa. A característica da resposta, entretanto, está associada com a composição molecular e estrutural destas moléculas, podendo variar com a composição monossacarídica, padrão de ramificação, peso molecular, solubilidade, método de extração da molécula e o grau de pureza obtido.

Um dos polissacarídeos caracterizados como imuno-estimuladores, são as β -glucanas, que foram avaliadas em aproximadamente \$480 milhões no mercado global em 2020. Suas aplicações no mercado abrangem seu potencial imunomodulador e sua característica de alimento funcional. Polissacarídeos e oligossacarídeos adquiriram um espaço dentro do conceito de prebiótico, por serem fibras não digestíveis que podem ser benéficas ao hospedeiro ao, seletivamente, estimular o crescimento e/ou atividade de populações da microbiota no cólon. Essa modulação da microbiota está associada a alteração na função da resposta imune e a melhora da integridade do microbioma intestinal.

Quando esse microbioma é perturbado, pode ocasionar uma disbiose intestinal que pode progredir para uma resposta imune crônica tecidual. Localmente, a mudança de população leva a produção de metabólitos que interfere na homeostase tecidual para um quadro de dano ao hospedeiro, chamado de colite ulcerosa. Dados anteriores do grupo de pesquisa indicam que

polissacarídeos obtidos do cultivo submerso deste cogumelo atuam na indução de uma resposta imune protetora na infecção pulmonar pelo fungo *Cryptococcus neoformans*. Nesse contexto, um dos objetivos deste trabalho foi avaliar como a administração de exopolissacarídeos obtidos do macrofungo *Auricularia auricula* por gavagem em camundongos c57BL/6J, de linhagem selvagem e *Knock-out* para o receptor Dectina-1, atuaria em uma modelo experimental de colite, induzida por dextran sulfato de sódio (DSS). Os resultados obtidos indicam que o tratamento amenizou os sintomas clínicos da colite, como o encurtamento do tamanho do intestino e parâmetros histopatológicos e que a resposta é dependente do receptor Dectina-1, uma vez que os mesmos dados não foram observados nos animais *Knock-out* para este receptor.

Devido ao baixo rendimento, foi proposto uma metodologia alternativa de extração para aumentar o rendimento de polissacarídeos a partir da sua purificação do micélio, e observamos um aumento do rendimento dos polissacarídeos e a sua caracterização mostrou a presença majoritária de galactose, glicose, manose, com menores quantidades de fucose, xilose e ribose. Quando comparamos os polissacarídeos obtidos nos dois métodos de extração, observamos que, na composição monossacarídica predominante, houve um aumento na concentração de galactose, manutenção da quantidade de glicose e menor quantidade de manose. Analisando a atividade biológica *in vitro* deste polissacarídeo observamos que ele foi capaz de estimular a produção de TNF- α pelos macrófagos. Considerando a capacidade de modular o microbioma intestinal, analisamos também a capacidade destes polissacarídeos de modular uma infecção em um outro tecido, e usamos o modelo *in vivo* do modelo experimental de infecção por *Cryptococcus neoformans*. Os animais infectados apresentaram uma disseminação maior do fungo quando comparado com os animais não tratados ou os *Knock-outs* para Dectina-1.

Concluindo que apesar de serem extraídos do mesmo macrofungo e ativaram produção de TNF- α *in vitro*, os polissacarídeos obtidos do meio de cultura conseguiram controlar um processo inflamatório *in situ* enquanto aqueles extraídos do micélio não controlaram a disseminação fúngica para o sistema nervoso central.

Palavras-chave: Polissacarídeos, prebiótico, resposta imune, colite, *Cryptococcus neoformans*

Abstract

The use of mushrooms as beneficial agents for human health dates back thousands of years, especially in Asian culture. The prospect of using polysaccharides, investigated as potential mediators of different immune responses associated with inflammation and infection systems, has been the focus of research in recent years. Recent studies demonstrate that the basidiomycete *Auricularia auricula*, considered the third most important edible mushroom cultivated in the world, is used not only in the food context, such as functional foods, but also presents value for the pharmaceutical industry for its bioactive compounds, such as polysaccharides, vitamins, proteins, polyphenols, and minerals. Polysaccharides obtained from this mushroom have antioxidant, antitumor, anticoagulant, hypoglycemic, radioprotective, antiviral and immunomodulatory activity.

The modulation of the immune response by polysaccharides is well described in the literature, with the action of cell receptors responsible for binding sugars that lead to cell activation and signaling, triggering an innate and adaptive immune response. The characteristic of the response, however, is associated with the molecular and structural composition of these molecules, which may vary with the monosaccharide composition, branching pattern, molecular weight, solubility, extraction method of the molecule and the degree of purity obtained.

One kind of polysaccharides characterized as immunostimulants are β -glucans, which were valued at approximately \$480 million in the global market in 2020. Their market applications include their immunomodulatory potential and their characteristic of functional food. Polysaccharides and oligosaccharides have acquired a space within the prebiotic concept, as they are non-digestible fibers that can be beneficial to the host by selectively stimulating the growth and/or activity of microbial populations in the colon. This modulation of the microbiota is associated with a change in the function of the immune response and an improvement in the integrity of the intestinal microbiome.

When this microbiome is disturbed, it can lead to gut dysbiosis that can progress to a chronic tissue immune response. Locally, the change in population leads to the production of metabolites that interfere with tissue homeostasis leading to a condition of damage to the host, called ulcerative colitis. Previous data from the research group indicate that polysaccharides

obtained from submerged cultivation of this mushroom act in the induction of a protective immune response in pulmonary infection by the fungus *Cryptococcus neoformans*. In this context, one of the objectives of this work was to evaluate how the administration of exopolysaccharides obtained from the macrofungus *Auricularia auricula* by gavage in c57BL/6J mice, wild type, and *Knock-out* for the Dectin-1 receptor, would act in an experimental model of colitis, induced by sodium dextran sulfate (DSS). The results obtained indicate that the treatment alleviated the clinical symptoms of colitis, such as the shortening of the intestine size and histopathological parameters and that the response is dependent on the Dectin-1 receptor, since the same data were not observed in the *Knock-out* animals for this receiver.

Due to the low yield, an alternative extraction methodology was proposed to increase the yield of polysaccharides from their purification from the mycelium, and we observed an increase in the yield of polysaccharides and their characterization showed the majority presence of galactose, glucose, mannose, with smaller amounts of fucose, xylose and ribose. When comparing the polysaccharides obtained in the two extraction methods, we observed that, in the predominant monosaccharide composition, there was an increase in the concentration of galactose, maintenance of the amount of glucose and less amount of mannose. Analysing the *in vitro* biological activity of this polysaccharide, we observed that it was able to stimulate the production of TNF- α by macrophages. Considering the ability to modulate the intestinal microbiome, we also analysed the ability of these polysaccharides to modulate an infection in another tissue, and we used the *in vivo* model of the experimental model of *Cryptococcus neoformans* infection. Infected animals showed greater spread of the fungus when compared to untreated animals or Dectin-1 *Knock-out*.

Altogether, these results show that despite being extracted from the same macrofungus and activating TNF- α production *in vitro*, the polysaccharides obtained from the culture medium were able to control an inflammatory process *in situ* while those extracted from the mycelium did not control fungal dissemination to the central nervous system.

Keywords: Polysaccharides, prebiotics, immune response, colitis, *Cryptococcus neoformans*

Lista de Figuras

FIGURA 1. MORFOLOGIA DO CORPO FRUTÍFERO DE TRÊS VARIEDADES DO COGUMELO <i>AURICULARIA AURICULA</i>	19
FIGURA 2. CONCEITUALIZAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE POLISSACARÍDEOS DE COGUMELoS.....	21
FIGURA 3. PRODUÇÃO DE CITOCINAS APÓS ESTÍMULOS COM EXOPOLISSACARÍDEOS DE <i>A. AURICULA</i> E <i>G. LUCIDUM</i> . SOBRENADANTE DO CULTIVO CELULAR AVALIADO APÓS 24 HORAS DE ESTÍMULO.....	22
FIGURA 4. CULTIVO DE <i>AURICULARIA AURICULA</i> EM PLACA DE PETRI CONTENDO MEIO BATATA DEXTROSE ÁGAR.....	26
FIGURA 5. CULTIVO SUBMERSO DE <i>AURICULARIA AURICULA</i> EM MEIO BATATA DEXTROSE LÍQUIDO.....	27
FIGURA 6. CRONOGRAMA DO MODELO EXPERIMENTAL IN VIVO DE COLITE INDUZIDA POR DSS 2%.....	29
FIGURA 7. ANÁLISE DO TAMANHO DO INTESTINO (CORTE DO CECO AO RETO) DE CAMUNDONGOS c57BL/6J, SELVAGEM E DECTINA-1 KNOCK-OUT, EM MODELO EXPERIMENTAL DE COLITE.	31
FIGURA 8. QUANTIFICAÇÃO DA CITOCINA TNF- α NO INTESTINO E NO SORO DE CAMUNDONGOS EM MODELO EXPERIMENTAL DE COLITE.....	32
FIGURA 9. CORTE HISTOPATOLÓGICO DO TECIDO INTESTINAL DE CAMUNDONGOS c57BL/6J DE GENÓTIPO SELVAGEM E KNOCK-OUT PARA DECTINA-1 EM MODELO EXPERIMENTAL DE COLITE INDUZIDA POR DSS.....	34
FIGURA 10. FLUXOGRAMA DA METODOLOGIA PROPOSTA DE OBTENÇÃO DE POLISSACARÍDEOS A PARTIR DO CULTIVO SUBMERSO DE <i>AURICULARIA AURICULA</i>	36
FIGURA 11. ESPECTRO DE ^{13}C QUANTITATIVO DA AMOSTRA DE CONTEÚDO POLISSACARÍDICO EXTRAÍDO DE MICÉLIO DE <i>AURICULARIA AURICULA</i> (ESQUERDA). MAPA DE CORRELAÇÃO HSQC NÃO DESACOPLADO, ELUCIDADO NA DISCUSSÃO DA FIGURA 16 (DIREITA).....	40
FIGURA 12. PERFIL CROMATOGRÁFICO PARA DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLAR DA AMOSTRA, OBTIDA EM COLUNA DE EXCLUSÃO MOLECULAR.....	41
FIGURA 13. O MAPA 2D DOSY.	42
FIGURA 14. CROMATOGRAMA PARA DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA AMOSTRA OBTIDA PELO PROCESSO DE EXTRAÇÃO PROPOSTO.	43

FIGURA 15. MAPA DE CONTORNO HSQC _{EDIT} PARA O POLISSACARÍDEO DE <i>AURICULARIA AURICULA</i> , EM DMSO-D ₆ , 11.1 TESLA 343 K.....	44
FIGURA 16. MAPA DE CONTORNO HSQC _{EDIT} DA REGIÃO ESPECTRAL CARBINÓLICA PARA O POLISSACARÍDEO DE <i>AURICULARIA AURICULA</i> , EM DMSO-D ₆ , 11.1 TESLA 343 K.....	45
FIGURA 17. MAPA DE CONTORNO HSQC ACOPLADO, PARA O POLISSACARÍDEO DE <i>AURICULARIA AURICULA</i> , EM DMSO-D ₆ , 11.1 TESLA 343 K.....	45
FIGURA 18. CRONOGRAMA DO MODELO EXPERIMENTAL DE INFECÇÃO INTRATRAQUEAL COM O FUNGO <i>CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS</i>	50
FIGURA 19. CARGA FÚNGICA TECIDUAL APÓS INFECÇÃO COM <i>CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS</i> (INTRATRAQUEAL), AVALIADA 7 E 14 DIAS APÓS A INFECÇÃO (D.P.I.).	52
FIGURA 20. CARGA FÚNGICA TECIDUAL APÓS INFECÇÃO COM <i>CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS</i> (INTRATRAQUEAL), AVALIADA 14 DIAS APÓS A INFECÇÃO (D.P.I.).....	54
FIGURA 21. DOSAGEM DE CITOCINAS NO MACERADO TECIDUAL DE CÉREBRO E PULMÃO DE CAMUNDONGOS C57BL/6J INFECTADOS/INSTILADOS COM O FUNGO <i>CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS</i>	55
FIGURA 22. DOSAGEM DE CITOCINAS NO MACERADO TECIDUAL DE CÉREBRO E PULMÃO DE CAMUNDONGOS KNOCK-OUT PARA DECTINA-1 INFECTADOS/INSTILADOS COM O FUNGO <i>CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS</i>	57
FIGURA 23. IMUNOFENOTIPAGEM DE ESLENÓCITOS DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM <i>CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS</i> APÓS 14 DIAS DA INFECÇÃO.....	59
FIGURA 24. IMUNOFENOTIPAGEM DE ESLENÓCITOS DE CAMUNDONGOS <i>KNOCK-OUT</i> PARA DECTINA-1 INFECTADOS COM <i>CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS</i> APÓS 14 DIAS DA INFECÇÃO.....	60
FIGURA 25. CORTE HISTOPATOLÓGICO DO TECIDO PULMONAR DE CAMUNDONGOS C57BL/6J, 14 DIAS APÓS INFECÇÃO (INTRATRAQUEAL) COM O FUNGO <i>CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS</i>	62
FIGURA 26. CORTE HISTOPATOLÓGICO DO TECIDO PULMONAR DE CAMUNDONGOS <i>KNOCK-OUT</i> PARA DECTINA-1, 14 DIAS APÓS INFECÇÃO (INTRATRAQUEAL) COM O FUNGO <i>CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS</i>	64
FIGURA 27. CORTE HISTOPATOLÓGICO DO TECIDO INTESTINAL DE CAMUNDONGOS C57BL/6J E KO, 14 DIAS APÓS INFECÇÃO (INTRATRAQUEAL) COM O FUNGO <i>CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS</i>	66
FIGURA 28. PRODUÇÃO DE TNF-A AVALIADA NO SOBRENADANTE DO CULTIVO DE MACRÓFAGOS APÓS ESTÍMULO DE 24 HORAS COM HETEROPOLISSACARÍDEO.....	71

FIGURA 29. PRODUÇÃO DE IL-10 AVALIADA NO SOBRENADANTE DO CULTIVO DE MACRÓFAGOS APÓS ESTÍMULO DE 24 HORAS COM POLISSACARÍDEO	72
FIGURA 30. PRODUÇÃO DE TNF- α AVALIADA NO SOBRENADANTE DO CULTIVO DE MACRÓFAGOS APÓS ESTÍMULO DE 24 HORAS COM POLISSACARÍDEO	73
FIGURA 31. PRODUÇÃO DE NITRITO NO SOBRENADANTE DO CULTIVO DE MACRÓFAGOS APÓS ESTÍMULO DE 24 HORAS COM OS POLISSACARÍDEOS.....	73
FIGURA 32 AVALIAÇÃO DA QUANTIDADE DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA (UFC) OBTIDAS EM MACRÓFAGOS (GM-CSF APÓS ESTÍMULO DE 24 HORAS COM OS POLISSACARÍDEOS.....	74

Lista de Figuras dos Materiais Anexos

ANEXO 1 CERTIFICADO DO CEUA PARA MODELO DE COLITE 81

ANEXO 2 CERTIFICADO DO CEUA PARA MODELO DE INFECÇÃO POR *C. NEOFORMANS*. 82

ANEXO 3 REPRESENTAÇÃO DO SEQUENCIAMENTO DAS AMOSTRAS FECALIS COLHIDAS NO MODELO DE COLITE. 83

ANEXO 4 ESTRATÉGIA DE SELEÇÃO DE CÉLULAS DO PAINEL 1..... 84

ANEXO 5 ESTRATÉGIA DE SELEÇÃO DE CÉLULAS DO PAINEL 2..... 84

Lista de Tabelas

Tabela 1. Composição monossacarídica relativa41

Lista de abreviações e símbolos

μg – micrograma

μL - microlitro

¹³C – carbono 13

18B7 – anticorpo monoclonal murino anti- GXM

2D - bidimensional

BH₄Na - borohidreto de sódio

cm – centímetro

CO₂ – Dióxido de carbono

DMSO – dimetilsulfóxido

DMSO-d6 – Dimetilsulfóxido hexadeuterado

DSS – Dextran Sulfato de Sódio

ELISA – “*Enzyme linked Immunosorbent assay*” (Ensaio de imunoabsorção enzimática)

EPS – exopolissacarídeo (s)

g – Grama

GC-MS - Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa

Hk – *heat-killed* (morto por calor)

Hz - hertz

IFN-γ - Interferon gamma

IFN-γ – Interferon gama

IL-10 – Interleucina-10

IL-1β – Interleucina-1 beta

IL-6 – Interleucina-6

IO₃Me – Iodeto de Metila

K – Kelvin

LCCM – Meio condicionado de fibroblastos L929

LPS - Lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*

M – Molar

M-CSF – fator estimulador de colônias de macrófagos

mg - miligrama

MHC II – Complexo principal de histocompatibilidade do tipo II

mL – mililitro

MOI – Multiplicidade de Infecção

ms - milissegundos

NaOH – Hidróxido de sódio

nm – nanômetro

NO₂⁻ - Nitrito

°C – graus celsius

OMS – Organização Mundial da Saúde

P.A. – padrão analítico

PBS – “*phosphate buffered saline*” (tampão salino fosfato)

rmGM-CSF – recombinante murino de fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RPM – rotações por minuto

RPMI-1640 – Meio Roswell Park Memorial Institute

s- Segundos

SDS – dodecil sulfato de sódio

SFB – Soro Fetal Bovino

TMS – tetra metil silano

TNF- α – fator de necrose tumoral alfa

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

v/v – proporção volume/volume

YPD – “*Yeast peptone dextrose*”

μM - micromolar

Sumário

1. Introdução	18
2. Objetivo.....	23
3. Capítulo I – Avaliação de exopolissacarídeos de <i>Auricularia auricula</i> no modelo murino de colite induzido por DSS.....	24
4. Capítulo II – Otimização da extração e caracterização de polissacarídeos do micélio de <i>Auricularia auricula</i>	34
5. Capítulo III – Avaliação do polissacarídeo obtido no modelo de infecção por <i>Cryptococcus neoformans</i>	46
6. Capítulo IV – Análise da atividade <i>in vitro</i> da fucomanogalactana e beta-glucana extraída do micélio.....	66
7. Conclusão.....	74
8. Referências.....	75
Anexos.....	81

1. Introdução

A prática de cultivo de cogumelos está presente há mais de 2000 anos, principalmente na cultura asiática. Métodos de cultivo, como a técnica JunCao (1983), têm sido elaborados e otimizados, para aumentar o rendimento desses fungos e seus compostos que possuem importante valor nutricional e medicinal, trazendo benefícios sociais, ecológicos e econômicos (Urban *et al.*, 2017).

O uso de cogumelos como alimentos se embasa, além do sabor, na sua composição rica em proteínas, carboidratos, fibras, vitaminas, minerais e antioxidantes. A prospecção de seus compostos bioativos, como polissacarídeos, lectinas, terpenoides e alcaloides, é de interesse para aplicações na área da saúde (Wang *et al.*, 2017).

Os polissacarídeos, biopolímeros compostos de monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas, são as moléculas de maior bioatividade encontradas em diversas espécies de cogumelos. Podem ser classificados em homopolissacarídeos ou heteropolissacarídeos, dependendo da composição monossacarídica. Na literatura, está descrito que essas moléculas têm atividade antitumoral, imunomodulatória, anti-inflamatória, antinociceptiva, antiviral, antioxidativa, hipoglicêmica e hepatoprotetora (Wang *et al.*, 2017; Chakraborty *et al.*, 2019).

A atividade imunomodulatória destas moléculas, que pode ser tanto imuno estimuladora quanto imunossupressora, ou mesmo imunoadjuvante, está associada com a diversidade estrutural da composição monossacarídica, grau de ramificação, propriedade reológica, peso molecular e conformação tridimensional da cadeia, fatores que propiciam grande diversidade funcional (Wang *et al.*, 2017; Chakraborty *et al.*, 2019; Maity *et al.*, 2021; Miao *et al.*, 2020; Ferreira *et al.*, 2015).

1.1. *Auricularia auricula*

Cogumelos da espécie *Auricularia*, pertencem a ordem *Auriculariales* e seu nome está associado ao formato do corpo frutífero, que lembra o formato de uma orelha, e é caracteristicamente gelatinoso (Figura 1). Nomes populares, como orelha de judeu e orelha de pau, são encontrados na literatura para descrevê-lo (Regis; Geösel, 2023).

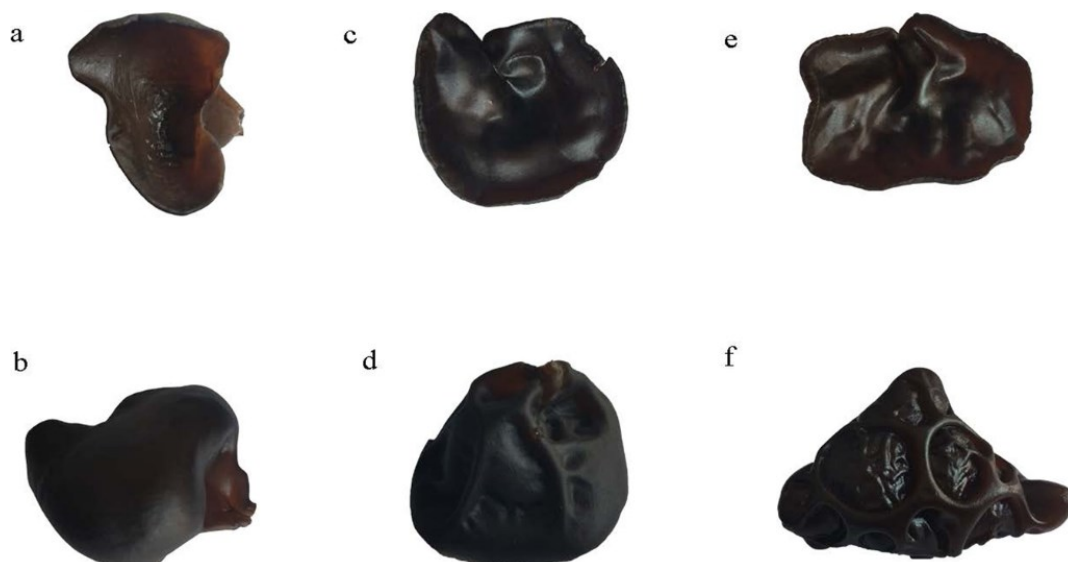


Figura 1. Morfologia do corpo frutífero de três variedades do cogumelo *Auricularia auricula*. Imagem de Zhao e colaboradores (2019).

O uso do cogumelo da espécie *Auricularia auricula* na medicina tradicional chinesa e como alimento funcional está consolidado. O cultivo da espécie está elencado como o terceiro de maior importância, sendo a China responsável pela maior parte deste (Zhao *et al.*, 2019). Esse basidiomiceto possui ciclo de vida haploide-diploide, de forma que o corpo de frutificação produz esporos, que germinam em hifas, as quais se fundem formando a estrutura que chamamos de micélio. Quase todas as espécies de *Auricularia* podem ser encontradas em regiões tropicais, subtropicais e temperadas (Zhao *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2021).

A espécie apresenta diversos compostos bioativos em sua composição, em que se destacam os polissacarídeos, proteínas, lipídeos, vitaminas e pigmentos (Yu *et al.*, 2023). A bioprospecção de polissacarídeos é importante para implementar essa tecnologia a favor da saúde. Regis, Geösel (2023), levantaram a hipótese de que os polissacarídeos obtidos de diferentes espécies de *Auricularia* atendem às demandas da Organização Mundial de Saúde (OMS) e podem ser úteis frente aos fatores de risco elencados, como má nutrição, obesidade e pressão alta (Regis; Geösel, 2023).

O corpo frutífero das espécies de *Auricularia* é fonte de diversos polissacarídeos, que representam a composição predominante do cogumelo. Já foi descrito que esses polissacarídeos possuem atividade antioxidante, antitumoral, hipoglicêmica, hepatoprotetora, anticoagulante,

imunomodulatória, anti hiperlipidêmica, efeitos radioprotetores e na redução de colesterol (Miao *et al.*, 2020; Regis; Geösel, 2023).

Em 1978, as primeiras β -D-glucanas do corpo de frutificação de *Auricularia auricula*, chamadas de “glucana solúvel em água I” e “glucana alcali-insolúvel II”, foram extraídas utilizando salina (0,9%) (Miao *et al.*, 2020). Entretanto, além do longo tempo de cultivo necessário para obtenção dessa estrutura macroscópica, o controle de qualidade do produto é difícil. A técnica de cultivo submerso fornece, então, um método alternativo de obtenção de polissacarídeos que propõe a redução de tempo de cultivo/fermentação e dos custos envolvidos, com um maior controle de qualidade e rendimento associados ao processo. Essa é uma perspectiva interessante para o mercado de glucanas, que movimentou \$479,51 milhões de dólares em 2020 (Zhang *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2006; Mordor Intelligence, 2022).

1.2. Resposta Imune e polissacarídeos

Polissacarídeos são moléculas com bioatividade descrita em contexto de imunomodulação, podendo ser classificados como imuno-estimuladores ou imunossuppressores. Muitos dos polissacarídeos extraídos de cogumelos mantiveram essa atividade e são capazes de estimular direta ou indiretamente o sistema imune (Chakraborty *et al.*, 2020; Ferreira *et al.*, 2015).

Devido a sua massa molecular, grau de solubilidade e conformação tridimensional, polissacarídeos interagem com as células do sistema imune por meio de diferentes receptores, como dectina-1 (específico para β -glucanas), receptores scavenger, receptor do complemento 3 (CR3) e receptores do tipo Toll (TLR-2, TLR-4). A ligação dos polissacarídeos a esses receptores desencadeia cascatas de sinalização intracelular que promovem os mecanismos efetores da resposta imune (Chakraborty *et al.*, 2020; Ferreira *et al.*, 2015) (Figura 2).

O receptor transmembrana Dectina-1 pertence ao grupo de receptores de lectina do tipo C e foi inicialmente descrito por Ariizumi e colaboradores (2000), embora sua capacidade de ligar β -glucanas tenha sido descrita posteriormente por Brown e Gordon (2001) (Ariizumi *et al.*, 2000; Brown; Gordon, 2001). Esse receptor se enquadra em um grupo de receptores de reconhecimento de padrões, que no contexto da resposta imune inata, reconhecem padrões

moleculares associados a patógenos ou ao dano (PAMP's e DAMP's) e ativam mecanismos efetores. Dectina-1 é o principal receptor associado à resposta antifúngica e está altamente expressa em tecidos como o pulmão e intestino. É capaz de reconhecer β -1,3-glucanas e β -1,6-glucanas, particuladas ou solúveis, que estão presentes principalmente na parede celular de fungos, mas também de bactérias e plantas. O reconhecimento ativa cascatas de sinalização intracelular de maneira independente de metais e íons, e ativa células de forma dependente ou independente de SYK (proteína tirosina quinase). A ativação de mecanismos fungicidas em células fagocíticas promove a fagocitose e morte fúngica em fagolisossomos bem como a produção de espécies reativas e produção de citocinas e quimiocinas, como TNF- α , IL-6, IL-2, IL-23, IL-10 e MIP-2 (Ariizumi et al., 2000; Brown; Gordon, 2001; Kimberg; Brown, 2008; Brown, 2005). As diferenças estruturais dos componentes presentes na parede celular em diferentes fungos propiciam uma maior ou menor exposição de moléculas, o que além de quebrar o paradigma de uma estrutura “rígida” e “imutável”, explicaria as diferentes respostas antifúngicas observadas nos hospedeiros (Cheng et al., 2011; Casadevall; Neil, 2022).

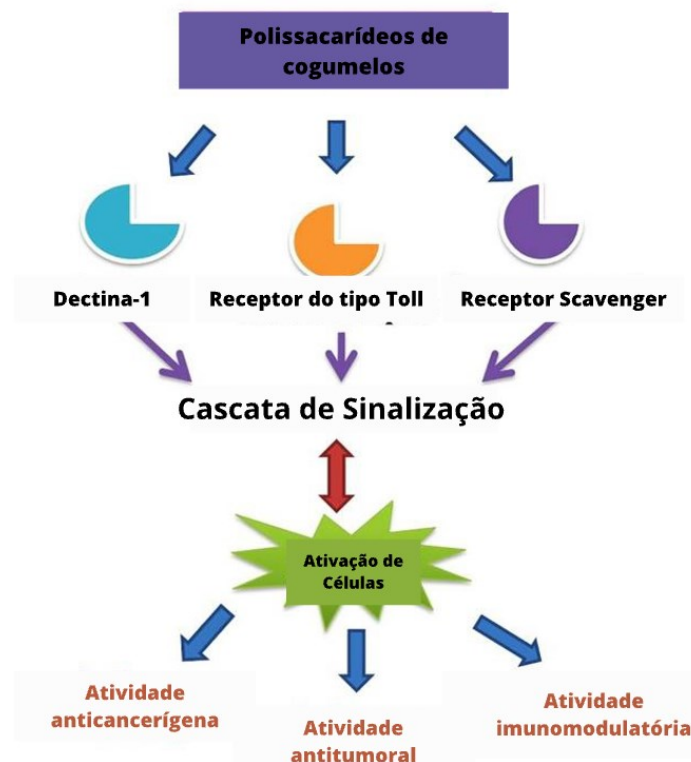


Figura 2. Conceitualização da atividade biológica de polissacarídeos de cogumelos. Imagem adaptada de Chakraborty e colaboradores (2020).

Em Basso e colaboradores (2019), a fração insolúvel de exopolissacarídeos obtidos de *Auricularia auricula* pela técnica de cultivo submerso apresenta atividade imunoestimulatória, como observado pelo aumento da produção das citocinas fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-10 (IL-10), tanto em macrófagos polarizados para um fenótipo do tipo M1 (Macrófago (GM-CSF) – pró-inflamatório) quanto para o fenótipo M2 (Macrófago (LCCM) - regulatório) (Figura 3 A e B) (Basso *et al.*, 2019).

De forma indireta, os polissacarídeos podem modular o microbioma do hospedeiro e favorecer ou inibir o crescimento de diferentes populações de microrganismos, que podem produzir moléculas regulatórias como ácidos graxos de cadeia curta (SCFA - *short chain fatty acids*) como acetato, butirato e propionato. Muitos desses polissacarídeos não são digeríveis por enzimas humanas e são direcionados para o trato gastrointestinal (TGI), onde são fermentados por bactérias residentes no cólon e no ceco. Os mecanismos de ação desses metabólitos compreendem tanto a ativação de vias de sinalização e transcrição gênica quanto a redução do pH intestinal, que inibe o crescimento de populações patogênicas de bactérias gram-negativas (Tang *et al.*, 2019; Jayachandran *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2020; Kong *et al.*, 2020).

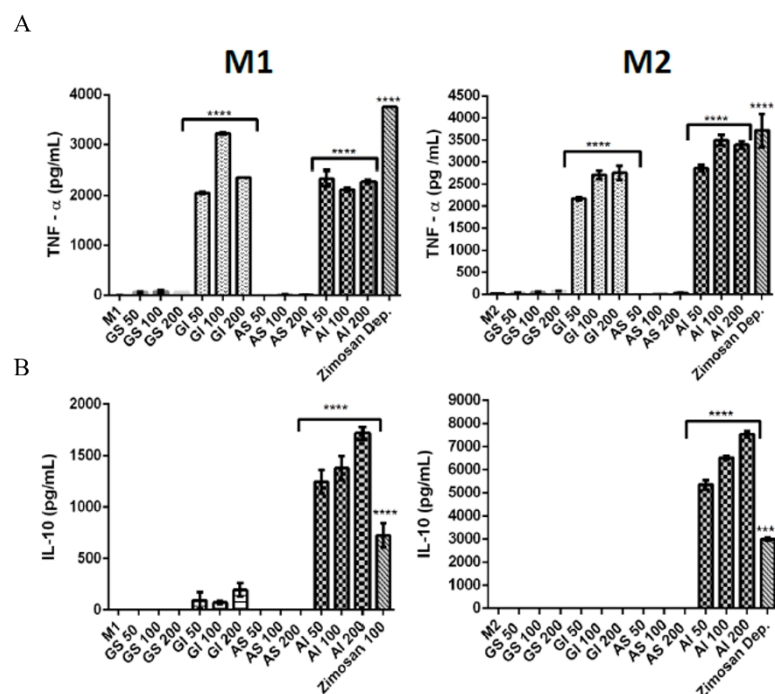


Figura 3. Produção de citocinas após estímulos com exopolissacarídeos de *A. auricula* e *G. lucidum*. Sobrenadante do cultivo celular avaliado após 24 horas de estímulo. GS – *Ganoderma lucidum* Solúvel, GI – *Ganoderma lucidum* insolúvel; AS – *Auricularia auricula* Solúvel, AI – *Auricularia auricula* insolúvel; concentrações de 50 a 200 μ g/mL para todas as frações testadas. M1 – Macrófagos classicamente ativados; M2 Macrófagos alternativamente ativados; Zymosan Dep. – Zymosan. Imagem e legenda adaptadas de Basso (2017).

2. Objetivo

O Objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade dos polissacarídeos produzidos pelo *A. auricula*, em modular a resposta imune inata do hospedeiro quando administrado pela via oral.

2.1. Objetivos específicos

- 1- Análise da atividade *in situ* do polissacarídeo secretado em modelo experimental de colite induzido pelo DSS – Capítulo I
- 2- Análise dos polissacarídeos produzidos pelo macrofungo quando extraído do micélio ou estimulados a sua secreção – Capítulo II
- 3- Análise da atividade do polissacarídeo extraído do micélio em modelo experimental de infecção com o *Cryptococcus neoformans* – Capítulo III
- 4- Análise da atividade *in vitro* do polissacarídeo extraído dos micélios – Capítulo IV

3. Capítulo I – Avaliação de exopolissacarídeos de *Auricularia auricula* no modelo murino de colite induzido por DSS

Os microrganismos apresentam um importante papel de mutualismo com os demais organismos vivos, incluindo os animais. Desde o nascimento, os animais estabelecem uma relação com os microrganismos formando um ecossistema chamado de microbioma, que compreende uma microbiota que varia entre indivíduos, mas que mantém algumas características importantes para manutenção da homeostase. Microrganismos podem se estabelecer em diferentes locais do corpo como a pele, a cavidade oral, o trato urogenital e nos intestinos, formando populações chamadas de microbiota. Pelo menos 90% da microbiota intestinal é composta por 90% bactérias dos filos *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* e *Actinobacteria*. Entretanto, a microbiota não compreende apenas bactérias, mas também fungos, vírus e archaeas (Shen, 2017; Tang *et al.*, 2019; Zakerska-Banaszak *et al.*, 2021).

Situações de disbiose podem acontecer por diversos fatores internos ou externos, como alterações na dieta, no ambiente ou pelo uso de antibióticos. Esse desbalanço pode ocasionar o desenvolvimento de doenças inflamatórias e metabólicas, como obesidade, doenças cardiometabólicas, câncer e doenças inflamatórias intestinais, ou mesmo infecciosas (Tang *et al.*, 2019; Törös *et al.*, 2023; Zhao *et al.*, 2023).

Dentre as doenças inflamatórias intestinais, destaca-se a colite ulcerativa. Acredita-se que a causa desta doença esteja relacionada com um processo de disbiose intestinal, que pode aumentar a translocação bacteriana e desequilibrar a imunidade da mucosa, resultando na inflamação intestinal crônica. Essa inflamação é mediada pela ativação de células apresentadoras de antígenos (células dendríticas e macrófagos) e pela indução de uma resposta de células Th1, com a produção aumentada de interferon gama (IFN- γ) e TNF- α e resposta de células Th17, produtoras de IL-17. Também é observada uma redução de células T regulatórias, o que ocasiona uma resposta pró-inflamatória com dano tecidual (Shen *et al.*, 2018; Tang *et al.*, 2019; Sommer *et al.*, 2017).

Apesar de sua descrição no reconhecimento de fungos e ativação de mecanismos efetores da resposta imune inata, o papel do receptor dectina-1 em modelos de colite é

controverso na literatura. Em Iliev e colaboradores (2012) é descrito um papel protetor deste receptor, visto que camundongos *Knock-out* para ele são mais suscetíveis ao desenvolvimento de colite. A ausência do receptor pode impactar a resposta antifúngica e permitir o crescimento de fungos patogênicos oportunistas, como *Candida tropicalis*, que podem participar desse processo inflamatório. Entretanto, a administração de antifúngicos em modelo murino de colite induzida por DSS pode, também, exacerbar a colite e alterar a microbiota. Já em Tang e colaboradores (2015), esses animais são resistentes e refratários ao desenvolvimento da doença. Nesse caso, a regulação do processo inflamatório ocasiona a redução de peptídeos antimicrobianos no tecido (S100a8 e S100a9) e favorece o crescimento de *Lactobacillus murinus*, o que favoreceu a população de células T regulatórias e o controle do processo infeccioso. Essa dualidade pode ser resultado de alterações da microbiota, que pode ser um fator determinante do perfil protetor ou suscetível em modelo de inflamação intestinal (Iliev et al., 2012; Tang et al., 2015; Santus et al., 2021; Wang et al., 2022).

O uso de polissacarídeos prebióticos é preconizado na literatura em modelos de colite induzida por DSS, pela promoção de um perfil tolerogênico com a produção de IL-10. Esta citocina regulatória é importante mediadora do processo de proteção em modelo de colite induzida por DSS, sendo, portanto, um alvo de pesquisa para avaliar seu potencial terapêutico (Tang et al., 2019; Cardoso et al., 2018). Avaliamos, então, qual o efeito do tratamento com exopolissacarídeos obtidos do cultivo submerso de *Auricularia auricula* em um modelo experimental de colite induzida por DSS.

3.1. Materiais e Métodos

Obtenção e caracterização dos polissacarídeos do cogumelo *Auricularia auricula* a partir do conteúdo exsudado em cultivo submerso. Avaliação da atividade desses polissacarídeos em modelo de desenvolvimento de colite experimental.

3.1.1. Cultivo de *Auricularia auricula*

O basidiomiceto *Auricularia auricula* (cc 309) foi obtido no Banco de Germoplasma de Cogumelos para Uso Humano da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Unidade Recursos Genéticos e Biotecnologia - Cenargen, sob coordenação da Dra. Arailde Fontes Urben. O termo de autorização de acesso de patrimônio genético (número 010342/2014-

1) foi concedido pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

O cogumelo foi cultivado em placas de petri contendo meio Caldo Batata Dextrose (Acumedia, ref. 7585A) preparado conforme as especificações do fabricante (24 gramas de meio liofilizado para o preparo de 1 litro) e 10% de ágarn (Kasvi, ref. K25-611001). As placas foram inoculadas com 3 fragmentos de 1 cm², oriundos de uma placa original e incubadas à 25 °C por 7 dias ou até o micélio cobrir toda área da placa (Figura 4). Após a confluência do micélio, as placas foram armazenadas a 4 °C.



Figura 4. Cultivo de *A. auricula* em placa de petri contendo meio Batata Dextrose Ágar. Imagem do arquivo pessoal.

Para obtenção dos polissacarídeos, foi empregada a metodologia de cultivo submerso, com o preparo de um pré-inóculo com 5 fragmentos de 1 cm² do micélio para um frasco Erlenmeyer contendo 100 mL de meio Batata Dextrose e 270 µL de ácido láctico (concentração 10,6°) (Sigma-Aldrich, L1250). O cultivo foi acondicionado no escuro por 7 a 10 dias, à 30 °C sob agitação de 120 a 130 rpm. Após esse período, o pré-inóculo foi transferido para um frasco Erlenmeyer contendo 500 ml de meio batata dextrose e cultivado por 7 a 10 dias nas mesmas condições (Figura 5).

Após a confluência do cultivo submerso, em torno do décimo dia, o micélio foi separado do meio de cultivo, centrifugado a 5000 rpm, 4 °C por 12 minutos. O sobrenadante foi descartado e o micélio foi submetido a três lavagens com água milliQ estéril. Após a última lavagem, o conteúdo foi vertido em um frasco Erlenmeyer com 500 mL de água milliQ estéril

e foi acondicionado novamente na incubadora nas mesmas condições descritas para o crescimento, por 24 horas.



Figura 5. Cultivo submerso de *A. auricula* em meio Batata Dextrose líquido. Imagem do arquivo pessoal.

Ao final desse período, o micélio passou novamente pela etapa de centrifugação, o sobrenadante foi guardado e o micélio foi descartado. O sobrenadante foi congelado a -80°C e liofilizado. O conteúdo liofilizado foi ressuspendido em água milliQ e homogeneizado em sonicador de ponteira (30% de amplitude por 9 minutos). Em seguida, foi centrifugado a 10000 xg, por 10 minutos. Para este trabalho, consideramos que o sobrenadante continha a fração solúvel e que o conteúdo depositado como corpo de fundo após a etapa de centrifugação era a fração insolúvel, o exopolissacarídeo que utilizamos para os experimentos deste trabalho.

3.1.2. Quantificação de polissacarídeo do excretado por método colorimétrico

A quantificação relativa de polissacarídeos obtidos a partir do exsudado do cultivo do basidiomiceto foi feita com base no protocolo da Curva de Fenol Sulfúrico (DuBois *et al.*, 1956). Para essa reação colorimétrica, adicionamos 50 μL da amostra à 500 μL de fenol 4% e 2,5 mL de ácido sulfúrico. As amostras foram homogeneizadas e a absorbância foi obtida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 490 nm. Para definição da concentração, os valores obtidos foram comparados com uma curva padrão de glicose.

3.1.3. Animais

Para os ensaios *in vivo* e *ex vivo* utilizou-se camundongos *Mus musculus* c57BL/6J e Dectina-1 *Knockout*, machos e fêmeas, com 8-12 semanas de idade. Estes permaneceram

durante o período experimental no biotério do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade de Brasília, em racks ventilados com bebida e comida *ad libitum*. O uso destes animais foi previsto no projeto de Protocolo nº 18/2019 aprovado na Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília (Anexo I).

Antes do início do procedimento experimental, os animais foram separados nos respectivos grupos experimentais e acondicionados em caixas específicas para estantes com ventilação micro isolada.

3.1.4. Indução de colite

Para avaliação de um processo inflamatório tecidual, utilizamos o modelo de indução de colite por Dextran Sulfato de Sódio (DSS) (Sigma-Aldrich, ref. 42867) na concentração de 2% (Chassaing *et al.*, 2014), em que a solução foi oferecida aos camundongos por 5 dias.

Cada animal recebeu 100 µg do polissacarídeo em um volume de 100 µL por gavagem como tratamento por 5 dias no grupo controle do tratamento e por 8 dias no grupo da colite experimental, sendo o tratamento iniciado 3 dias antes do início da administração de DSS e continuado nos 5 últimos dias de administração de DSS. Durante o período experimental, fezes foram coletadas e congeladas a -80 °C. No décimo primeiro dia, os animais foram anestesiados para coleta de sangue e, em seguida, eutanasiados (Figura 6).

Em ambiente estéril, tiveram seu intestino e conteúdo fecal recolhidos para análise de sequenciamento realizada pelo Dr. Christian Hoffmann (Anexo II). O intestino dos camundongos foi retirado completamente e fizemos um corte para avaliar o comprimento do ceco ao reto. Para análise, utilizamos fotografia comparativa com padrão de medida e analisamos o comprimento utilizando o software ImageJ 1.53t.

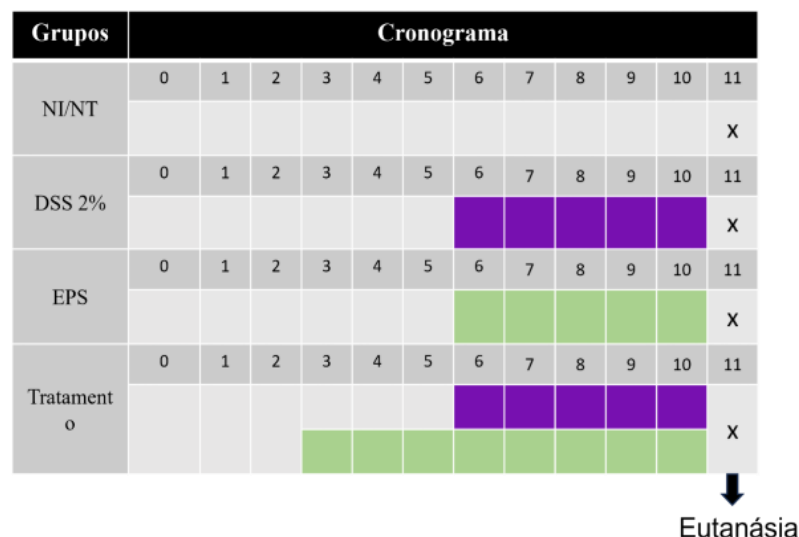


Figura 6. Cronograma do modelo experimental *in vivo* de colite induzida por DSS 2%. O período experimental foi delimitado em 12 dias. A indicação em verde representa o tratamento com o exopolissacarídeo (EPS) via gavagem. Em roxo, está indicado o período em que os camundongos receberam a solução de DSS 2%.

3.1.5. Produção de citocinas

A quantificação de citocinas foi feita pela técnica ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), usando os kits específicos da marca Invitrogen, seguindo as instruções do fabricante. Como marcador inflamatório, quantificamos a citocina TNF- α (Invitrogen, ref. 88-7324) no tecido intestinal (porção do cólon) e no soro dos camundongos.

3.1.6. Histopatológico

O material biológico (cólon) coletado para análise histopatológica foi acondicionado em cassetes previamente etiquetados e armazenados em solução de formaldeído tamponado (10%) até o processamento das amostras. Os tecidos foram processados e acondicionados em blocos de parafina, que foram cortados para o preparo das lâminas de corte histológico.

As lâminas para análise histopatológica foram coradas com Hematoxilina-Eosina (HE) e foram escaneadas no equipamento Aperio Scanner CS2 (Leica Biosystems) e as imagens adquiridas foram analisadas no software Aperio ImageScope x64.

3.1.7. Análise estatística

Todos os resultados quantitativos desta parte do trabalho foram analisados com desvio padrão (SD) da triplicata biológica feita de um dos experimentos independentes, de um total de duas análises técnicas. Para avaliar estatisticamente diferenças entre grupos experimentais a análise da variância (One-way ANOVA), foram utilizados pelo *software GraphPad Prism* (versão 8.0). Os dados foram considerados significantes quando $p < 0,05$.

3.2. Resultados e Discussão

3.2.4. Comprimento do intestino em modelo experimental de colite não altera após tratamento com exopolissacarídeo

No modelo de indução de colite, os camundongos selecionados foram expostos à solução de DSS 2% por 5 dias em seu bebedouro. Os grupos de tratamento foram divididos entre aqueles que receberam somente o tratamento com o exopolissacarídeo, via gavagem, e o grupo que começou a ser tratado três dias antes da exposição ao DSS 2% e permaneceu sendo tratado ao longo do período experimental.

No décimo primeiro dia, os animais foram eutanasiados, após a coleta de sangue total, e os intestinos foram dissecados para análise de comprimento. Podemos observar no gráfico comparativo de tamanho (Figura 7) que, conforme o esperado, o grupo experimental de controle do desenvolvimento de colite apresentou uma redução do comprimento intestinal após a ingestão da solução de DSS 2%.

O encurtamento do cólon causada pela inflamação é um dos sinais clínicos da colite. Observamos esse encurtamento tanto para camundongos Wt quanto camundongos *Knock-out* para Dectina-1, bem como a recuperação do comprimento no grupo que recebeu o tratamento com o exopolissacarídeo. Na análise de sequenciamento realizada pelo dr. Christian Hoffmann, também foi possível observar diferenças na abundância de populações bacterianas entre os grupos tratados em ambos os genótipos, embora as análises para determinar quais foram os gêneros modulados ainda esteja em andamento (Anexo II). Em Tang e colaboradores (2015), mostra-se que camundongos que não possuem o receptor Dectina-1 são refratários ao desenvolvimento de colite induzida por DSS (2 e 4%) pela expansão de uma população de células T regulatórias bem como pela diferente composição da microbiota. Neste artigo, o bloqueio do receptor Dectina-1 com seu antagonista, laminarina, suprimiu a ativação de uma

resposta inflamatória e favoreceu o crescimento de populações de *Lactobacillus murinus*, mostrando que a administração de polissacarídeos antagonistas pode atenuar a sinalização do receptor e proporcionar um ambiente regulatório.

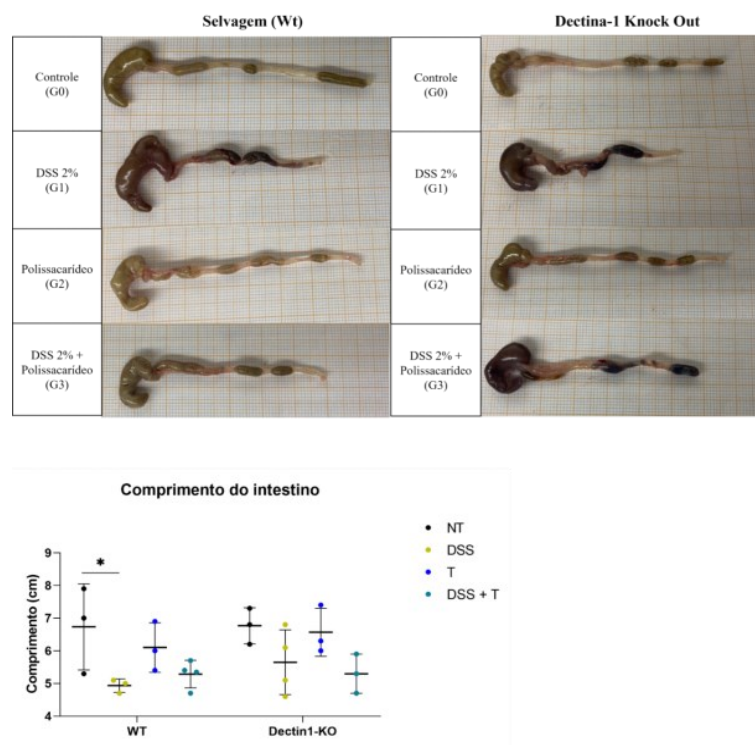


Figura 7. Análise do tamanho do intestino (corte do ceco ao reto) de camundongos c57BL/6J, selvagem e Dectina-1 Knock-out, em modelo experimental de colite. O gráfico representa o comprimento, avaliado em papel milimetrado, do intestino em centímetros (cm).

3.2.2. Produção da citocina TNF- α no tecido intestinal aumentou com o tratamento

Para avaliar se o modelo de colite induziu uma resposta inflamatória, avaliamos os níveis da citocina TNF- α no macerado intestinal e no soro dos camundongos. Podemos observar que, para os camundongos de fenótipo selvagem, o tratamento com o EPS promoveu maior produção da citocina no intestino, sendo maior no grupo experimental do modelo de colite tratado com o EPS (Figura 8A). Esse aumento não é observado nos camundongos de genótipo Dectina-1 *Knock-out*, indicando que o tratamento necessita da ativação do receptor para produção de citocinas inflamatórias (Figura 8C).

Esses resultados corroboram com o proposto por Tang e colaboradores (2019), que mostra no modelo de colite uma polarização inflamatória de aumento de produção de TNF- α

provocado pelo dano tecidual causado na situação de disbiose. É necessário a avaliação de outros painéis de citocinas para definir se, apesar de não observarmos o aumento de TNF- α , outras citocinas envolvidas da patologia e regulação da colite foram moduladas com o tratamento.

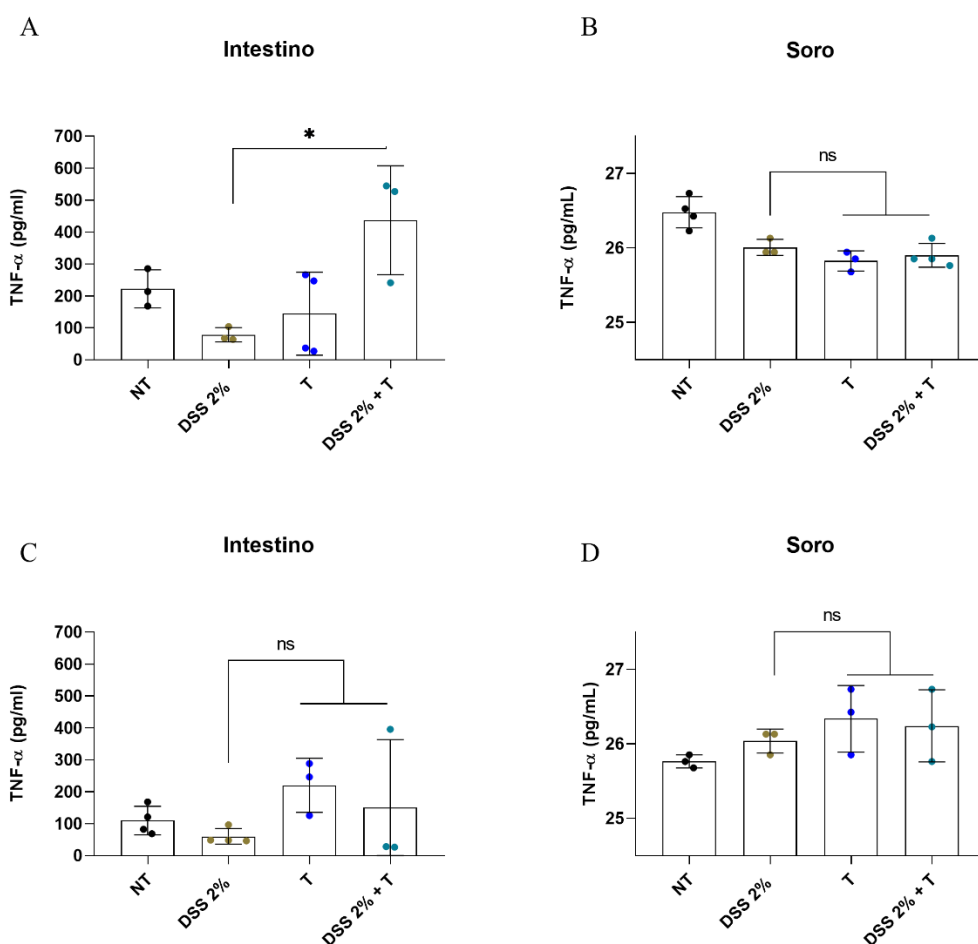


Figura 8. Quantificação da citocina TNF- α no intestino e no soro de camundongos em modelo experimental de colite. (A-B) Produção da citocina no intestino e soro, respectivamente de camundongos de genótipo selvagem (Wt); (C-D) Produção da citocina no intestino e soro, respectivamente de camundongos de genótipo Dectina-1 Knock-out. Análise estatística One-way ANOVA compara grupos do modelo com o controle do modelo de colite. p significativo quando < 0,05

3.2.3. Histopatológico

A colite ulcerativa é uma doença inflamatória crônica caracterizada pela inflamação tecidual. Na análise do corte histopatológico, é possível observar infiltrados inflamatórios nos grupos experimentais que receberam somente DSS 2% e no grupo que recebeu DSS 2% associado ao tratamento com o exopolissacarídeo, embora menos aparente. O corte do grupo

que recebeu apenas a solução de exopolissacarídeo não mostra evidências de uma inflamação tecidual (Figura 9). Este dado confirma dados prévios do nosso grupo de pesquisa utilizando polissacarídeos de outro macrofungo pelo mesmo método de obtenção.

O uso de polissacarídeos naturais em modelos de inflamação intestinal já foi descrito na literatura, mostrando a importância deles não só na modulação do microbioma, mas também na manutenção estrutural do tecido. Proteínas de junção, como ocludina, claudina-1 e proteínas da zona de oclusão (ZO-1), são responsáveis pela manutenção da estrutura do epitélio intestinal e alterações na sua expressão podem estar associadas com o dano da barreira bem como da sua restauração. Kong e colaboradores (2020) mostraram que a atividade de um polissacarídeo obtido de *A. auricula* aumentou os níveis transcricionais dessas proteínas, sugerindo que a administração do polissacarídeo melhorou a barreira intestinal (Kong et al., 2020). Em Sauruk da Silva e colaboradores (2021) foi demonstrado como um polissacarídeo marinho obtido da tinta de lula em um modelo de inflamação intestinal promoveu o aumento a nível transcricional e proteico dessas proteínas de junção. Já em Han e colaboradores (2020), análises imuno-histoquímicas mostraram não somente o aumento dessas proteínas com o tratamento, mas também observaram uma redução na inflamação tecidual em modelo de colite induzida por DSS (Sauruk da Silva et al., 2021; Han et al., 2020).

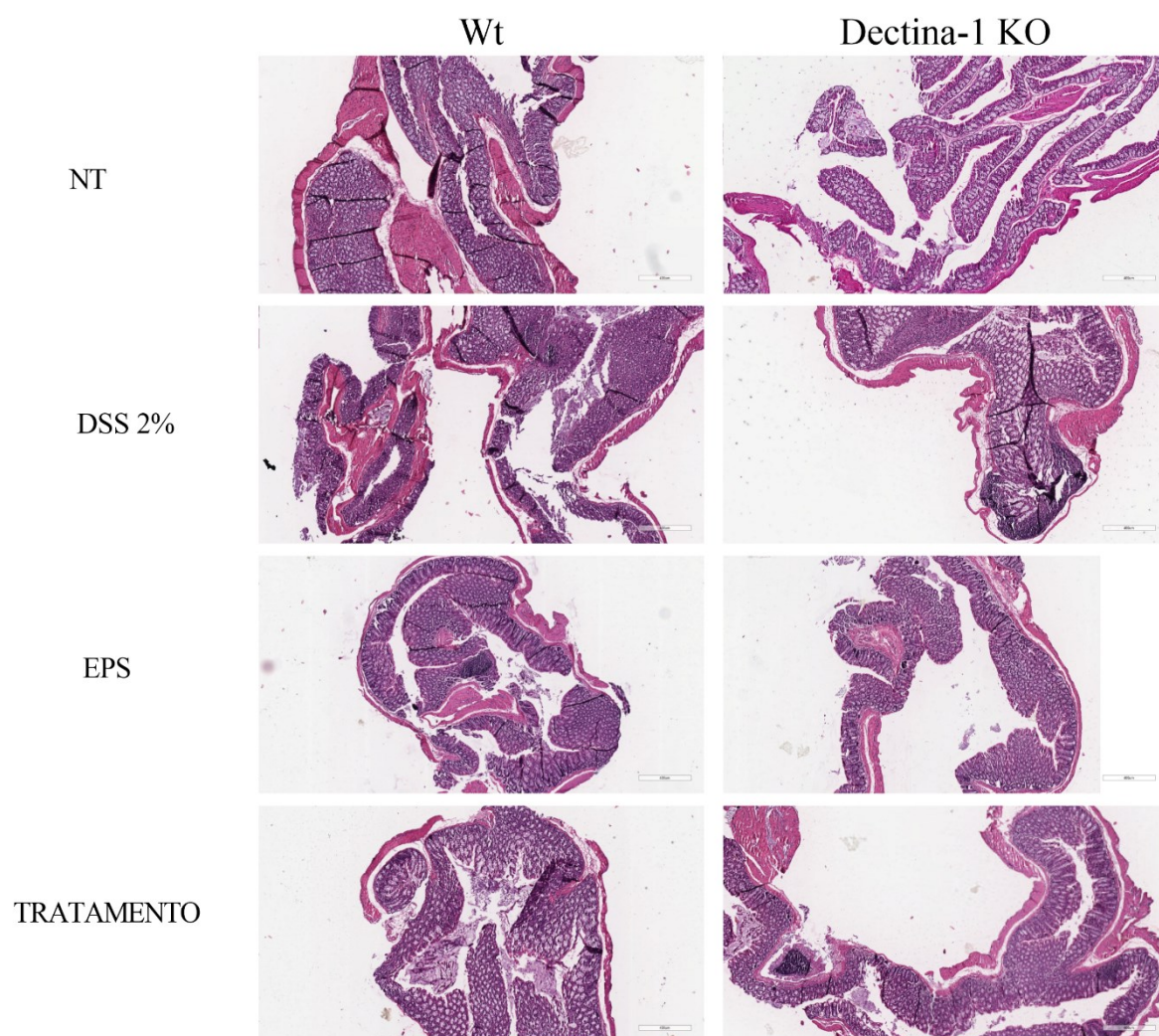


Figura 9. Corte histopatológico do tecido intestinal de camundongos c57BL/6J de genótipo selvagem e Knock-out para Dectina-1 em modelo experimental de colite induzida por DSS. Os cortes de histopatológico foram corados com hematoxilina-eosina (HE) e as imagens foram analisadas no programa ImageScope x64 nos aumentos de 5x.

4. Capítulo II – Otimização da extração e caracterização de polissacarídeos do micélio de *Auricularia auricula*

Por causa da diversa bioatividade de polissacarídeos, é necessária a otimização de métodos de extração e purificação, bem como a caracterização dos produtos de cada processo. A metodologia de extração aquosa é uma das mais utilizadas devido à facilidade de execução em termos técnicos e financeiros (Chen et al., 2020).

Poucos estudos comparam diferentes métodos de extração e a atividade dos polissacarídeos obtidos. Em Habijaníc e colaboradores (2015) são demonstradas a obtenção de cinco frações a partir do cultivo submerso de *Ganoderma lucidum*, um macrofungo cujos polissacarídeos possuem importância imunomodulatória. Essas frações, obtidas com diferentes graus de pureza, foram avaliadas quanto a produção de citocinas associadas à resposta imune inata em células mononucleares de sangue periférico (PBMC's) e observou-se que polissacarídeos obtidos da extração da parede promovem o aumento da produção de TNF- α por estas células e que essa produção estava associada ao grau de pureza obtido no processo (Habijaníc et al., 2015).

4.1. Materiais e Métodos

4.1.1. Padronização da obtenção de polissacarídeos da parede celular

Para otimizar a obtenção de polissacarídeos, procuramos na literatura diferentes métodos e protocolos para extração. Em Habijaníc e colaboradores (2015) são descritas diferentes metodologias para extração e purificação do polissacarídeo a partir do cultivo submerso. Seguindo as etapas para obtenção das frações A e B do artigo com modificações, iniciamos o processo com a filtração a vácuo do cultivo, separando a massa de micélios do meio de cultura (Habijaníc et al., 2015).

O meio de cultura filtrado foi concentrado à 100°C para um volume final de 100 mL. Esse concentrado foi precipitado com etanol 96% (3:1 v/v) à 4°C por 12 horas. O material precipitado foi centrifugado por 30 minutos, 9000 rpm à 4°C. O sobrenadante foi descartado e o material foi lavado com acetona P.A. e então, concentrado à vácuo para o preparo da análise.

Os micélios separados na filtração à vácuo inicial foram lavados com metanol (temperatura ambiente, 2-3 horas) para remover componentes de baixo peso molecular. Após essa etapa, foram novamente filtrados e então foram submetidos à extração aquosa por 6 horas à 100 °C. Os polissacarídeos extraídos, presentes no sobrenadante, foram precipitados com etanol 96% (3:1 v/v) por doze horas à 4°C, centrifugados a 9000 rpm e lavados com acetona P.A. (Vetec, cód. 187). Após a lavagem, o material foi ressuscitado em água deionizada e liofilizado, antes de prosseguir para os demais ensaios de caracterização e atividade biológica (Figura 10).

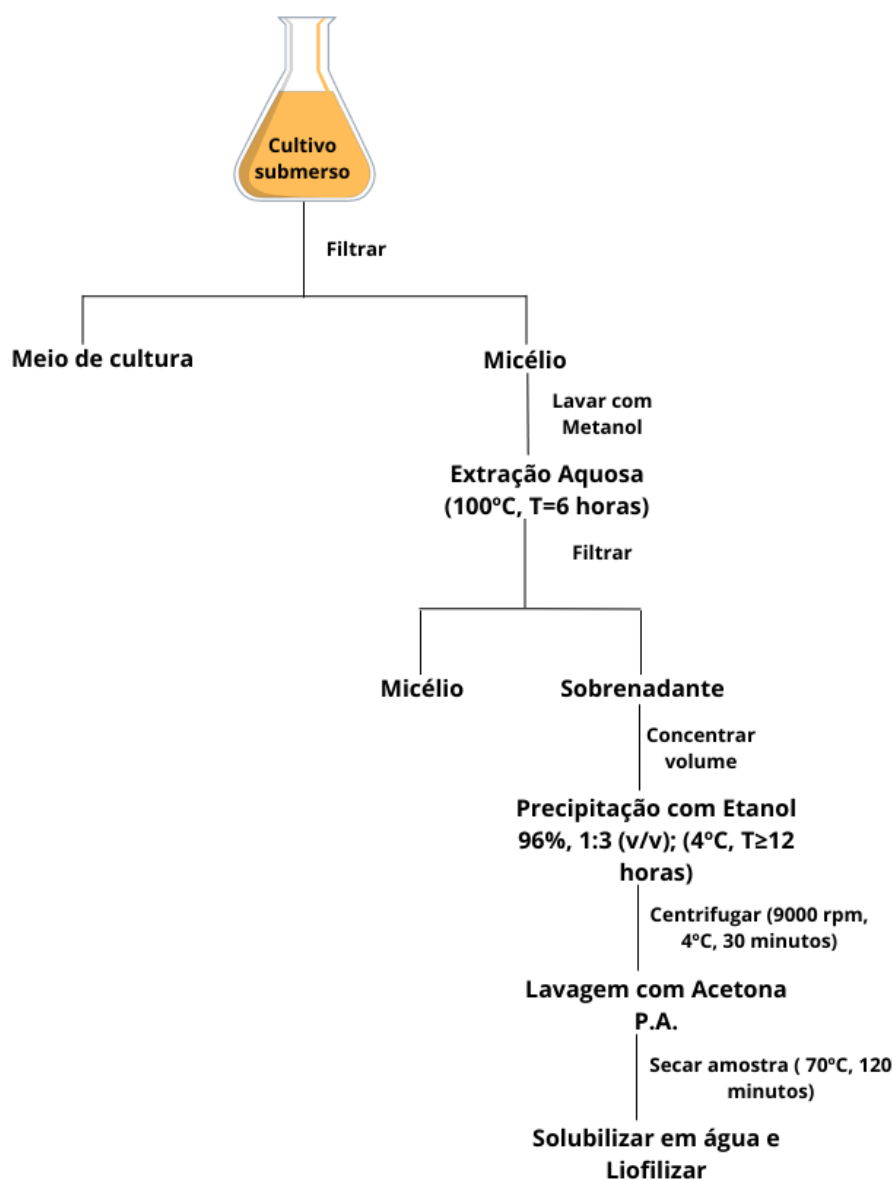


Figura 10. Fluxograma da metodologia proposta de obtenção de polissacarídeos a partir do cultivo submerso de *Auricularia auricula*. A metodologia de extração aquosa descrita se baseia em Habijan et al. (2015), com adaptações.

4.1.2. Análise de composição monossacarídica (GC-MS)

Os procedimentos de acetilação e metilação das amostras para cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) foram realizados no Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal de Catalão, com auxílio da Dr.^a Maria Carolina B. Di Medeiros Leal e da Dr.^a Elaine Carbonero.

Para análise de composição monossacarídica, o polissacarídeo foi acetilado em um processo de derivatização química. Na primeira etapa da hidrólise ácida, adicionamos 200 μL de ácido trifluoroacético (2 M) a 3 mg da amostra em um tubo do tipo Pyrex e deixamos o material na estufa à 100 °C por 6 horas. Após retirar o tubo da estufa, deixamos esfriar a temperatura ambiente.

Quando a temperatura equilibrou, iniciamos o processo de redução com a adição de borohidreto de sódio (NaBH_4) e 200 μL de água destilada até que a amostra estivesse com pH 9 e deixamos o material reduzindo por aproximadamente 12 horas (*overnight*).

Para neutralização do material, utilizamos uma resina catiônica ácida para obtenção de um pH 6-7, transferimos o conteúdo líquido para outro tubo com auxílio de uma pipeta Pasteur de vidro e, então, utilizamos uma bomba à vácuo para secagem da amostra.

Após a etapa de secagem, adicionamos metanol ao tubo para remover o excesso de borohidreto de metila na forma de borato de metila, em 5 etapas consecutivas de adição do álcool seguidas de secagem da amostra. Para a acetilação, foi adicionado 500 μL proporcionalmente de anidrido acético e piridina (1:1, v/v), e deixamos a amostra reagindo por 12 horas à temperatura ambiente. Para extração dos derivados acetilados adicionamos 1 mL de clorofórmio e removemos a piridina pela adição de uma solução de sulfato de cobre (5%), seguida da adição de água destilada. O material foi filtrado com auxílio de algodão e secou a temperatura ambiente.

4.1.3. Determinação de homogeneidade e massa molar polimérica (MM)

A homogeneidade e massa molar da fração polissacarídica parcialmente purificada, foram determinadas por cromatografia de exclusão de alta performance (HPSEC), utilizando sistema de detecção por índice de refração, frequência na região do ultravioleta e espalhamento de luz (Agilent 1260 Infinity II Multi GPC-SEC).

A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna de exclusão molecular Agilent PL Aquagel-OH Mixed-H (300 x 7,5 mm, 8 μm), a temperatura constante de 30 °C. O volume de injeção foi de 100 μL . A fase móvel foi de 0,1 M de NaNO_2 com 0,2 g.L^{-1} de azida de sódio, em um fluxo de 1,0 mL.min^{-1} . As amostras foram solubilizadas na solução eluente (1 mg.mL^{-1}) e filtradas em membrana com poros de 0,22 μm . A massa molar foi calculada utilizando curva

de calibração obtida com padrões de dextrana. Todos os dados foram adquiridos usando o software Agilent GPC/SEC (Agilent Technologies, Cheshire, United Kingdom).

4.1.4. Quantificação e caracterização de polissacarídeos da parede celular de *Auricularia auricula* por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Para a análise de caracterização qualitativa por Ressonância Magnética Nuclear (RMN), foi pesada em balança analítica 12,76 mg do polissacarídeo obtido como descrito anteriormente. Esse polissacarídeo foi solubilizado em 500 μ L de DMSO- d_6 (Dimetilsulfóxido hexadeuterado, 99,9%; Sigma, ref. 151874) e sua homogeneização foi realizada em etapas de aquecimento e agitação da amostra, até completa solubilização.

Os experimentos de Ressonância Magnética Nuclear foram adquiridos em um equipamento de 11.7 Tesla (500 MHz para frequência de hidrogênio), usando temperatura de 343K, TMS como padrão de referência interna, em uma sonda de detecção inversa.

Para os espectros de próton com pré-saturação do sinal da água usando ondas contínuas, os parâmetros foram, tempo de aquisição (AQ = 0.9175040s), janela de varredura (SWH = 35714.285 Hz), tempo de relaxação (d1 = 1s), tempo de pulso de 90° (p1 = 15 μ s) e número de scans (ns = 64).

Para os experimentos de ^{13}C , os parâmetros foram, tempo de aquisição (AQ = 0.52s) janela de varredura (SWH = 31250 Hz), tempo de relaxação (d1 = 0.1s), tempo de pulso de 90° (p1 = 9.5 μ s) e número de scans (ns = 4K). O experimento 2D homonuclear (COSY), as correlações foram determinadas utilizando os mesmos parâmetros de aquisição do espectro de próton, com número de scans (ns=48).

Para todas as correlações heteronucleares (HSQC-edit, HSQC-TOCSY and HMBC-long range) o SWH em F1 foi de 35713.387 Hz e o SWH em F2 foi de 6009.615 Hz, d1 = 1.5s e o número de experimentos em F1= 64, AQ in F2 = 0.085s foram utilizados. O tempo de mistura (d8 = 10 ms para HSQC-TOCSY).

Os experimentos de RMN quantitativos foram realizados no espectrômetro Bruker Avance III 11,7 – Tesla (500 MHz para frequência do ^1H), empregando a sequência de pulso “zgpr” com supressão de sinal da água nos experimentos de ^1H . O perfil de excitação foi determinado

com os mesmos parâmetros experimentais empregados, tempo de relaxação ($d1 = 25s$), um tempo de aquisição ($AQ = 4,089s$), uma janela espectral ($sw = 18,0305 \text{ ppm}$), pulso de 90° ($12,025 \mu s$), um ganho de receptor ($rg = 64$) e um número de promediações ($ns = 8$). Para a verificação do teor de carboidratos, empregou-se um padrão interno de pureza conhecida (ácido maleico-TraceCERT[®]) e, a partir da razão da área da linha de ressonância correspondente ao padrão interno e da área do carbono anomérico do analito, efetuou-se o cálculo de quantificação relativa. Todos os dados foram processados no software Topspin e analisados pela dra. Maria Carolina B. Di Medeiros Leal.

4.2. Resultados e Discussão

A estratégia de extração e purificação de uma fração polissacarídica, de parede do fungo *A. auricula*, enriquecida com glucanas foi otimizada a partir da metodologia proposta em Habijan et al. (2015) com modificações, visando o aumento do rendimento, uma vez que o conteúdo desse biopolímero em parede varia entre 3,1% e 46,5% em constituição (Habijan et al., 2015; Mironczuk-Chodakowska et al., 2021).

A metodologia utilizada em nosso grupo de pesquisa, descrita no capítulo anterior, obtinha polissacarídeos a partir do conteúdo excretado no cultivo submerso do cogumelo, cuja composição monossacarídica pode ser observada em Basso (2019), com rendimento total de carboidratos atingindo em média 10%.

Em decorrência do baixo rendimento dos polissacarídeos secretados no meio de cultura, foi empregada uma metodologia de extração simplificada, a partir dos micélios (massa seca) e obtivemos um conteúdo polissacarídico com alto grau de pureza de carboidratos, como pode ser observado no espectro de carbono 13 da amostra (figura 11), com rendimento de 30% de resíduos em configuração β .

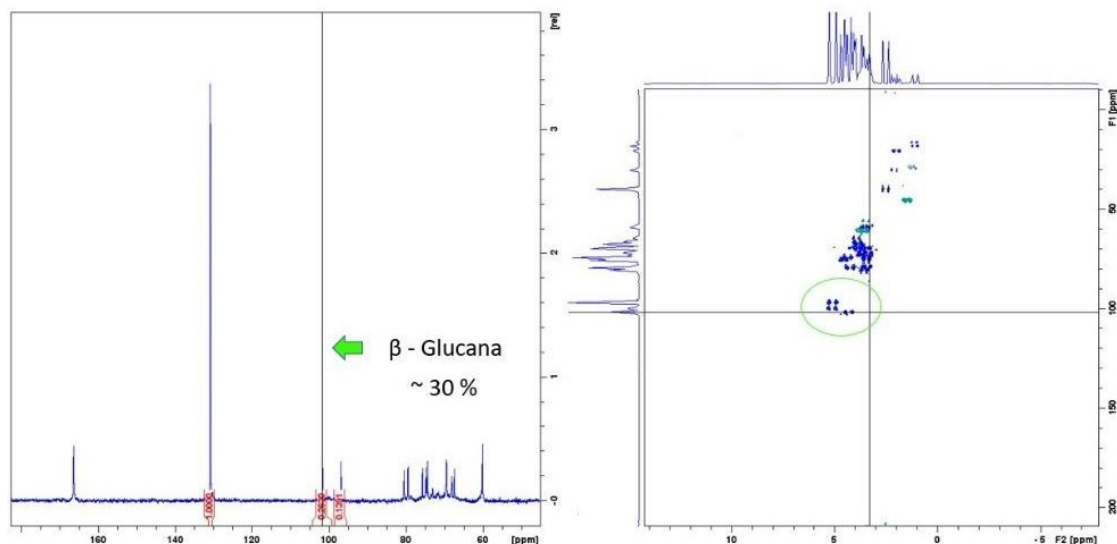


Figura 11. Espectro de ^{13}C quantitativo da amostra de conteúdo polissacarídico extraído de micélio de *Auricularia auricula* (esquerda). Mapa de correlação HSQC não desacoplado, elucidado na discussão da figura 16 (direita).

A partir da confirmação analítica de pureza e natureza da fração obtida pela nova metodologia, foram realizados experimentos de caracterização molecular descritos a seguir.

4.2.2. Massa molar do polissacarídeo e homogeneidade da amostra

Na Figura 12 é possível observar um perfil cromatográfico associado aos cálculos de massa molar ($6,2 \cdot 10^5$ g/mol (pico 1), $1,1 \cdot 10^4$ g/mol (pico 2) e 362 g/mol (pico 3), indicativo de que a fração polissacarídica obtida contém uma mistura de dois polímeros bastante distintos em termos de tamanho molecular, referentes aos picos 1 e 2 respectivamente e possivelmente uma fração oligossacarídica de menor massa molar, observada no pico 3. (Figura 12).

Essa hipótese foi confirmada pelo experimento de difusão por ressonância magnética nuclear, conforme descrito por Pannakal e colaboradores (2017). A separação de dois polissacarídeos, pode ser observada no mapa de difusão, em razão da distinção dos coeficientes de difusão e das massas moleculares distintas (Figura 13) (Pannakal et al., 2017).

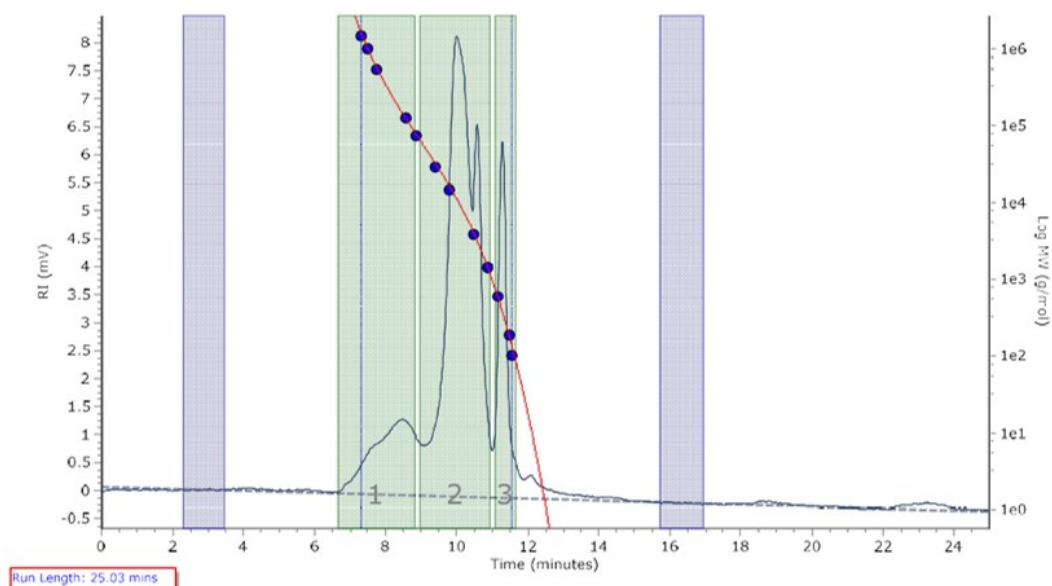


Figura 12. Perfil cromatográfico para determinação da massa molar da amostra, obtida em coluna de exclusão molecular. A linha vermelha com os pontos é referente à curva de calibração com padrões de dextrana.

O fenômeno de difusão correlaciona-se diretamente com o tamanho molecular. Moléculas com semelhança química composicional, como no caso de polissacarídeos, sofrem fenômenos de difusão em intensidades diferentes, dependendo de suas propriedades físico-químicas, governadas principalmente pelo tamanho molecular e estrutura tridimensional.

No mapa de Dosy é possível observar os deslocamentos químicos na frequência do hidrogênio no eixo x e os coeficientes de difusão (cd) no eixo y. Na região anomérica do espectro, vê-se uma separação nos deslocamentos químicos em δ 5,08 e δ 4,30 ppm, relativos aos anômeros alfa e beta dos epímeros galactose e glicose, respectivamente. Embora fosse esperado uma separação mais contundente, em função das diferenças de massas molares observadas no cromatograma, a semelhança química das estruturas levou a ocorrência discreta do fenômeno.

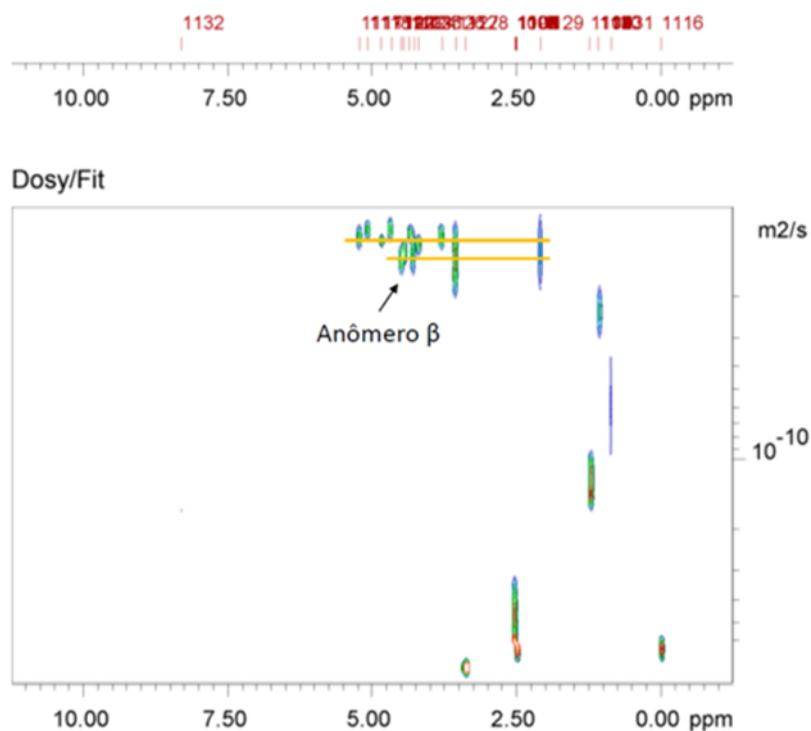


Figura 13. Mapa 2D DOSY. Neste espectro são representados, no eixo X, os deslocamentos químicos (experimento clássico de ^1H RMN) e o eixo y corresponde ao coeficiente de difusão.

4.2.3. Análise composicional por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas dos polissacarídeos derivatizados à acetatos de alditol

Após a hidrólise ácida seguida de acetilação, as amostras foram analisadas para determinação de sua composição monossacarídica. No cromatograma, obtivemos sinais de ribose, fucose, xilose, manose, glicose e galactose (Figura 14) e a abundância relativa percentual de cada monossacarídeo está expressa na Tabela 1.

Wang e colaboradores (2017) ressaltam que a composição monossacarídica pode variar conforme as fontes de carbono do meio de cultivo submerso. Também pode variar de acordo com o método de cultivo e extração empregados. Assim como Basso e colaboradores (2019), o protocolo de cultivo utilizou o mesmo substrato e a mesma condição de suplementação. Entretanto, a obtenção dos exopolissacarídeos propiciou uma amostra cuja composição monomérica foi de glicose, manose, fucose, xilose e galactose em ordem decrescente de concentração. Essa análise composicional aponta para uma mistura polimérica contendo um heteropolissacarídeo do tipo fucoxilomanana e um homopolissacarídeo do tipo glucana.

Já no método proposto neste trabalho, obtivemos uma amostra heteropolissacarídica composta principalmente de galactose, glicose, manose, fucose, respectivamente, com menores quantidades de xilose e ribose (Wang et al., 2017; Basso et al., 2019). Esses resultados apontam para uma mistura de heteropolissacarídeos do tipo fucomanogalactana e homopolissacarídeos do tipo beta-glucana.

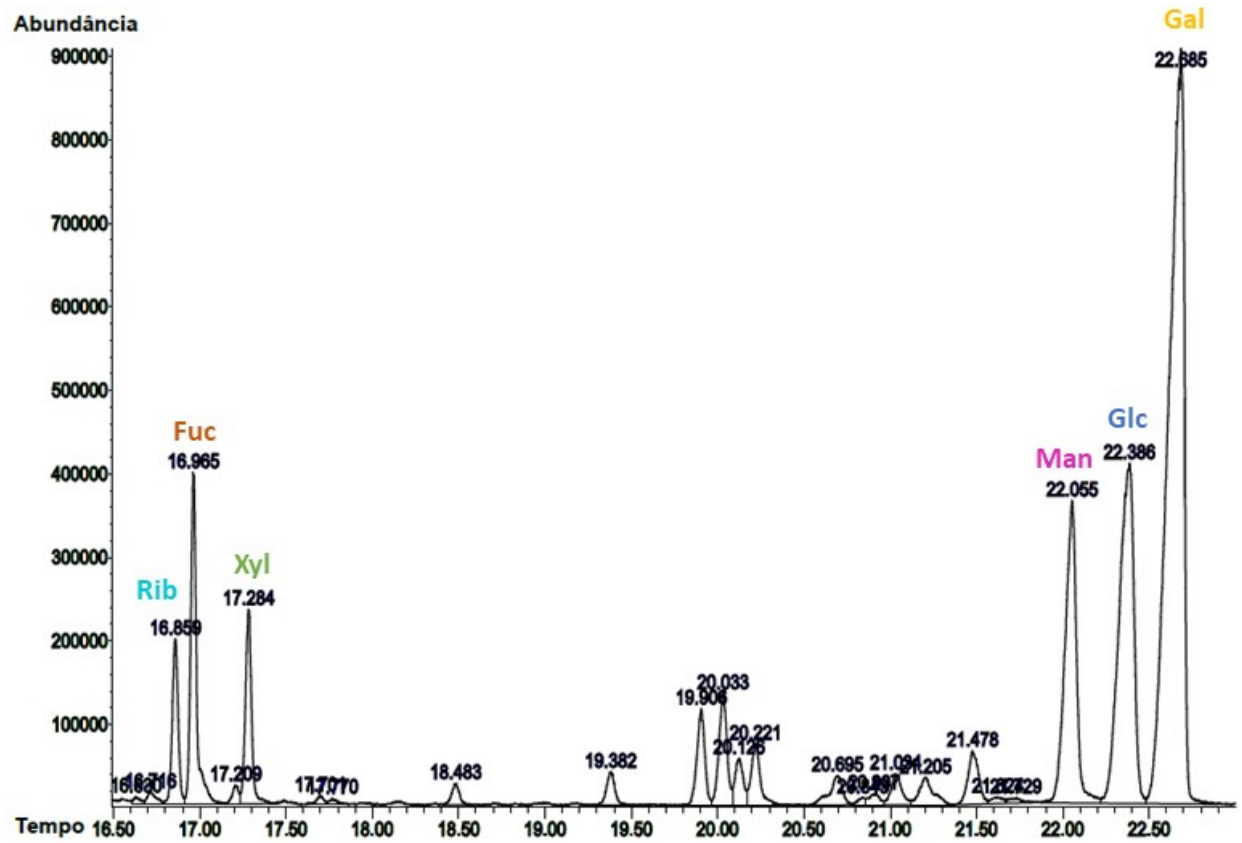


Figura 14. Cromatograma para determinação da composição monossacarídica da amostra obtida pelo processo de extração proposto.

Tabela 1. Composição Monossacarídica Relativa. A porcentagem de abundância de cada monossacarídeo na amostra é relativa à porcentagem de abundância total.

Frações	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA (%)					
	Rib	Fuc	Xyl	Man	Glc	Gal
Auri- 1	4,03	8,02	4,96	14,15	20,82	48,02

4.2.4. Caracterização dos polissacarídeos por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os polissacarídeos obtidos dos micélios, solubilizados em DMSO-d₆ foram analisados para proposição estrutural da molécula. Na figura 15, o experimento HSQC_{edit} mostra a correlação heteronuclear entre ¹H/¹³C, com os deslocamentos químicos da região anomérica dos monossacarídeos assinalados em destaque, confirmando a análise de composição monossacarídica majoritária (Figura 15).

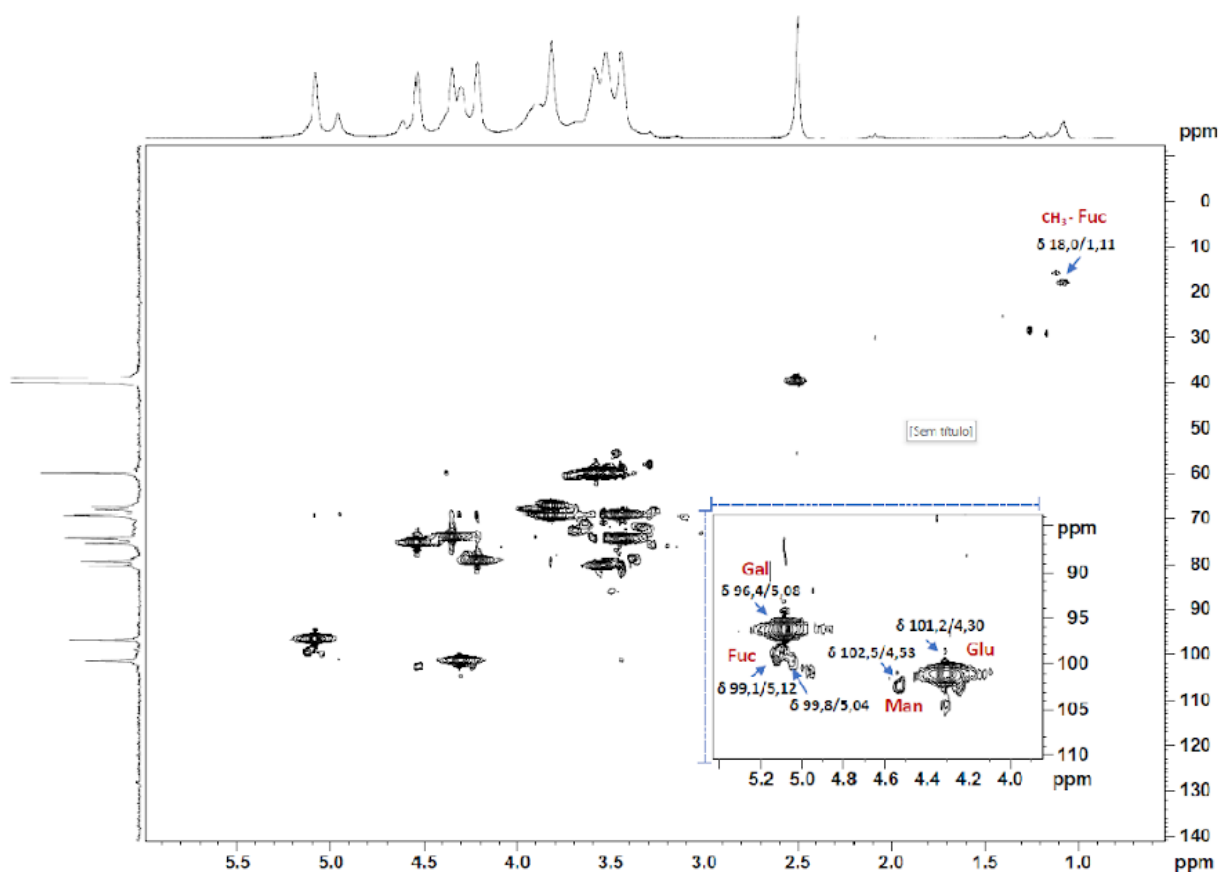


Figura 15. Mapa de contorno HSQC_{edit} para o polissacarídeo de *Auricularia auricula*, em DMSO-d₆, 11.1 Tesla 343 K. Com destaque para região anomérica.

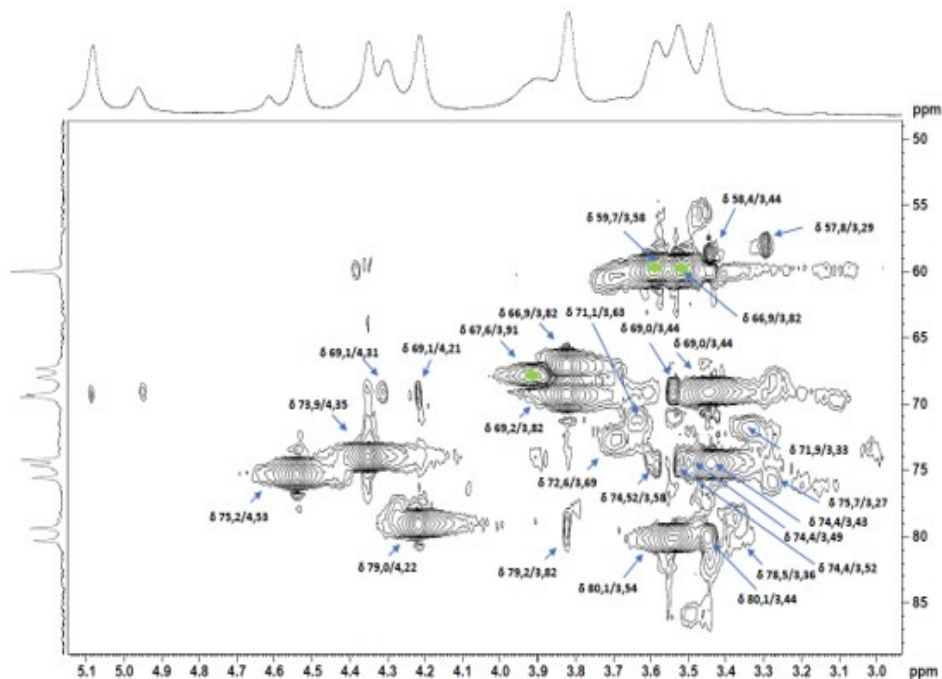


Figura 16. Mapa de contorno HSQC_{edit} da região espectral carbinólica para o polissacarídeo de *Auricularia auricula*, em DMSO-d₆, 11.1 Tesla 343 K.

No experimento de HSQC acoplado (Figura 17), observamos os deslocamentos químicos e os valores de constante de acoplamento (J), para os anômeros α e anômeros β .

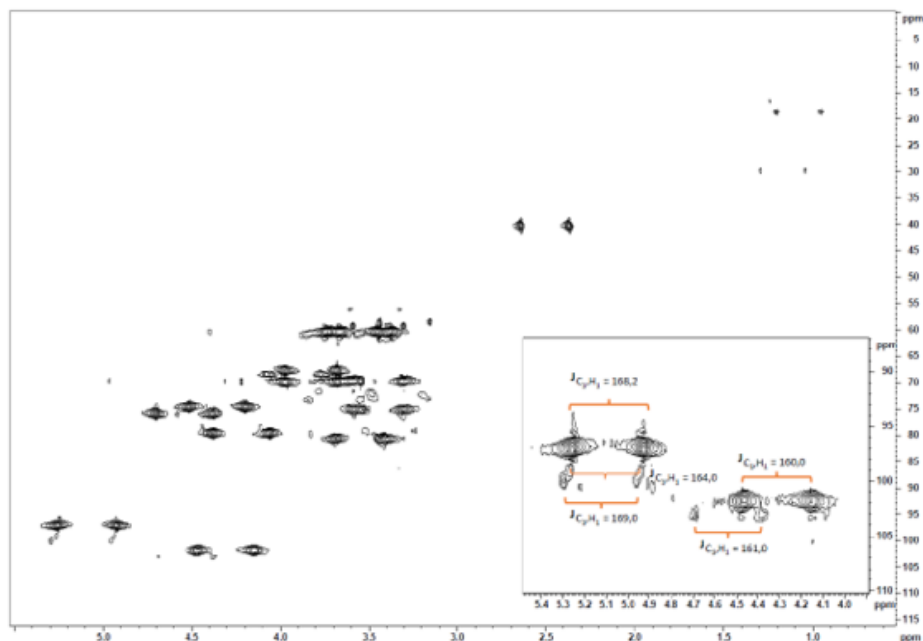


Figura 17. Mapa de contorno HSQC acoplado, para o polissacarídeo de *Auricularia auricula*, em DMSO-d₆, 11.1 Tesla 343 K. Com destaque para região anomérica.

As análises espectroscópicas com assinalamento das correlações nos espectros de HSQC_{edit}, HSQC não desacoplado, revelam a presença majoritária de quatro tipos de monossacarídeos, o que não pôde ser observado no espectro de ¹³C, em função das sobreposições. Os assinalamentos dos espectros 2D possibilitaram a identificação de unidades galactopiranosídicas α -D-Galp (δ 96,4/5,08) com configuração glicosídica α , confirmada pelo valor de constante de acoplamento J_{C1/H1} 168,2 Hz; unidades β -D-Manp (δ 102,5/4,53) com constante de acoplamento J_{C1/H1} 161,0 Hz; unidades α -L-Fucp (δ 99,1/5,12) com constante de acoplamento J_{C1/H1} 169,0 Hz e unidades de glicose em configuração beta β -D-Glup (δ 101,2/4,30) e constante de acoplamento J_{C1/H1} 160,0 Hz.

Esses resultados estão de acordo com dados relatados na literatura, que revelam que diversos macrofungos, como *Agaricus bisporus*, *Hypsizygus marmoreus*, *Lactarius rufus* e *Lentinus edodes* (Mukumoto; Yamaguchi, 1977; Ruthes et al., 2012; Ruthes et al., 2013a; Carbonero et al., 2008; Oliveira et al., 2019), apresentam estruturas de parede celular constituídas por heteropolissacarídeos como as fucomanogalactanas e homopolissacarídeos do tipo beta glucana no trabalho com o cogumelo *Amanita muscaria*, Ruthes e colaboradores (2013), conseguiram extrair, purificar e isolar as duas espécies polissacarídicas, cujo padrão espectral é similar ao do presente trabalho (Ruthes et al., 2013).

A completa caracterização estrutural está em curso a partir dos dados experimentais já adquiridos para análise de correlação heteronuclear escalar (HSQC-TOCSY, HMBC e HMQC), além das correlações dipolares para determinação estrutural espacial através de análise de HSQC-NOE, todos avaliados comparativamente com os resultados de metilação (padrão de ligação química dos polímeros de carboidrato).

Com base nesses dados, podemos observar que a mudança na metodologia levou à obtenção de uma fucomanogalactana e beta-glucana, que apresentam maior rendimento composicional em monossacarídeos em configuração β anomérica que o observado em Basso e colaboradores (2019).

5. Capítulo III – Avaliação do polissacarídeo obtido no modelo de infecção por *Cryptococcus neoformans*

Vários trabalhos identificaram que a modulação da microbiota intestinal é capaz de modular processos infecciosos em outros sítios do hospedeiro (Jawhara, 2023; Li et al., 2023). Como o tratamento da colite modulou o microbioma (Anexo II) e observamos uma doença mais branda, o próximo passo foi avaliar se a ingestão dos polissacarídeos seria capaz de modular uma infecção pulmonar causada pelo *C. neoformans*.

A criptococose é uma doença causada pelos fungos ambientais do complexo de espécies causadoras de criptococose, *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, podendo evoluir para um quadro de pneumonia severa e meningoencefalite. Em 2020, a criptococose foi a causa de 19% da mortalidade associada ao vírus da imunodeficiência humana (HIV). Acredita-se, que o primeiro contato com o fungo ocorra na infância através da inalação de esporos ou leveduras dessecadas, que podem ou não ser eliminadas pelo sistema imune do hospedeiro. O primeiro contato com o sistema imune ocorre na mucosa das vias aéreas e, subsequentemente, com células imunes residentes do tecido pulmonar, processo favorecido pela ação de fosfolipases produzidas pelo fungo (Casadevall; Coelho; Alanio, 2018; Rohatgi; Pirofski, 2015; Diniz-Lima et al., 2022; Rajasingham et al., 2022).

A resposta imune à infecção por *C. neoformans* atende a parábola de dano-resposta proposta por Pirofski e Casadevall (2017), na qual deixa-se de pensar nos conceitos de “dano provocado por um organismo patogênico” e adota-se o entendimento de que existe a interação do hospedeiro com o microrganismo e o resultado dessa interação (Casadevall; Pirofski, 2015).

No contexto da resposta imune inata, a fagocitose realizada por células residentes do tecido pulmonar (ex: macrófagos alveolares) é um importante mecanismo efetor, que pode ser mediada pelo sistema complemento, ativado pela cápsula, por receptores Fc ou até mesmo pelo fungo não opsonizado, por receptores de reconhecimento de padrões (PRR's) que estão expressos em diferentes células (Rohatgi; Pirofski, 2015).

Macrófagos alveolares atuam nesse processo e podem tanto favorecer a ativação da resposta imune adaptativa quanto a sobrevivência intracelular do fungo, que pode ocasionar a disseminação deste para outros tecidos e para o sistema nervoso central (SNC). Portanto, é o estado imunitário do hospedeiro que vai determinar se os macrófagos alveolares vão aumentar ou controlar o dano (Rohatgi; Pirofski, 2015). Células dendríticas também atuam na fagocitose a apresentação antigênica, bem como na produção de citocinas como IL-12 e IL-23. Células polimorfonucleares podem favorecer a formação de granuloma e produção de defensinas que auxiliam na defesa antifúngica (Rohatgi; Pirofski, 2015).

O resultante da resposta inata, bem como a produção de citocinas vai ditar a polarização de uma resposta adaptativa celular para perfis protetores Th1 e Th17, com a produção de citocinas como IL-2, IL-12, IFN- γ , TNF- α e IL-1 β e IL-6, que na presença de IL-23 polarizam uma resposta de células Th17, que secretam IL-17 e IL-22. A produção de TNF- α no pulmão é importante para a produção de IL-12 e IFN- γ , que promovem uma resposta de linfócitos T CD4⁺ polarizada para o perfil Th1, que por ser pró inflamatório consegue promover a eliminação do fungo, o que é associado à sobrevivência do paciente (Rohatgi; Pirofski, 2015).

A sinalização de receptores como Dectina-1 e receptor de manose estão associadas com a fagocitose de *C. neoformans* e ativação de uma resposta inflamatória. O reconhecimento de β -glucanas via o receptor Dectina-1 está associado ao processo de fagocitose, embora não seja o único mecanismo necessário para defesa do hospedeiro, visto que a cápsula do fungo pode mascarar esses polissacarídeos da parede celular (Diniz-Lima *et al.*, 2022).

Basso e colaboradores (2019) mostram que exopolissacarídeos obtidos do cultivo submerso de *Auricularia auricula* apresentam atividade imunomodulatória, ao ativar a produção de citocinas em macrófagos e células dendríticas, pela via canônica de sinalização do receptor Dectina-1. Este resultado, em conjunto com a caracterização química, indica que o exopolissacarídeo obtido no cultivo submerso contém em sua composição β - (1, 3) -glucanas que se ligam ao receptor ativando os mecanismos efetores de células da imunidade inata. Este trabalho também mostra que a administração desse exopolissacarídeo, por gavagem, aumenta a sobrevivência de camundongos c57BL/6J em aproximadamente 20% em um modelo de infecção intranasal com o fungo *C. neoformans*. Levanta-se a hipótese de que o tratamento com a glucana pode ter provocado uma resposta sistêmica com a ativação local de fagócitos ou que a resposta observada estava vinculada a uma modulação da microbiota do animal infectado (Basso *et al.*, 2019).

5.1. Materiais e métodos

5.1.1. Animais

Assim como no capítulo anterior, para os ensaios *in vivo* e *ex vivo* utilizou-se camundongos *Mus musculus* c57BL/6J selvagem (Wt) e Dectina-1 *Knockout*, machos e fêmeas, com 8-12 semanas de idade. Estes permaneceram durante o período experimental no biotério do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade de Brasília, em racks ventilados com bebida e comida

ad libitum. O uso destes animais foi previsto no projeto de SEI nº 23106.074021/2021-11e aprovado na Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília (Anexo I-2).

5.1.2. Modelo murino de infecção pelo fungo *Cryptococcus neoformans*

Uma colônia de *Cryptococcus neoformans* (var. *grubii*, sorotipo A, H99) foi inoculada em 20 mL de meio YPD líquido (*extrato de levedura 1%, peptona bacteriológica 2% e dextrose 2%*), pH 5.6, à 30°C sob agitação 100-180 rpm, por 24 horas antes de seu uso. Em seu preparo, a levedura foi lavada três vezes com solução tampão salino fosfato (*phosphate buffered saline*, PBS 1x) e sua concentração foi ajustada para que cada animal fosse infectado com um inóculo contendo 1×10^5 células de levedura.

Para avaliar o processo inflamatório, foi preparado um inóculo de *C. neoformans* (var. *grubii*, sorotipo A, H99) morto por calor (*heat-killed*). Após o preparo da levedura, como descrito acima, ela foi acondicionada por 1 hora à temperatura de 75 °C e, então, sua concentração foi ajustada para que cada animal fosse instilado com 1×10^6 células fúngicas mortas por calor.

Antes da infecção, os camundongos foram sedados e anestesiados com uma solução de cetamina (15mL/Kg) e xilazina (0,1 mL/Kg) injetada intramuscular. Em seguida, receberam uma única dose intratraqueal de 30 µL da suspensão de leveduras na concentração previamente determinada, exceto o grupo não infectado/não tratado (NI/NT).

Os animais foram acompanhados pelo período experimental descrito no cronograma abaixo. Os grupos foram tratados com o polissacarídeo, cinco dias antes ou após a infecção, de forma que cada animal recebeu 100 µg do polissacarídeo em um volume 100 µL, em cada dia do tratamento.

Para análise de carga fúngica tecidual, os animais foram eutanasiados no sétimo (7º) e décimo quarto (14º) dias após a infecção (Figura 18). Foi realizada a coleta de sangue, pulmão e cérebro para análise. O sangue foi plaqueado em placas de YPD ágar e o soro foi armazenado a -80 °C para análises futuras. Após a coleta, os tecidos foram pesados e macerados em solução PBS com auxílio do equipamento *Precellys*. O material macerado foi plaqueado, também, em placas de YPD ágar, que foram acondicionadas em estufa a 30 °C, por 48-72 horas para a

determinação de unidades formadoras de colônias (UFC), cujo valor foi ajustado por grama de tecido macerado.

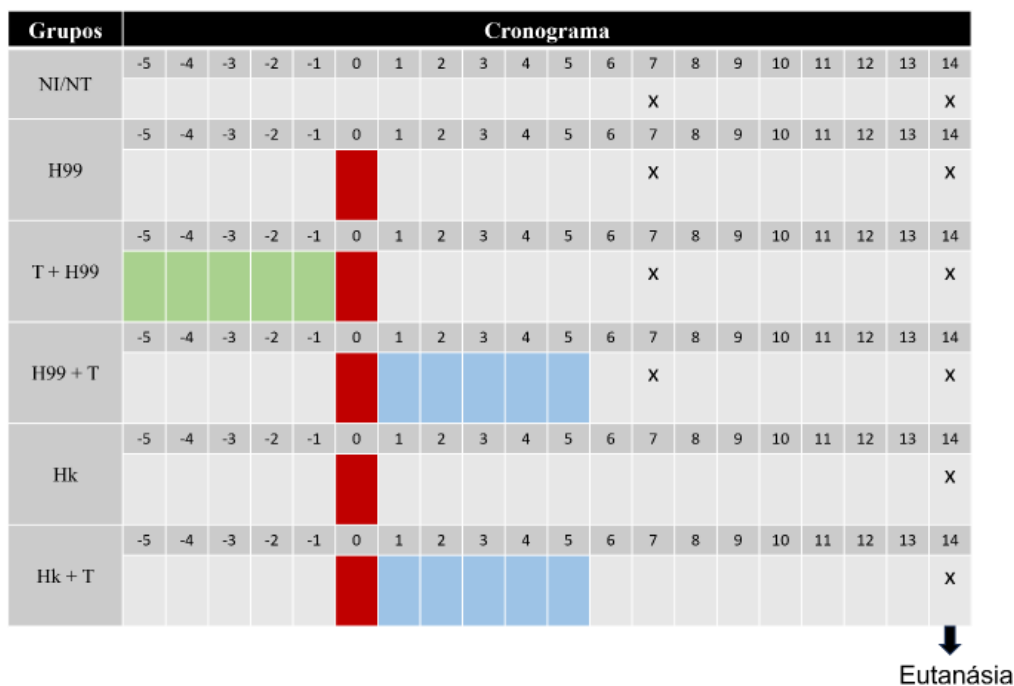


Figura 18. Cronograma do modelo experimental de infecção intratraqueal com o fungo *Cryptococcus neoformans*. O período experimental foi delimitado em 20 dias. Os grupos foram infectados com o fungo ou inoculados com o fungo morto por calor (Hk) no dia zero (D0). Os grupos indicados como “T+H99” e “H99/Hk + T” foram os grupos que receberam o tratamento com o polissacarídeo via gavagem por 5 dias antes (representado em verde) ou depois da infecção/inoculação (representado em azul), respectivamente.

5.1.3. Imunofenotipagem do Baço

Os baços dos camundongos foram retirados, macerados com meio RPMI-1640. As células foram agrupadas em *pools* representativos de cada grupo experimental. As células passaram por tratamento com solução de lise de hemácias e foram separadas em triplicatas experimentais em dois painéis de fenotipagem, cada triplicata contendo um total de 2×10^6 células. Essas células foram fixadas em solução de paraformaldeído (PFA) 1% durante a noite, e no dia seguinte procedemos com a marcação. O primeiro painel avaliado foi CD11b⁺ (APC) e MHC II (FITC). O segundo painel foi CD4⁺ (PeCy7) e CD8⁺ (PE). Após a marcação das células, realizamos a fenotipagem utilizando o citômetro de fluxo FACSVerse (BD) e os dados foram analisados utilizando o software FlowJo.

5.1.4. Histopatológico

O material biológico (cérebro, pulmão e cólon) coletado para análise histopatológica foi acondicionado em cassetes previamente etiquetados e armazenados em solução de formaldeído tamponado (10%), conforme descrito no capítulo anterior.

As lâminas para análise histopatológica foram coradas com Hematoxilina-Eosina (HE) e foram escaneadas no equipamento Aperio Scanner CS2 (Leica Biosystems) e as imagens adquiridas foram analisadas no software Aperio ImageScope x64.

5.1.5. Produção de citocinas

A quantificação de citocinas foi feita pela técnica ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), usando os kits específicos da marca Invitrogen, seguindo as instruções do fabricante. Para os tecidos pulmonar e cerebral, quantificamos TNF- α (Invitrogen, ref. 88-7324), IL-10 (Invitrogen, ref. 88-7105), IL-6 (Invitrogen, ref. 88-7064), IFN- γ (Invitrogen, ref. 88-7314) e IL-1 β (Invitrogen, ref. 88-7013).

5.1.6. Análise estatística

Todos os resultados quantitativos desta parte do trabalho foram analisados com desvio padrão (SD) da triplicata biológica feita de um dos experimentos independentes, de um total de duas análises técnicas. Para avaliar estatisticamente diferenças entre grupos experimentais a análise da variância (One-way ANOVA), foram utilizados pelo *software GraphPad Prism* (versão 8.0). Os dados foram considerados significantes quando $p < 0,05$.

5.2. Resultados e Discussão

5.2.6. Avaliação da carga fúngica tecidual após infecção intratraqueal pelo fungo *Cryptococcus neoformans*

Após a infecção, os camundongos foram acompanhados por 14 dias para avaliação do desenvolvimento da doença. No sétimo e no décimo quarto dia, procedemos com a coleta de sangue total desses animais, seguida de eutanásia, antes da coleta de órgãos para análise.

Na avaliação da carga fúngica tecidual, observamos que sete dias após a infecção, tanto o grupo que recebeu o tratamento com o polissacarídeo antes quanto o que recebeu o tratamento após a infecção apresentaram menor quantidade de unidades formadoras de colônia (UFC) no pulmão quando comparados com o controle da infecção. Não foi detectado (ND) o crescimento de colônias nos grupos inoculados com o fungo morto por calor (Hk), conforme esperado. No

décimo quarto dia após a infecção, a quantidade de colônias encontradas no pulmão reduziu para todos os grupos infectados (Figura 19A).

Já no cérebro (Figura 19B), é possível observar que, apesar de no sétimo dia a quantidade de unidades formadoras de colônias no tecido serem similares, no décimo quarto dia os grupos que foram tratados com o polissacarídeo apresentaram maior carga fúngica tecidual.

Não foi observado o crescimento de unidades formadoras de colônias no sangue dos animais, em nenhum dos dias (dados não apresentados). Portanto, não foi possível verificar se a disseminação para o cérebro ocorreu por via corrente sanguínea. Entretanto, a redução de UFC pulmonar após 14 dias, quando comparado ao ponto de 7 dias, mostra que os camundongos estavam em processo de resolução da infecção pulmonar. Ao mesmo tempo, observamos o aumento de UFC no cérebro, que é esperado visto que a migração para o sistema nervoso central ocorre na maioria das vezes causando a meningite criptocócica.

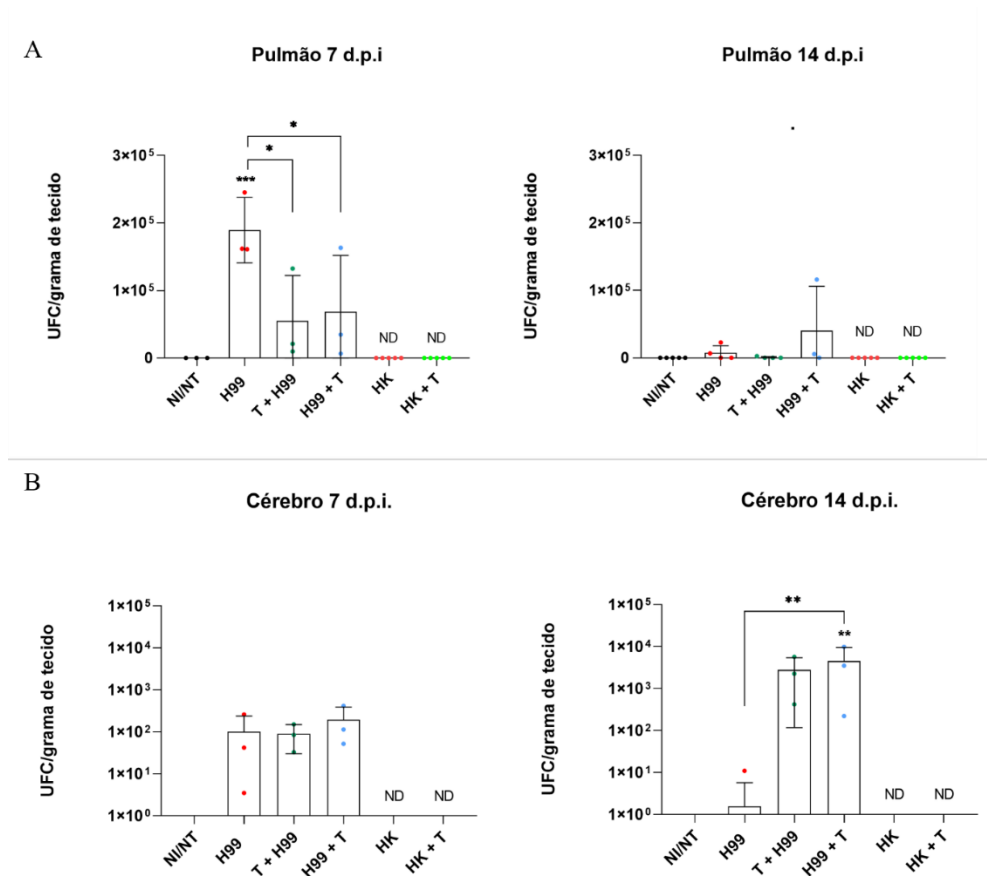


Figura 19. Carga fúngica tecidual após infecção com *Cryptococcus neoformans* (intratraqueal), avaliada 7 e 14 dias após a infecção (d.p.i.). Camundongos c57BL/6J ($n \geq 3$) foram infectados com o fungo vivo (H99), cada

animal recebeu 1×10^5 células fúngicas, ou com o fungo morto por calor (heat-killed, HK) receberam um inóculo de 1×10^6 células fúngicas mortas por calor. Os grupos que receberam tratamento prévio ou posterior a infecção estão representados, respectivamente como “T+H99” ou “H99/HK+T”. (A) Quantidade de unidades formadoras de colônia (UFC), valor ajustado por massa de tecido, no pulmão 7 e 14 dias após infecção. (B) Quantidade de unidades formadoras de colônia (UFC), valor ajustado por massa do tecido, no cérebro 7 e 14 dias após a infecção. Análise estatística One-way ANOVA compara os grupos tratados com o controle da infecção. A sinalização ND indica que não foi detectada carga fúngica naquele grupo. p significativo quando $< 0,05$.

Para os animais *Knock-out* de Dectina-1, avaliamos a carga fúngica somente no ponto de 14 dias após a infecção. Neste experimento, os animais receberam o tratamento com o polissacarídeo por 5 dias após a infecção com o fungo *C. neoformans* vivo ou inoculação com o fungo morto por calor (Hk).

No pulmão (Figura 20A), não foi possível observar diferença entre o grupo tratado e o grupo controle da infecção. Também observamos uma carga fúngica maior que nos animais Wt, mostrando que a estimulação via Dectina-1 é importante para a contenção das doenças fúngicas. Conforme esperado, não foi detectado o crescimento de colônias nos grupos inoculados com o fungo morto por calor (Hk).

Nos animais *Knock-out* para o receptor Dectina-1 não foram detectadas unidades formadoras de colônias no cérebro (Figura 20B) e no sangue de nenhum animal analisado (dados não apresentados). Esses resultados demonstram a importância do receptor Dectina-1 no processo de desenvolvimento e controle da infecção.

O receptor Dectina-1 é considerado um dos principais receptores na resposta antifúngica. Seu papel foi descrito no controle de infecções por *Aspergillus fumigatus* e algumas cepas de *Candida albicans*. Entretanto, esta atividade está vinculada ao reconhecimento de β -glucanas da parede celular pelo receptor, o que fungos patogênicos podem contornar por alterações morfológicas, diferentes estados de maturação ou mascarar com outros componentes de parede, como as mananas ou com a cápsula polissacarídica, como observado para *C. neoformans* (Kimberg & Brown, 2008; Yadav et al., 2020; Camilli et al., 2018).

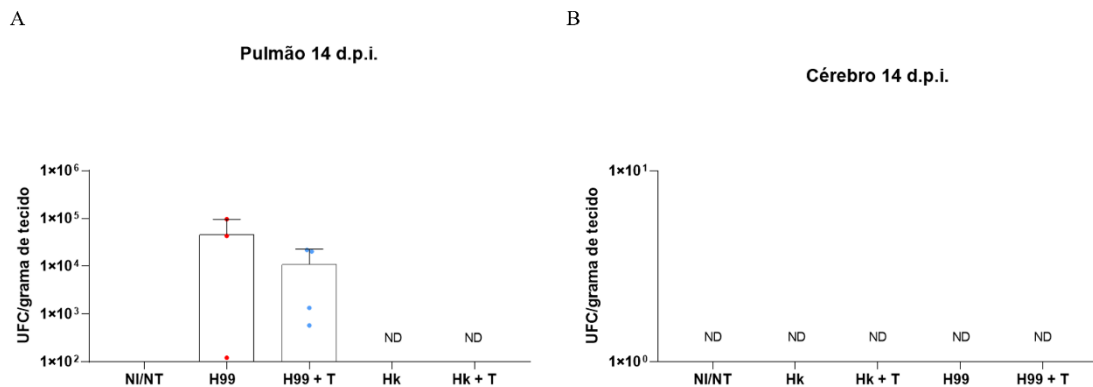


Figura 20. Carga fúngica tecidual após infecção com *Cryptococcus neoformans* (intratraqueal), avaliada 14 dias após a infecção (d.p.i.). Camundongos c57BL/6J Knock-out para Dectina-1 ($n \geq 3$), foram infectados com o fungo vivo (H99), cada animal recebeu 1×10^5 células fúngicas, ou com o fungo morto por calor (heat-killed, HK) receberam um inóculo de 1×10^6 células fúngicas mortas por calor. Os grupos que receberam tratamento posterior à infecção estão representados, respectivamente, como “H99/HK + T”. (A) Quantidade de unidades formadoras de colônia (UFC), valor ajustado por massa de tecido, no pulmão 14 dias após infecção. (B) Quantidade de unidades formadoras de colônia (UFC), valor ajustado por massa do tecido, no cérebro 14 dias após a infecção. Análise estatística One-way ANOVA compara os grupos tratados com o controle da infecção. A sinalização ND indica que não foi detectada carga fúngica naquele grupo. p significativo quando $< 0,05$.

5.2.2. Citocinas

Foi possível observar que o grupo que recebeu o tratamento após a infecção apresentou aumento na produção de IL-1 β , tanto no cérebro quanto no pulmão, quando comparados ao controle não infectado/não tratado e no cérebro, quando comparado ao controle infectado (Figura 21 E, F). Para a produção de IL-10, observamos um aumento nos grupos inoculados com o fungo morto por calor (HK) quando comparado ao grupo controle não infectado/não tratado e ao grupo infectado com o fungo vivo (Figura 21 C, D).

Não foi observada diferença entre os grupos para a produção de TNF- α nem de IFN- γ . (Figura 21A, B e I, J). A produção de IL-6, entretanto, foi maior no pulmão para o grupo que recebeu o tratamento após a infecção em relação ao controle da infecção e ao grupo que recebeu o tratamento antes (Figura 21 H). Os dados apresentados mostram que o tratamento prévio com os polissacarídeos não modulou a produção de citocinas no pulmão e cérebro, somente o tratamento após a infecção.

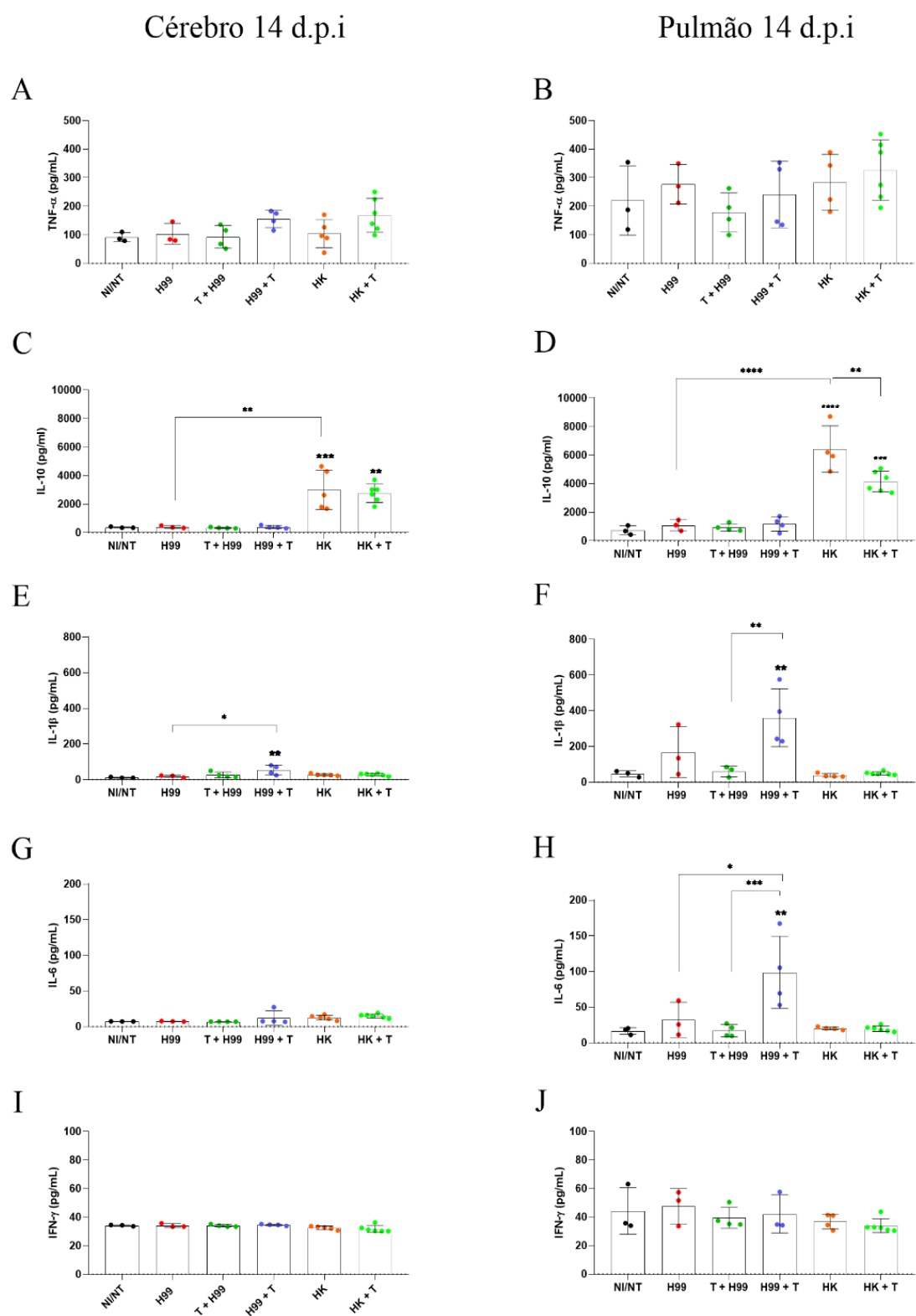


Figura 21. Dosagem de citocinas no macerado tecidual de cérebro e pulmão de camundongos c57BL/6J infectados/instilados com o fungo *Cryptococcus neoformans*. Foram quantificadas no cérebro e pulmão, respectivamente, (A-B) TNF- α ; (C-D) IL-10; (E-F) IL-1 β ; (G-H) IL-6; (I-J) IFN- γ por meio de ELISA. Análise

estatística One-way ANOVA compara os grupos tratados com o controle não infectado e com o controle da infecção. p significativo quando $< 0,05$.

Para os camundongos *Knock-out* para Dectina-1, observamos que a infecção com o fungo vivo (H99) produziu uma quantidade significativa de TNF- α no pulmão e no cérebro (Figura 21 A, B). No pulmão, o tratamento com o polissacarídeo após a infecção reduziu a quantidade desta citocina no tecido (Figura 21 B).

A produção de IL-10 (Figura 21 C, D) e IL-6 (Figura 21 G, H) foram significativamente maiores para o grupo infectado com o fungo vivo (H99) do que com o fungo morto por calor (Hk). Não houve diferença significativa na produção das demais citocinas. Estes dados mostram que apesar dos animais apresentarem receptores de reconhecimento padrão (PRR) para demais componentes da parede celular do fungo, a ausência de estimulação via dectina-1 no intestino contribui para um cenário menos inflamatório que aqueles observados nos animais Wt.

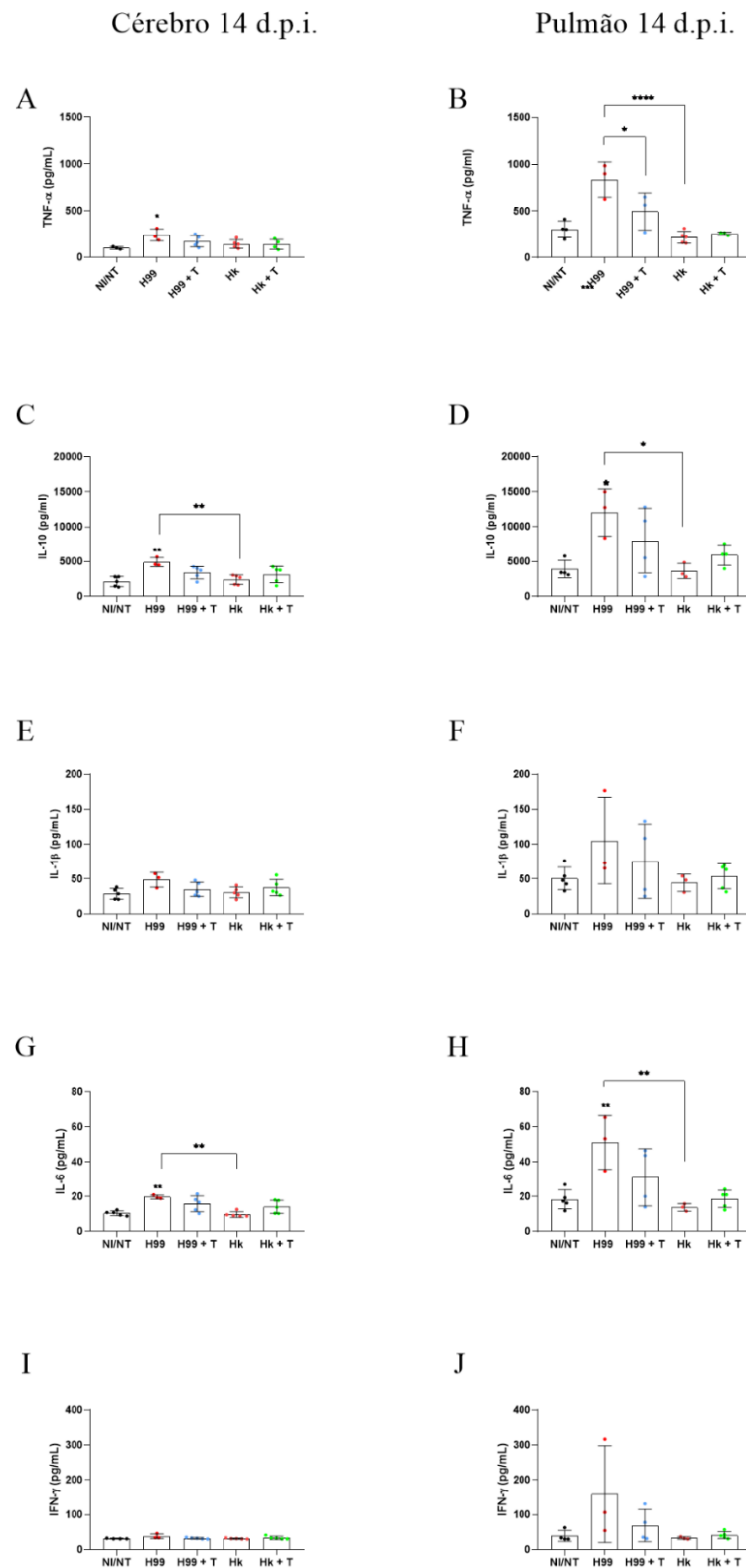


Figura 22. Dosagem de citocinas no macerado tecidual de cérebro e pulmão de camundongos Knock-out para Dectina-1 infectados/instilados com o fungo *Cryptococcus neoformans*. Foram quantificadas no cérebro e pulmão, respectivamente, (A-B) TNF- α ; (C-D) IL-10; (E-F) IL-1 β ; (G-H) IL-6; (I-J) IFN- γ por meio de ELISA.

Análise estatística One-way ANOVA compara os grupos tratados com o controle não infectado e com o controle da infecção. p significativo quando $< 0,05$.

5.2.3. Imunofenotipagem de esplenócitos

Durante a coleta de órgãos, foram removidos os baços dos camundongos e macerados. As células resultantes do macerado foram reunidas em um *pool* de esplenócitos, que teve sua concentração ajustada para fenotipagem em 2×10^6 células em cada ponto da triplicata. Para fenotipagem fizemos a seleção de dois painéis, dentro da estratégia de seleção indicada no Anexo III.

O primeiro para avaliar a porcentagem de células $CD11b^+$ que expressam MHC II. Observamos que tanto os animais inoculados com o fungo morto por calor quanto os animais inoculados com o fungo morto por calor e tratados apresentaram maior quantidade de células $CD11b^+$ (Figura 23A) em comparação com os outros grupos. Entretanto, avaliando a expressão de $MHC II^{high}$, as células do grupo infectado com *Cryptococcus neoformans* apresentaram uma redução na expressão destas moléculas o que também pode ser observado na mediana da intensidade de fluorescência (MIF) (Figura 23 C e D).

O segundo painel avaliou a quantidade e relação de linfócitos $CD4^+$ e $CD8^+$. Observamos que todos os grupos tinham entre 20 e 40% de linfócitos $CD4^+$, com uma menor porcentagem de células $CD8^+$ (Figura 23 B).

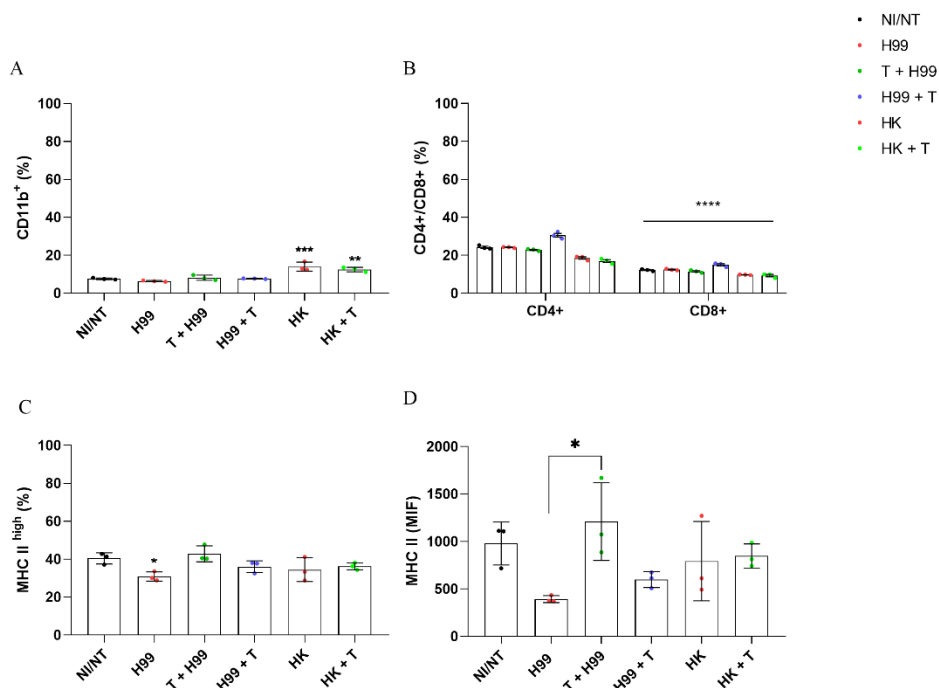


Figura 23. Imunofenotipagem de esplenócitos de camundongos infectados com *Cryptococcus neoformans* após 14 dias da infecção. (A) Células CD11b⁺, (B) Células CD4⁺/CD8⁺, (C) Células MHC II^{high}, valores expressos em porcentagem (%), e (D) mediana de intensidade de fluorescência (MIF) das células MHC II^{high}. Análise estatística One-way ANOVA compara os grupos tratados com o controle da infecção. p significativo quando < 0,05.

Os dados mostram que a infecção reduz a porcentagem de células capazes de apresentar antígenos via MHC classe II, o que reduz a resposta imune celular mediada por linfócitos T CD4⁺, já descrita como importante para a eliminação do fungo dos tecidos (Li et al., 2022). Entretanto, na inoculação com a levedura Hk, a literatura mostra que existe um aumento de expressão de MHC II, indicando uma ativação de macrófagos (Kawakami et al., 1995). A recuperação dos níveis de MHC II nos grupos tratados indica uma possível ativação destas células como apresentadoras de antígenos e foi observada em Basso e colaboradores (2019) em células dendríticas derivadas de medula óssea (Basso et al., 2019).

Na imunofenotipagem dos esplenócitos de camundongos *Knock-out* para Dectina-1, observamos que o grupo infectado com *Cryptococcus neoformans* que recebeu tratamento posterior à infecção apresenta maior percentual de células CD11b⁺ do que os grupos não infectado/não tratado e o grupo controle da infecção (H99). Esse aumento também foi

observado em comparação ao grupo instilado com o fungo morto por calor (Hk) que também recebeu o tratamento posterior (Figura 24 A).

A proporção de células MHC II ^{high} observadas para os grupos infectados com o fungo vivo (H99) bem como para os infectados com o fungo morto por calor, com e sem tratamento (Hk e Hk + T), sendo possível observar a redução de MIF para esses grupos (Figura 24 C e D).

Os resultados da avaliação do segundo painel foram percentualmente semelhantes aos do experimento com os camundongos de genótipo selvagem (Figura 24 B).

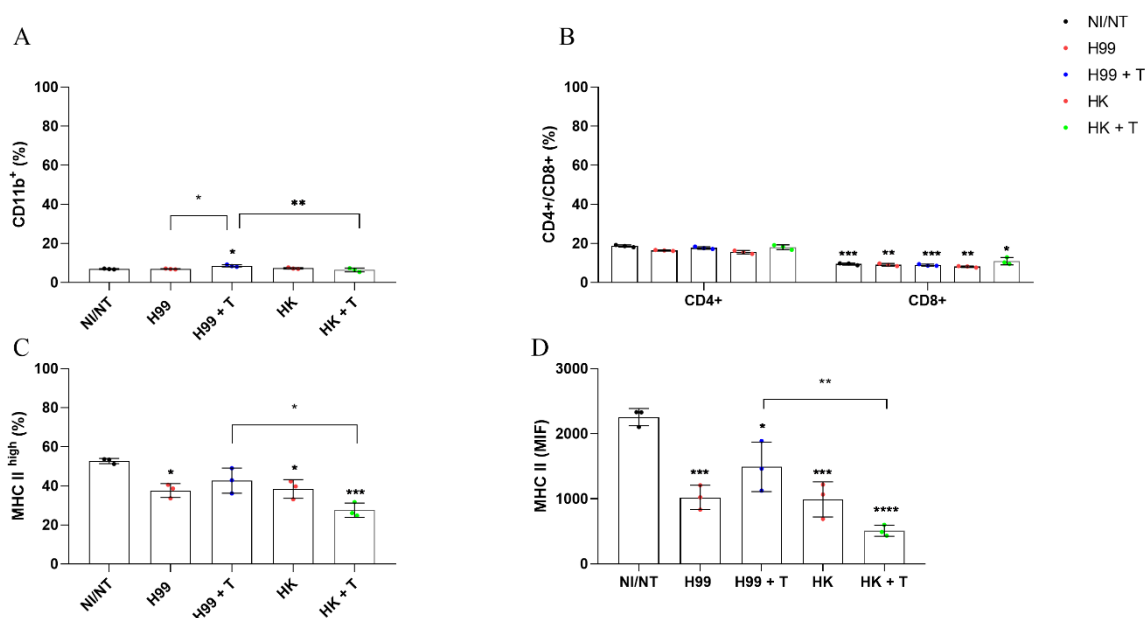


Figura 24. Imunofenotipagem de esplenócitos de camundongos *Knock-out* para Dectina-1 infectados com *Cryptococcus neoformans* após 14 dias da infecção. (A) Células CD11b⁺, (B) Células CD4⁺/CD8⁺, (C) Células MHC II ^{high}, valores expressos em porcentagem (%), e (D) mediana de intensidade de fluorescência (MIF) das células MHC II ^{high}. Análise estatística One-way ANOVA compara os grupos tratados com o controle da infecção. p significativo quando < 0,05.

5.2.4. Análise Histopatológica

No corte histopatológico do tecido pulmonar, foi possível observar, no aumento de 4x, a presença de infiltrados inflamatórios com a formação de granulomas evidentes nos grupos infectados com *C. neoformans* (H99), bem como no grupo infectado que recebeu o tratamento por 5 dias após a infecção. No aumento de 10x, podemos observar nesses mesmos grupos a presença de leveduras de *C. neoformans*. No grupo H99+T também é possível observar

leveduras no tecido. (em 4x). No grupo que recebeu o tratamento prévio, observa-se um infiltrado inflamatório menor do que o grupo somente infectado e não tratado, sem a formação de granulomas nítidos (Figura 25).

No grupo instilado com o fungo morto por calor (Hk), podemos observar no aumento de 4x a presença de infiltrados inflamatórios, mas não detectamos, no aumento de 10x, a presença de leveduras (Figura 25).

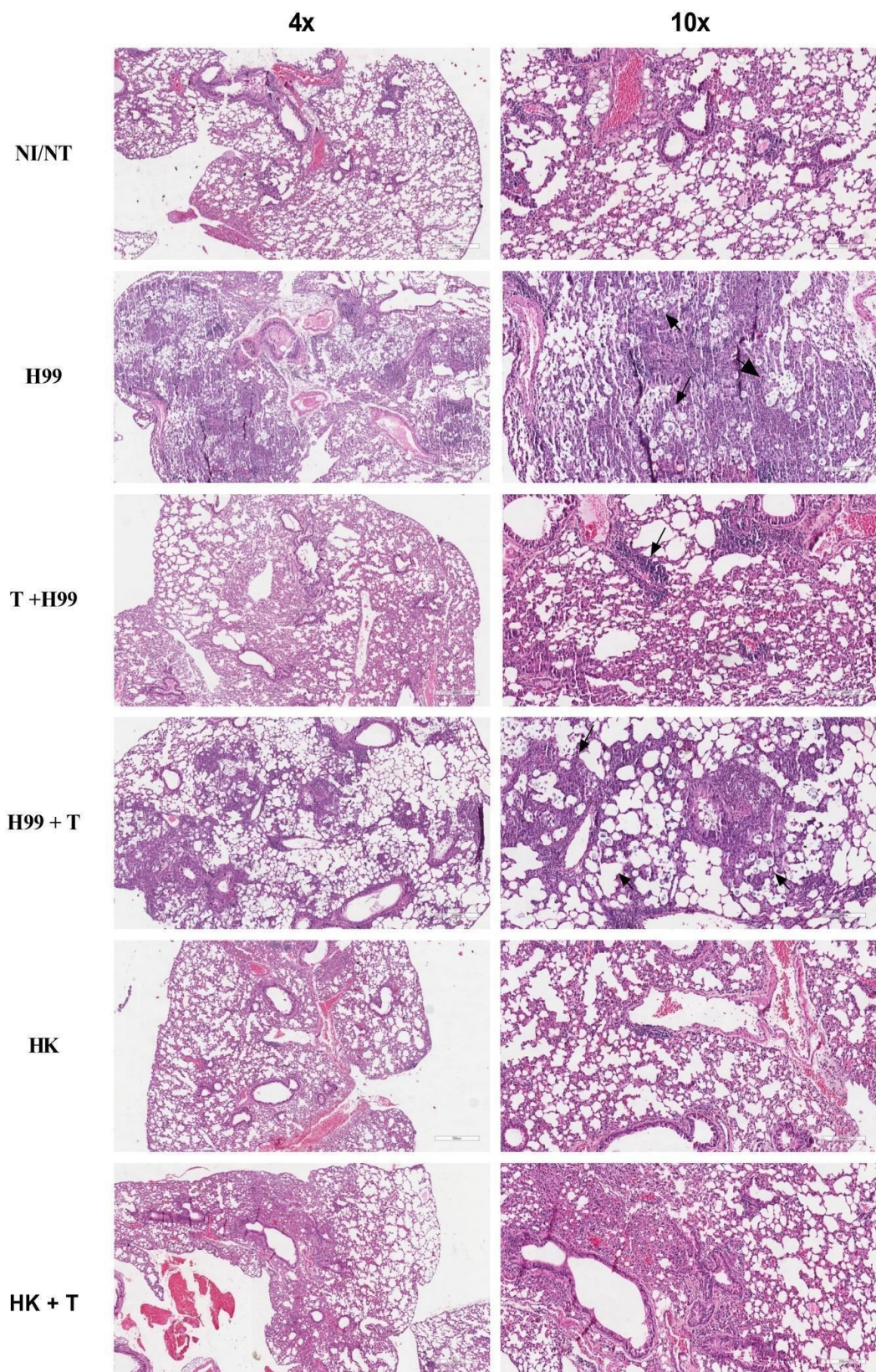


Figura 25. Corte histopatológico do tecido pulmonar de camundongos C57BL/6J, 14 dias após infecção (intratraqueal) com o fungo *Cryptococcus neoformans*. Os cortes de histopatológico foram corados com

hematoxilina-eosina (HE) e as imagens foram analisadas no programa ImageScope x64 nos aumentos de 4x e 10x. As setas indicam as leveduras e infiltrados inflamatórios no tecido.

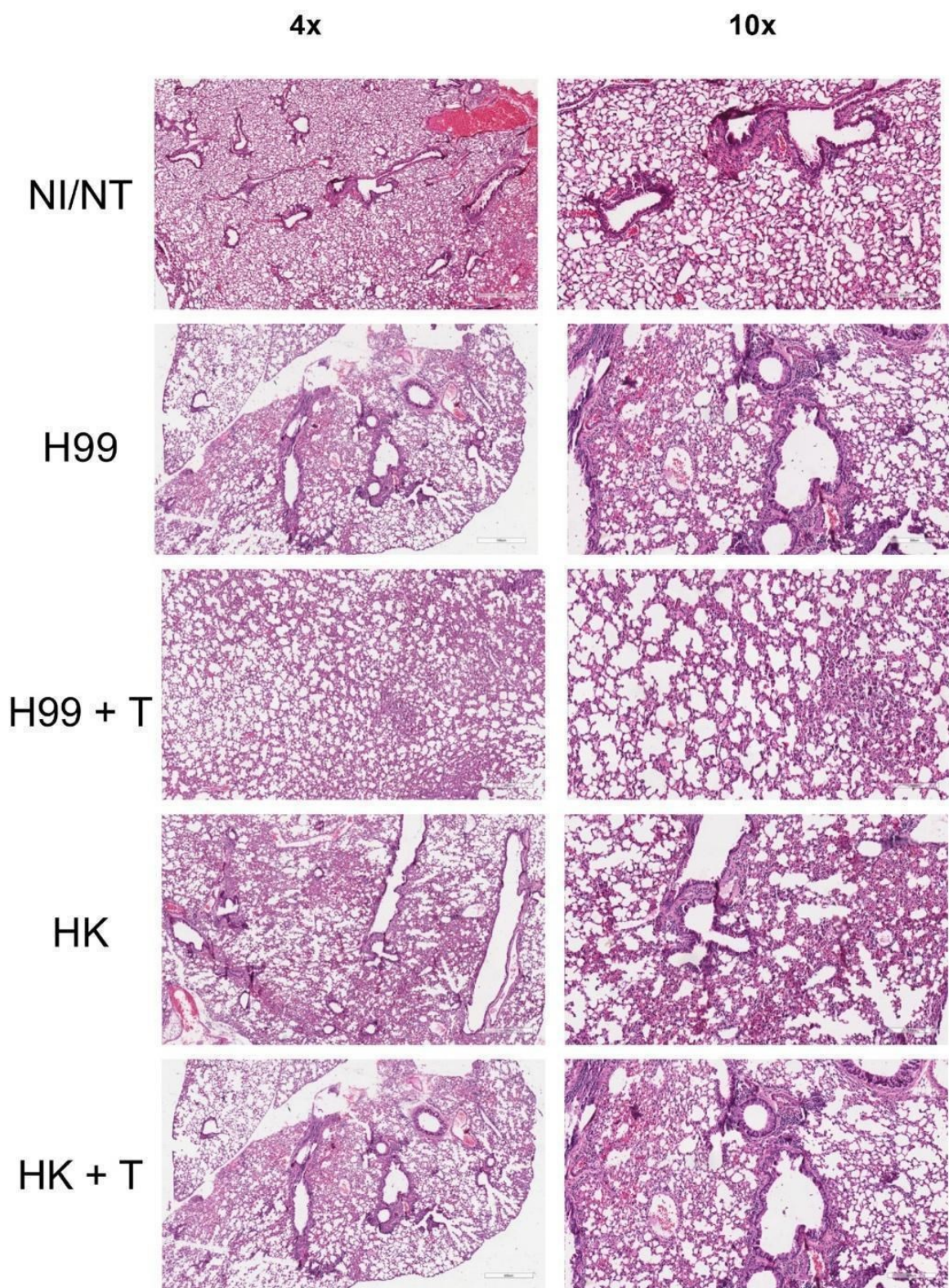


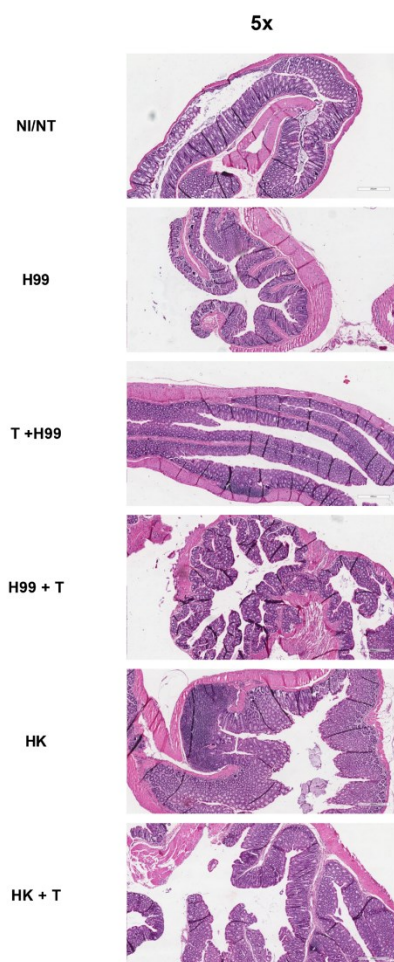
Figura 26. Corte histopatológico do tecido pulmonar de camundongos *Knock-out* para Dectina-1, 14 dias após infecção (intratraqueal) com o fungo *Cryptococcus neoformans*. Os cortes de histopatológico foram corados com hematoxilina-eosina (HE) e as imagens foram analisadas no programa ImageScope x64 nos aumentos de 4x e 10x.

As amostras de tecido pulmonar dos animais *Knock-out* para Dectina-1 infectados com o *C. neoformans* mostraram um padrão diferente do observado nas amostras dos animais selvagens, com um infiltrado inflamatório menor em todos os grupos estudados. Estes dados são compatíveis com os níveis de fungos viáveis observados na Figura 20 (Figura 26).

O receptor Dectina-1 tem sido associado a migração celular de queratinócitos (van den Berg et al., 2014) e mastócitos (Żelechowska et al., 2020) aos tecidos. Também é importante na produção de citocinas que aumentam a migração celular de células para o foco inflamatório. Apesar da sua ativação ser importante para produção de citocinas do padrão Th17 (LeibundGut-Landmann et al., 2007) não observamos uma carga fúngica alta nos tecidos pulmonares, tanto nas análises histopatológicas como nos UFC.

As amostras de cólon, analisadas em aumento 5x, não apresentam infiltrados inflamatórios significativos e é possível observar a manutenção da estrutura histológica da porção intestinal, tanto na figura 27A como na Figura 27B (Figura 27).

A - Wt



B – Knock-out Dectina-1

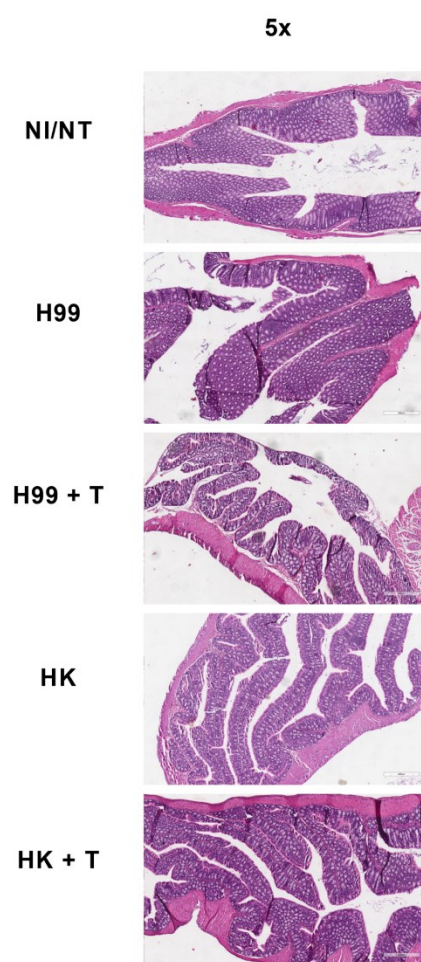


Figura 27. Corte histopatológico do tecido intestinal de camundongos c57BL/6J e KO, 14 dias após infecção (intratraqueal) com o fungo *Cryptococcus neoformans*. Os cortes de histopatológico foram corados com hematoxilina-eosina (HE) e as imagens foram analisadas no programa ImageScope x64 nos aumentos de 5x.

6. Capítulo IV – Análise da atividade *in vitro* da fucomanogalactana e beta-glucana extraída do micélio

A bioatividade de polissacarídeos é um dos fatores atrativos para as indústrias biofarmacêuticas e alimentícias (Chakraborty et al., 2020). Dentre os polissacarídeos encontrados em cogumelos, β -glucanas são mais estudadas por serem consideradas moléculas modificadoras de resposta biológica (*Biological Response Modifiers*) devido a sua atividade imunomodulatória, importante no controle e prevenção de doenças. Entretanto, pouco se sabe sobre a atividade de heteropolissacarídeos obtidos de macrofungos, que possuem grande

variedade estrutural e são potenciais modificadores de resposta biológica (Ruthes et al., 2016; Caldas et al., 2022).

Basso e colaboradores (2019) observaram que o tratamento de células derivadas de medula óssea, macrófagos (GM-CSF), macrófagos (LCCM) e células dendríticas, ativa via o receptor Dectina-1, a produção de TNF- α e IL-10 bem como a produção de óxido nítrico. Em um contexto de infecção *in vitro* com o fungo *C. neoformans* observaram, também, que o tratamento aumentou o índice de morte fúngica, indicando que o tratamento conferiu uma atividade fungicida (Basso et al., 2019).

Portanto, avaliamos se a fucomanogalactana e beta-glucana extraídas do micélio teria a mesma atividade em regular a resposta imune inata de células de medula óssea.

6.1. Materiais e Métodos

6.1.1. Obtenção e Diferenciação de células derivadas de medula óssea

Para o procedimento, a eutanásia dos camundongos ocorreu por asfixia em câmara fechada de CO₂. Em local estéril, foram coletados a tíbia e o fêmur dos camundongos para o lavado e obtenção das células derivadas de medula óssea conforme o procedimento descrito em Madaan e colaboradores (2014). Brevemente, os ossos foram lavados com meio RPMI-1640 (Gibco, ref. 23400-013) gelado, até observar a completa remoção da medula óssea. Após o lavado, a suspensão contendo células foi centrifugada (300 xg, por 5 minutos a 4 °C) e o sobrenadante descartado. As células foram tratadas com tampão de lise de hemácias e lavadas. A concentração final de células foi determinada por contagem em câmara de Neubauer utilizando o corante de viabilidade azul de trypan para excluir células mortas.

A concentração de células foi ajustada de forma que 2×10^6 células foram plaqueadas em placas de Petri, contendo 10 mL de meio RPMI-1640 suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB) inativado e estimuladas para obtenção do fenótipo desejado, em um processo de 7 dias de diferenciação.

Para obter o fenótipo característico de M1 (Macrófago (GM-CSF)), as células foram diferenciadas com a adição de rmGM-CSF (20 ng/ml; ImmunoTools, ref. 12343123) em meio RPMI-1640 suplementado com 10 % de SFB e 50 μ M 2-mercaptoetanol, conforme descrito em Lutz *et al.* (1999). Já para o fenótipo característico M2 (Macrófago (M-CSF)), o meio de

diferenciação foi suplementado com a adição de 30% de meio condicionado de células de fibroblasto (L929) que contém M-CSF e 20% de SFB. As células foram acondicionadas em estufa a 37 °C com injeção de 5% de CO₂. Durante o período de diferenciação, no terceiro dia adicionamos mais 10 mL de meio de diferenciação com as mesmas condições de suplementação. No sexto dia, as células foram lavadas e o meio de diferenciação foi repostado para as células de fenótipo M1. No oitavo dia, o meio das placas de cultivo foi descartado e as células diferenciadas foram tratadas com solução TrypLE Express (Gibco, ref. 12604-013) por 20 minutos para desaderirem da placa de petri. A quantidade de células foi determinada e a concentração ajustada para as condições experimentais, com 1 x 10⁶ células/mL. As células foram então plaqueadas em placas de 96- ou 48-poços e foram incubadas por 24 horas na estufa a 37 °C com injeção de 5% de CO₂ para que as células aderissem a placa.

6.1.2. Ensaio de Interação de Macrófagos GM-CSF e M-CSF com o polissacarídeo

Para os ensaios de interação, as células, na concentração de 1x10⁶ células/mL, foram incubadas com o polissacarídeo (6,25 - 200 µg/mL), com e sem adição de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS, 500 ng/ml, Sigma-Aldrich) ou Zymosan (100 µg/mL, InvivoGen, ref. tlrl-zyn) por 24 horas. Após esse período, o sobrenadante do cultivo foi coletado para a quantificação de citocinas, pela técnica de ELISA, e de óxido nítrico.

6.1.3. Produção de óxido nítrico

A avaliação da produção de óxido Nítrico foi realizada pela quantificação indireta de nitrito (NO₂⁻) pela reação de Griess (Bryan; Grisham, 2007). Como controle da produção, utilizou-se o sobrenadante de células estimuladas com LPS (100 ng/mL) + IFN-γ (20 ng/mL). Para quantificação, preparou-se uma curva padrão de nitrito (100 - 1,56 µM). Em uma placa de 96 poços, foram adicionados 50 µL de cada amostra e 50 µL da solução de Griess (solução de sulfanilamida + solução de NEED) a temperatura ambiente, e a reação ocorreu por 5-10 minutos em local protegido da luz. Após esse período, a absorbância foi avaliada em 540 nm em um espectrofotômetro.

6.1.4. Ensaio de morte fúngica

Para avaliar a capacidade fungicida de macrófagos, as células obtidas a partir do processo de diferenciação previamente descrito, foram estimuladas e plaqueadas na

concentração de 1×10^6 células/mL por 24 horas com LPS (100 ng/mL) + IFN- γ (20 ng/mL), Zymosan Depletado (100 μ g/mL) (InvivoGen, ref. tlrl-zyd) e com o polissacarídeo (12,5 - 100 μ g/mL).

Um dia antes da infecção, foi preparado um inóculo de *C. neoformans* conforme descrito para o preparo da levedura para infecção animal. No dia da infecção, as células de levedura foram lavadas e sua concentração foi ajustada para uma Multiplicidade de Infecção (MOI) de 3 células de levedura para cada macrófago. Trinta minutos antes da infecção, o fungo foi opsonizado com o anticorpo monoclonal 18B7 (10 μ g/mL), gentilmente cedido pelo Dr. Arturo Casadevall, a fim de facilitar o reconhecimento das leveduras pelos macrófagos.

As células foram incubadas por um período de 2 horas e, em seguida, foram lavadas com meio RPMI-1640 para remoção de leveduras não fagocitadas. Para avaliar a internalização, no ponto de 2 horas, as células foram lisadas com uma solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 0,05% e então o material foi diluído e plaqueado em placas de YPD ágar incubadas à 30 °C, por 48-72 horas, para avaliar o crescimento de unidades formadoras de colônias (UFC). Para avaliar a morte fúngica, 24 horas após a infecção as células foram lisadas e avaliadas quanto ao crescimento de UFC, da mesma forma que o primeiro ponto. Para determinação da morte fúngica, calculou-se a diferença entre a quantidade de UFC entre os pontos de 24 horas e a média da triplicata do ponto de 2 horas de cada grupo.

6.1.5. Análise estatística

Todos os resultados desta parte do trabalho foram analisados com desvio padrão (SD) da triplicata biológica feita de um dos experimentos independentes, de um total de duas análises técnicas. Para avaliar estatisticamente diferenças entre grupos experimentais a análise da variância (One-way ANOVA), foram utilizados pelo *software GraphPad Prism* (versão 8.0). Os dados foram considerados significantes quando $p < 0,05$.

6.2. Resultados e Discussão

6.2.2. Avaliação da produção de citocinas e óxido nítrico por macrófagos estimulados por 24 horas com o polissacarídeo

É possível avaliar que o estímulo com o polissacarídeo promoveu a produção de TNF- α , tanto para macrófagos (GM-CSF) que possuem o receptor Dectina-1 quanto para macrófagos

obtidos de camundongos *Knock-out* para o receptor, de maneira dependente da concentração (Figuras 28 A, B). O mesmo efeito foi observado, embora menos expressivo, em macrófagos diferenciados com LCCM (Figura 30). Atividade semelhante foi observada para a interação dos exopolissacarídeos com macrófagos (GM-CSF (M1)) analisados por Basso et al. (2019), embora os polissacarídeos analisados tenham maior secreção de TNF- α em macrófagos (LCCM (M2)).

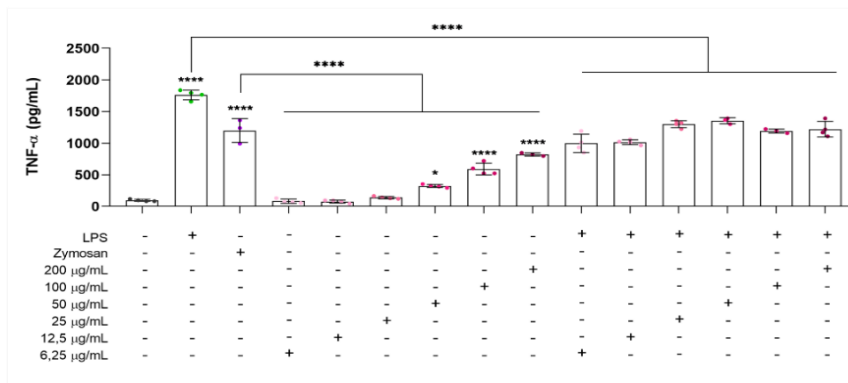
Entretanto, nas mesmas condições, não houve produção significativa de IL-10 quando as células de ambos os genótipos foram estimuladas com os polissacarídeos. Para as células *Knock-out* para o receptor Dectina-1, utilizamos também como controle Zymosan depletado (100 μ g/mL), que se liga somente ao receptor (Figura 29).

Também observamos a produção de óxido nítrico, com base em uma curva de concentração de nitrito medida em uma reação de Griess. A concentração de nitrito detectada na amostra foi, também, dose dependente para macrófagos diferenciados com GM-CSF (Figura 31 A) e para macrófagos diferenciados com LCCM, embora em menor quantidade (Figura 31 B).

Basso e colaboradores (2019) mostraram que o tratamento de macrófagos derivados de medula óssea com o exopolissacarídeo de *A. auricula* promoveu o aumento de morte fúngica. Na figura 32, observamos que o tratamento com o polissacarídeo obtido do micélio conseguiu promover maior porcentagem de morte fúngica nas concentrações de 25 μ g/mL e 50 μ g/mL do que na concentração de 100 μ g/mL.

Em Ferreira e colaboradores (2015) resume-se que a atividade imunomodulatória *in vitro* de homopolissacarídeos e heteropolissacarídeos de cogumelos está atrelada ao aumento na produção de citocinas, como TNF- α e IL-10, bem como à produção de óxido nítrico em macrófagos, o que junto com a diversidade estrutural coloca essas moléculas como potenciais modificadores de respostas biológicas. Zhang e colaboradores (2018) descrevem essa atividade para exopolissacarídeos solúveis de *Auricularia auricula* que possuem diferenças estruturais e conformacionais sendo possível inferir que a ativação destas células pode ocorrer por diferentes vias de sinalização. Além desses fatores, a atividade também pode ser alterada pelo método de extração e purificação utilizados, bem como pela presença de diferentes polissacarídeos que observadas na amostra obtida da extração da parede do micélio (Ferreira et al., 2015; Ruthes et al., 2016; Zhang et al., 2018; Basso et al., 2019; Miao et al., 2020).

A Macrófago (GM-CSF) – Selvagem (Wt)



B Macrófago (GM-CSF) – Knock-out Dectina-1

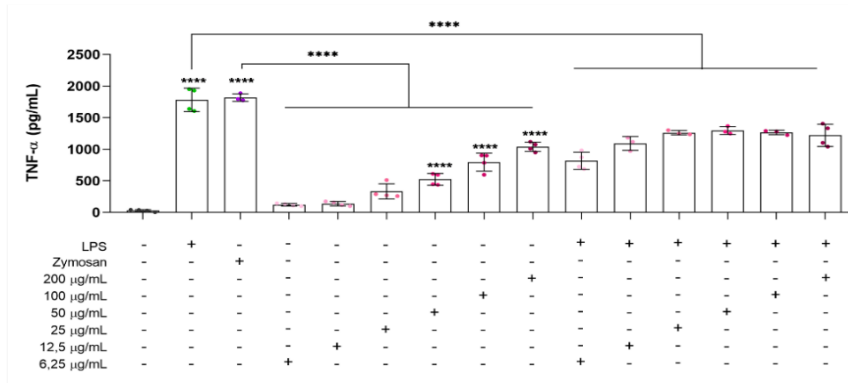
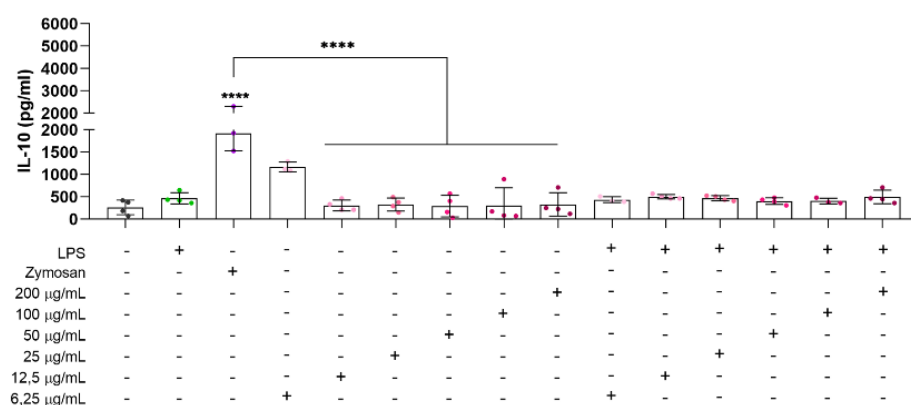


Figura 28. Produção de TNF- α avaliada no sobrenadante do cultivo de macrófagos após estímulo de 24 horas com heteropolissacarídeo, nas concentrações de 6,25-200 $\mu\text{g/mL}$, LPS – 500 ng/mL e Zymosan – 100 $\mu\text{g/mL}$. (A) Sobrenadante de macrófagos obtidos de camundongos c57BL/6J, diferenciados na presença de GM-CSF; (B) Sobrenadante de macrófagos obtidos de camundongos Knock-out para Dectina-1, diferenciados com GM-CSF. Análise estatística One-way ANOVA compara células não estimuladas aos tratamentos. Experimento realizado em triplicata biológica. p significativo quando $< 0,05$.

A Macrófago (GM-CSF) – Selvagem (Wt)



B Macrófago (GM-CSF) – Knock-out Dectina-1

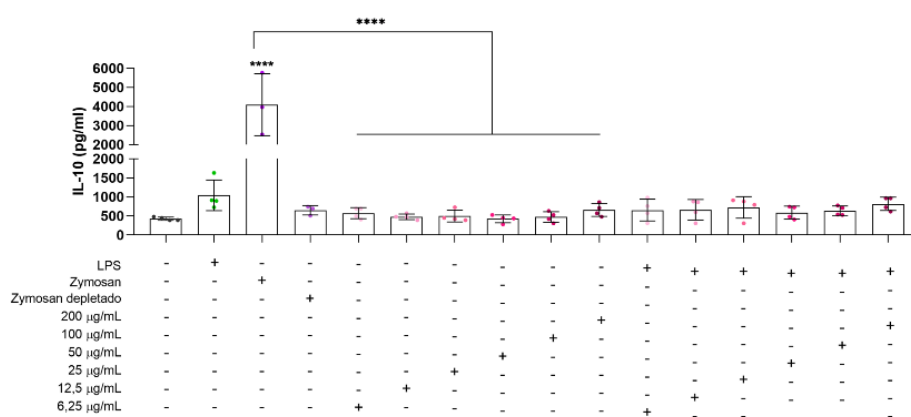


Figura 29. Produção de IL-10 avaliada no sobrenadante do cultivo de macrófagos após estímulo de 24 horas com polissacarídeo, nas concentrações de 6,25-200 µg/mL, LPS – 500 ng/mL e Zymosan/Zymosan depletado – 100 µg/mL. (A) Sobrenadante de macrófagos obtidos de camundongos c57BL/6J, diferenciados na presença de GM-CSF; (B) Sobrenadante de macrófagos obtidos de camundongos Knock-out para Dectina-1, diferenciados com GM-CSF. Análise estatística One-way ANOVA compara células não estimuladas aos tratamentos. Experimento realizado em triplicata biológica. p significativo quando < 0,05.

A Macrófago (LCCM) – Selvagem (Wt)

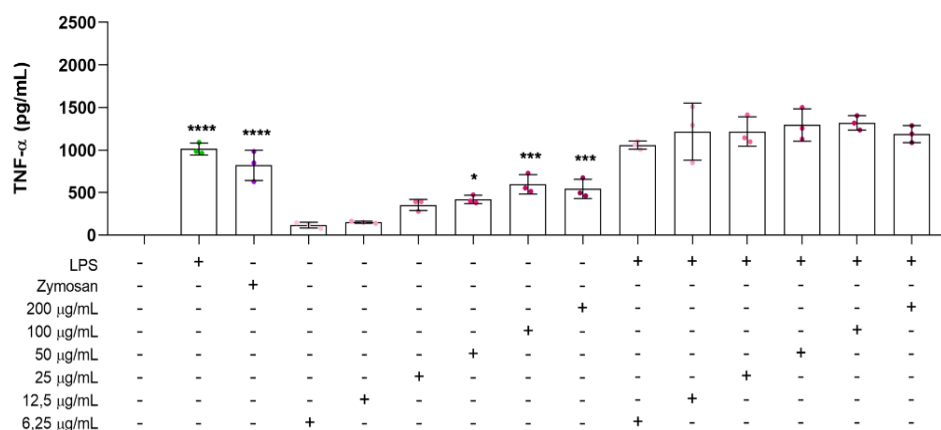


Figura 30. Produção de TNF- α avaliada no sobrenadante do cultivo de macrófagos após estímulo de 24 horas com polissacarídeo, nas concentrações de 6,25-200 μ g/mL, LPS – 500 ng/mL e Zymosan – 100 μ g/mL. (A) Sobrenadante de macrófagos obtidos de camundongos c57BL/6J, diferenciados na presença de LCCM. Análise estatística One-way ANOVA compara células não estimuladas aos tratamentos. Experimento realizado em triplicata biológica. p significativo quando < 0,05.

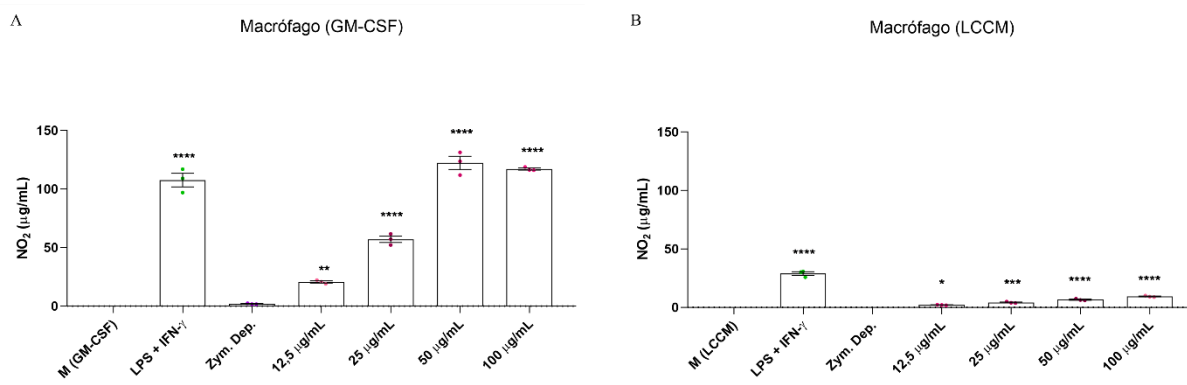


Figura 31. Produção de nitrito no sobrenadante do cultivo de macrófagos após estímulo de 24 horas com os polissacarídeos nas concentrações de 3,125-200 μ g/mL, LPS – 500 ng/mL e Zymosan – 100 μ g/mL. (A) Sobrenadante de macrófagos diferenciados na presença de GM-CSF; (B) Sobrenadante de macrófagos diferenciados com LCCM. Análise estatística One-way ANOVA compara células não estimuladas aos tratamentos. Experimento realizado em triplicata biológica. p significativo quando < 0,05.

6.2.2. Avaliação da carga fúngica em macrófagos 2 e 24 horas após infecção

Macrófago (GM-CSF)

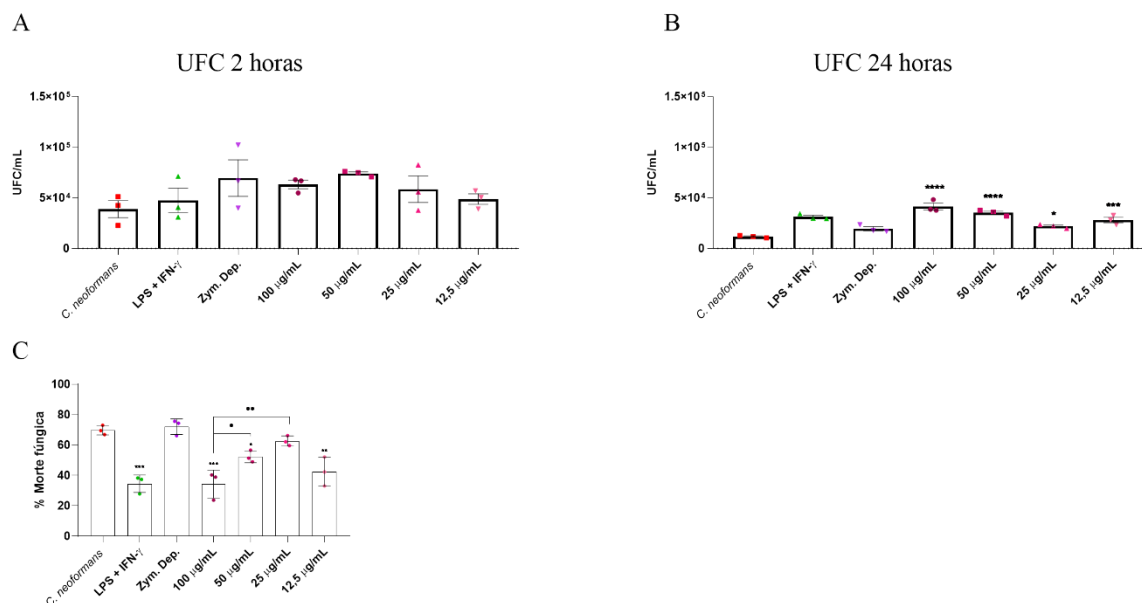


Figura 32 Avaliação da quantidade de unidades formadoras de colônia (UFC) obtidas em macrófagos (GM-CSF) após estímulo de 24 horas com os polissacarídeos nas concentrações de 12,5-100 µg/mL, LPS (100 ng/mL) + IFN-γ (20 ng/mL) e Zymosan depletado (100 µg/mL). Macrófagos (GM-CSF) foram infectados com 3×10^6 células/mL de *Cryptococcus neoformans*, previamente opsonizado com 18B7. (A) As células foram lisadas com SDS 0,05% e plaqueadas em YPD ágar, 2 horas após a infecção para determinar a fagocitose e (B) 24 horas após a infecção para ver a capacidade microbicida destas células. (C) Determinação da porcentagem morte fúngica pela diferença percentual entre a quantidade de UFC do ponto de 24 horas e a média de UFC do ponto de 2 horas. Análise estatística One-way ANOVA compara células não estimuladas aos tratamentos. Experimento realizado em triplicata biológica. p significativo quando $< 0,05$.

7. Conclusão

Concluimos neste projeto que apesar de serem extraídos do mesmo macrofungo e ativaram produção de TNF- α *in vitro*, a metodologia alterou a composição monossacarídica obtida ao final de ambos os processos. Os polissacarídeos obtidos do meio de cultura conseguiram controlar um processo inflamatório *in situ* no modelo de colite induzida por DSS.

O método de extração proposto no Capítulo II teve como resultado deste processo uma mistura polissacarídica de uma fucomanogalactana e beta-glucana. Esses, apesar de apresentarem uma resposta de ativação celular *in vitro*, não controlaram a disseminação fúngica para o sistema nervoso central.

8. Referências

1. URBEN, A. F. *et al.* Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada: biotecnologia e aplicações na agricultura e na saúde. 2017.
2. WANG, Qiong *et al.* Bioactive mushroom polysaccharides: a review on monosaccharide composition, biosynthesis and regulation. *Molecules*, v. 22, n. 6, p. 955, 2017.
3. CHAKRABORTY, Indranil *et al.* Bioactive polysaccharides from natural sources: A review on the antitumor and immunomodulating activities. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 22, p. 101425, 2019.
4. MAITY, Prasenjit *et al.* Biologically active polysaccharide from edible mushrooms: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 172, p. 408-417, 2021.
5. MIAO, Jingnan *et al.* Isolation, structural characterization and bioactivities of polysaccharides and its derivatives from *Auricularia*-A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 150, p. 102-113, 2020.
6. FERREIRA, Sónia S. *et al.* Structure–function relationships of immunostimulatory polysaccharides: A review. *Carbohydrate polymers*, v. 132, p. 378-396, 2015.
7. REGIS, Mary Ann Jully; GEÖSEL, András. Cultivation of *Auricularia* species: a review of the history, health benefits, principles, practices, environmental conditions, research methods, and recent trends. *Sydowia*, v. 76, p. 21, 2023.
8. ZHAO, Yuhui *et al.* Comparative transcriptome analysis reveals relationship of three major domesticated varieties of *Auricularia auricula-judae*. *Scientific reports*, v. 9, n. 1, p. 78, 2019.
9. LIU, Enchao *et al.* Review on *Auricularia auricula-judae* as a functional food: growth, chemical composition, and biological activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 69, n. 6, p. 1739-1750, 2021.
10. YU, Te *et al.* The current state and future prospects of *Auricularia auricula*'s polysaccharide processing technology portfolio. *Molecules*, v. 28, n. 2, p. 582, 2023.
11. ZHANG, Ying *et al.* Structural characterization and immunomodulatory activity of exopolysaccharides from submerged culture of *Auricularia auricula-judae*. *International journal of biological macromolecules*, v. 115, p. 978-984, 2018.
12. Beta Glucan relatório de mercado | Tamanho, participação, crescimento e tendências (2022-27). Mordorintelligence.com. Disponível em:

- <[https://www.mordorintelligence.com/pt/industry-reports/beta-glucan-market#:~:text=O%20mercado%20global%20de%20beta,previs%C3%A3o%20\(2021%20-%202026\)>](https://www.mordorintelligence.com/pt/industry-reports/beta-glucan-market#:~:text=O%20mercado%20global%20de%20beta,previs%C3%A3o%20(2021%20-%202026)>). Acesso em: 7 ago. 2023.
13. WU, Jing; DING, Zhong-Yang; ZHANG, Ke-Chang. Improvement of exopolysaccharide production by macro-fungus *Auricularia auricula* in submerged culture. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, n. 4, p. 743-749, 2006.
 14. CHAKRABORTY, Nilanjan et al. Mushroom polysaccharides: A potent immune-modulator. *Biointerface Res. Appl. Chem*, v. 11, n. 2, p. 8915-8930, 2021.
 15. CHEN, Nana et al. Polysaccharides from *Auricularia auricula*: Preparation, structural features and biological activities. *Carbohydrate polymers*, v. 247, p. 116750, 2020.
 16. PIROFSKI, Liise-anne; CASADEVALL, Arturo. Immune-mediated damage completes the parabola: *Cryptococcus neoformans* pathogenesis can reflect the outcome of a weak or strong immune response. *MBio*, v. 8, n. 6, p. e02063-17, 2017.
 17. BASSO, A. M. M. et al. Immunomodulatory activity of β -glucan-containing exopolysaccharides from *Auricularia auricular* in phagocytes and mice infected with *Cryptococcus neoformans*. *Medical mycology*, v. 58, n. 2, p. 227-239, 2020.
 18. BASSO, Angelina Maria Moreschi. Modulação da resposta imune inata de polissacarídeos de basidiomicetos na infecção experimental de *Cryptococcus neoformans*. 2017.
 19. TANG, Chao et al. The impacts of natural polysaccharides on intestinal microbiota and immune responses—a review. *Food & function*, v. 10, n. 5, p. 2290-2312, 2019.
 20. JAYACHANDRAN, Muthukumaran; XIAO, Jianbo; XU, Baojun. A critical review on health promoting benefits of edible mushrooms through gut microbiota. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 9, p. 1934, 2017.
 21. ARIIZUMI, Kiyoshi et al. Identification of a novel, dendritic cell-associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 26, p. 20157-20167, 2000.
 22. BROWN, Gordon D.; GORDON, Siamon. A new receptor for β -glucans. **Nature**, v. 413, n. 6851, p. 36-37, 2001.
 23. KIMBERG, Matti; BROWN, Gordon D. Dectin-1 and its role in antifungal immunity. **Medical mycology**, v. 46, n. 7, p. 631-636, 2008.
 24. CASADEVALL, Arturo; GOW, Neil AR. Ending the (Cell) wall metaphor in microbiology. **The Cell Surface**, v. 8, 2022.

25. BROWN, Gordon D. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 1, p. 33-43, 2006.
26. ARIIZUMI, Kiyoshi et al. Identification of a novel, dendritic cell-associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 26, p. 20157-20167, 2000.
27. KIMBERG, Matti; BROWN, Gordon D. Dectin-1 and its role in antifungal immunity. **Medical mycology**, v. 46, n. 7, p. 631-636, 2008.
28. BROWN, Gordon D.; GORDON, Siamon. A new receptor for β -glucans. **Nature**, v. 413, n. 6851, p. 36-37, 2001.
29. CHENG, Shih-Chin et al. The dectin-1/inflammasome pathway is responsible for the induction of protective T-helper 17 responses that discriminate between yeasts and hyphae of *Candida albicans*. **Journal of leukocyte biology**, v. 90, n. 2, p. 357-366, 2011.
30. KONG, Xianghui et al. Effects of polysaccharides from *Auricularia auricula* on the immuno-stimulatory activity and gut microbiota in immunosuppressed mice induced by cyclophosphamide. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 595700, 2020.
31. SHEN, Ting-Chin David. Diet and gut microbiota in health and disease. **Intestinal microbiome: functional aspects in health and disease**, v. 88, p. 117-126, 2017.
32. TÖRÖS, Gréta et al. Modulation of the Gut Microbiota with Prebiotics and Antimicrobial Agents from *Pleurotus ostreatus* Mushroom. **Foods**, v. 12, n. 10, p. 2010, 2023.
33. ZAKERSKA-BANASZAK, Oliwia et al. Dysbiosis of gut microbiota in Polish patients with ulcerative colitis: a pilot study. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 2166, 2021.
34. ZHAO, Qilong et al. The benefits of edible mushroom polysaccharides for health and their influence on gut microbiota: a review. **Frontiers in Nutrition**, v. 10, 2023.
35. SHEN, Zhao-Hua et al. Relationship between intestinal microbiota and ulcerative colitis: Mechanisms and clinical application of probiotics and fecal microbiota transplantation. **World journal of gastroenterology**, v. 24, n. 1, p. 5, 2018.
36. TANG, C. E. et al. Inhibition of dectin-1 signaling ameliorates colitis by inducing *Lactobacillus*-mediated regulatory T cell expansion in the intestine. **Cell host & microbe**, v. 18, n. 2, p. 183-197, 2015.

37. WANG, Yazhou et al. Deletion of both Dectin-1 and Dectin-2 affects the bacterial but not fungal gut microbiota and susceptibility to colitis in mice. **Microbiome**, v. 10, n. 1, p. 1-17, 2022.
38. ILIEV, Iliyan D. et al. Interactions between commensal fungi and the C-type lectin receptor Dectin-1 influence colitis. **Science**, v. 336, n. 6086, p. 1314-1317, 2012.
39. SAURUK DA SILVA, Karien et al. Beneficial effects of polysaccharides on the epithelial barrier function in intestinal mucositis. **Frontiers in Physiology**, v. 12, p. 714846, 2021.
40. JAWHARA, Samir. Healthy Diet and Lifestyle Improve the Gut Microbiota and Help Combat Fungal Infection. **Microorganisms**, v. 11, n. 6, p. 1556, 2023.
41. SOMMER, Felix et al. Microbiomarkers in inflammatory bowel diseases: caveats come with caviar. **Gut**, v. 66, n. 10, p. 1734-1738, 2017.
42. CARDOSO, Ana et al. The dynamics of interleukin-10-afforded protection during dextran sulfate sodium-induced colitis. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 400, 2018.
43. SANTUS, William; DEVLIN, Jason R.; BEHNSEN, Judith. Crossing kingdoms: how the mycobiota and fungal-bacterial interactions impact host health and disease. **Infection and Immunity**, v. 89, n. 4, p. 10.1128/iai. 00648-20, 2021.
44. HABIJANIC, Jožica et al. Submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* and the effects of its polysaccharides on the production of human cytokines TNF- α , IL-12, IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10 and IL-17. **New biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 85-95, 2015.
45. MIROŃCZUK-CHODAKOWSKA, Iwona; KUJAWOWICZ, Karolina; WITKOWSKA, Anna Maria. Beta-glucans from fungi: biological and health-promoting potential in the COVID-19 pandemic era. **Nutrients**, v. 13, n. 11, p. 3960, 2021.
46. CARBONERO, E. R. et al. *Lentinus edodes* heterogalactan: Antinociceptive and anti-inflammatory effects. **Food Chemistry**, v. 111, n. 3, p. 531-537, 2008.
47. MUKUMOTO, Takafumi; YAMAGUCHI, Haruki. The chemical structure of a mannofucogalactan from the fruit bodies of *Flammulina velutipes* (Fr.) Sing. **Carbohydrate Research**, v. 59, n. 2, p. 614-621, 1977.
48. RUTHES, Andrea Caroline et al. *Lactarius rufus* (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucans: Structure, antinociceptive and anti-inflammatory effects. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 1, p. 129-136, 2013.

49. RUTHES, Andrea C. et al. Structural characterization and protective effect against murine sepsis of fucogalactans from *Agaricus bisporus* and *Lactarius rufus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 1620-1627, 2012.
50. SHIDA, Mariko; HARYU, Kenji; MATSUDA, Kazuo. On the water-soluble heterogalactan from the fruit bodies of *Lentinus edodes*. **Carbohydrate research**, v. 41, n. 1, p. 211-218, 1975.
51. RUTHES, Andrea Caroline et al. Fucomannogalactan and glucan from mushroom *Amanita muscaria*: Structure and inflammatory pain inhibition. **Carbohydrate polymers**, v. 98, n. 1, p. 761-769, 2013.
52. OLIVEIRA, Ruberney S. et al. Structure elucidation of a bioactive fucomannogalactan from the edible mushroom *Hypsizygus marmoreus*. **Carbohydrate polymers**, v. 225, p. 115203, 2019.
53. MIRONCZUK-CHODAKOWSKA, Iwona; KUJAWOWICZ, Karolina; WITKOWSKA, Anna Maria. Beta-glucans from fungi: biological and health-promoting potential in the COVID-19 pandemic era. **Nutrients**, v. 13, n. 11, p. 3960, 2021.
54. CASADEVALL, Arturo; PIROFSKI, Liise-anne. What is a host? Incorporating the microbiota into the damage-response framework. *Infection and immunity*, v. 83, n. 1, p. 2-7, 2015.
55. ROHATGI, Soma; PIROFSKI, Liise-anne. Host immunity to *Cryptococcus neoformans*. *Future microbiology*, v. 10, n. 4, p. 565-581, 2015.
56. CASADEVALL, Arturo; COELHO, Carolina; ALANIO, Alexandre. Mechanisms of *Cryptococcus neoformans*-mediated host damage. *Frontiers in Immunology*, v. 9, p. 855, 2018.
57. DINIZ-LIMA, Israel *et al.* *Cryptococcus*: history, epidemiology and immune evasion. *Applied Sciences*, v. 12, n. 14, p. 7086, 2022.
58. RAJASINGHAM, Radha et al. The global burden of HIV-associated cryptococcal infection in adults in 2020: a modelling analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 22, n. 12, p. 1748-1755, 2022.
59. LI, Ya-Nan et al. Inhibition of myeloid-derived suppressor cell arginase-1 production enhances T-cell-based immunotherapy against *Cryptococcus neoformans* infection. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 4074, 2022.

60. VAN DEN BERG, Linda M. et al. Dectin-1 activation induces proliferation and migration of human keratinocytes enhancing wound re-epithelialization. *Cellular immunology*, v. 289, n. 1-2, p. 49-54, 2014.
61. ŻELECHOWSKA, Paulina et al. Curdlan stimulates tissue mast cells to synthesize pro-inflammatory mediators, generate ROS, and migrate via Dectin-1 receptor. *Cellular immunology*, v. 351, p. 104079, 2020.
62. LEIBUNDGUT-LANDMANN, Salomé et al. Syk-and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nature immunology*, v. 8, n. 6, p. 630-638, 2007.
63. YADAV, Bhawna *et al.* Differences in fungal immune recognition by monocytes and macrophages: N-mannan can be a shield or activator of immune recognition. *The Cell Surface*, v. 6, p. 100042, 2020.
64. CAMILLI, Giorgio; TABOURET, Guillaume; QUINTIN, Jessica. The complexity of fungal β -glucan in health and disease: effects on the mononuclear phagocyte system. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 673, 2018.
65. CALDAS, Lhaís A. et al. Immunomodulatory Effect of Polysaccharides from the Mushroom-Forming Basidiomycete *Gymnopilus imperialis* (Agaricomycetes, Basidiomycota). **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 10, p. 1179, 2022.
66. CHASSAING, Benoit *et al.* Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Current protocols in immunology*, v. 104, n. 1, p. 15.25. 1-15.25. 14, 2014.
67. MADAAN, Alka *et al.* A stepwise procedure for isolation of murine bone marrow and generation of dendritic cells. *J Biol Methods*, v. 1, n. 1, p. e1, 2014.
68. DUBOIS, Michel *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.
69. LUTZ, Manfred B. *et al.* An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *Journal of immunological methods*, v. 223, n. 1, p. 77-92, 1999.
70. BRYAN, Nathan S.; GRISHAM, Matthew B. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free radical biology and medicine*, v. 43, n. 5, p. 645-657, 2007.

Anexos

I. Anexo I - Autorização do Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA)



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 11 de dezembro de 2019.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "AVALIAÇÃO DA MODULAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL POR COGUMELOS MEDICINAIS EM MODELOS DE COLITE E DOENÇA DE PARKINSON", Protocolo n.º 18/2019, sob responsabilidade da Professora Anamélia Lorenzetti Bocca, foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de: *Mus musculus* (414 machos). A presente declaração é válida pelo período de: 11/12/2019 a 5/4/2023.



Dr. José Luiz Jivago de Paula Rôlo
Coordenador da CEUA – UnB



*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.

Anexo 1 Certificado do CEUA para modelo de colite

Brasília, 13 de agosto de 2021.

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA PELA BETA GLUCANA EXTRAÍDA DE BASIDIOMICETOS NA INFECÇÃO POR *C. NEOFORMANS***", SEI n.º 23106.074021/2021-11, sob responsabilidade da Professora Anamélia Lorenzetti Bocca, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal -CONCEA, e foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília, na 158ª reunião ordinária, realizada em 6/8/2021. Este projeto foi aprovado para utilização de: *Mus musculus* (161 machos) e *Knockout* (162 machos), com procedência do biotério central da Universidade de São Paulo e do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília. O presente certificado é válido pelo período de 01/9/2021 a 31/8/2025.



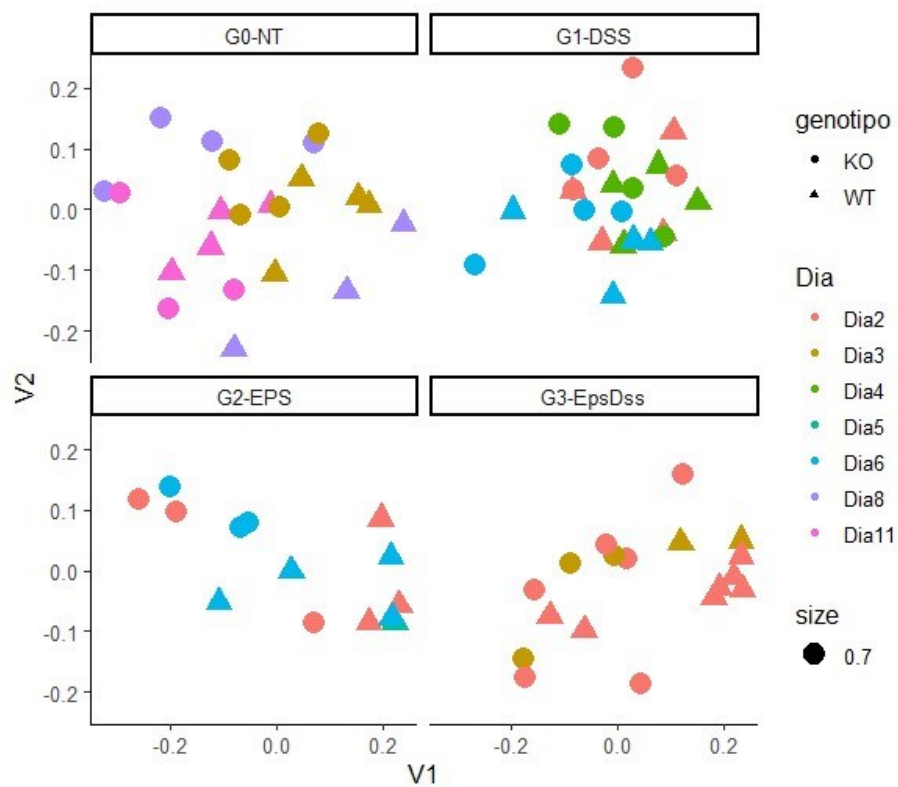

Dr. José Luiz Jivago de Paula Rôlo
Coordenador da CEUA – UnB



*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.

Anexo 2 Certificado do CEUA para modelo de infecção por *C. neoformans*.

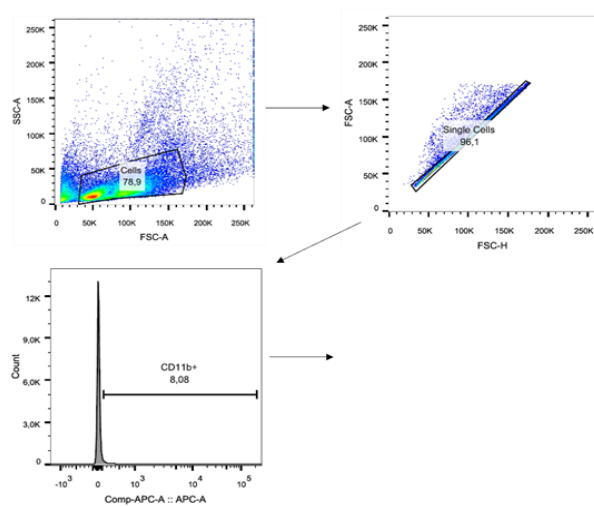
II. Anexo II – Sequenciamento das populações microbianas presente no conteúdo fecal dos camundongos em modelo de colite induzida por DSS



Anexo 3 Representação do sequenciamento das amostras fecais colhidas no modelo de colite.

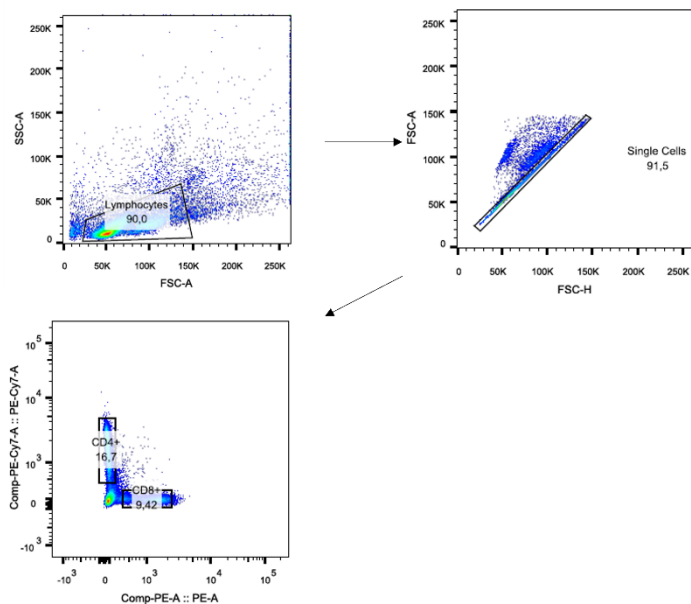
III. Anexo III – Estratégia de seleção de fenotipagem de esplenócitos

Painel 1



Anexo 4 Estratégia de seleção de células do painel 1.

Painel 2



Anexo 5 Estratégia de seleção de células do painel 2.

IV. Composição monossacarídica e tempos de retenção em coluna HP5

Tabela Anexo 1 Tempos de retenção dos monossacarídeos em coluna HP5.

	Monossacarídeos Controle		Tempo de Retenção
Desoxi- ribose	Fuc	Fucose	16,965
Pentoses	Rib	Ribose	16,859
	Xyl	Xilose	17,284
Hexose	Man	Manose	22,055
	Gal	Galactose	22,685
	Glc	Glicose	22,386