



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA
CELULAR

ESTUDO DA AÇÃO IMUNOMODULATÓRIA DO ÁCIDO KÓJICO SOBRE AS
CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS

CAROLINE MARTINS ALMEIDA

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Edilene Oliveira da Silva

BELÉM

2015

CAROLINE MARTINS ALMEIDA

**ESTUDO DA AÇÃO IMUNOMODULATÓRIA DO ÁCIDO KÓJICO SOBRE AS
CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociência e Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção de grau de mestre.

Orientadora: Prof^a Dr^a Edilene Oliveira da Silva

BELÉM, 2015

BELÉM, 2015

**ESTUDO DA AÇÃO IMUNOMODULATÓRIA DO ÁCIDO KÓJICO SOBRE AS
CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS**

CAROLINE MARTINS ALMEIDA

Orientadora: **Prof^a Dr^a Edilene Oliveira da Silva**

Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociência e Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção de grau de mestre.

Membro: **Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Bahia**

Instituto de Ciências Biológicas – UFPA

Membro: **Prof. Dr. Francisco Acácio Alves**

Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

Suplente: **Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento**

Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

Belém (PA), 03 de Novembro de 2015.

Esta dissertação foi desenvolvida no Laboratório de Protozoologia e Biologia Estrutural (LBE) do Instituto de Ciências Biológicas, em colaboração com o Laboratório de Microscopia do Instituto Evandro Chagas. O apoio financeiro foi proveniente do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Instituto Nacional de Ciência, Biologia Estrutural e Bioimagem (INBEB), Programa Nacional de Cooperação Acadêmica - Novas Fronteiras (PROCAD) pelo projeto “Cooperação Interinstitucional em Neurociências e Biologia Celular em Modelos Experimentais de Interesse na Região Amazônica”, para realização do mestrado sanduiche no Laboratório de Agregação de Proteínas Amiloidoses (LAPA), da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

“A mente que se abre à uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original.”

(Albert Einstein)

A Deus pela bondade de me conceder tantas oportunidades,

Aos meus pais e irmãos pelo infinito amor e apoio,

À vida, pelo desafio.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus por todas as bênçãos concedidas a mim, por estar sempre presente em minha vida, ser sempre tão fiel e nunca me deixar desistir mesmo nos momentos em que pensei que não conseguiria.

À todos meus familiares que sempre me apoiaram, principalmente ao meu pai Francisco, minha mãe Fátima, meus irmãos João e Isabelle e minhas avós Elza e Conceição e a Pituxa pelo carinho e dedicação depositados em mim ao longo da minha vida. Vocês são meu porto seguro. Amo demais todos vocês.

Ao João, que ao longo de 9 anos tem apoiado todas minhas escolhas, por sempre me incentivar a crescer intelectualmente, pelo carinho e compreensão, e por ser meu grande companheiro em tudo. Obrigada até mesmo pelos “puxões de orelha”, pode não parecer mas eles foram fundamentais, acredite.

À Billie por sempre fazer meu coração transbordar de alegria e de paz, mesmo nos momentos mais estressantes e difíceis, por sempre acalmar meu espírito. Obrigada pelo amor incondicional e por toda lealdade.

À minha orientadora Profa. Dra. Edilene Oliveira da Silva, pelo exemplo, pelos incentivos, pelas cobranças diárias e também por aceitar me orientar neste trabalho. Obrigada pela paciência, pela oportunidade e por toda sua dedicação em manter o nosso Laboratório ativo.

Ao Bruno, pela grande parceria nos inúmeros experimentos que fizemos juntos, por todas as segundas-feiras estressantes que passamos obtendo medula por sempre estar disposto a me ajudar, e principalmente pela amizade.

Aos amigos Luis Henrique e Ana Paula, que além da companhia e das conversas engraçadas, me ensinaram a processar o material para microscopia e pelo apoio com os gráficos e o uso do citômetro de fluxo. Muito obrigada também pelas contribuições e conselhos!

À minha amiga Lienne, que tive o prazer de conhecer melhor neste período, pelos conselhos, contribuindo sempre com ideias de como melhorar a escrita do meu trabalho, pelo companheirismo e por toda atenção. Ah, pelos Brownies depois do almoço também. Obrigada!!!

À Neide pelas palavras sempre tão positivas, pelos cafés da manhã surpresa sempre maravilhosos e pelas ideias de como melhorar meu trabalho e pela ajuda em alguns protocolos.

Aos meus amigos Rodrigo, Raquel, Amanda, Paula, Sandro, Evellen, Davi, Jorge, Fernanda, Vanessa e Letícia pela contribuição e pelas palavras amigas que ouvi em momentos de desespero, pelos risos e momentos alegres e descontraídos que todos me proporcionaram ao longo deste trabalho. Obrigada pelo apoio e contribuição!

Ao Laboratório de Agregação de Proteínas e Amiloidoses da UFRJ, a Estefânia e a Profa. Dra. Débora Foguel pela ajuda na realização dos experimentos de Western blot.

Agradeço também a todos que não citei mas que contribuíram com meu trabalho, que me apoiaram e que torceram pela minha vitória. Muito Obrigada.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	17
1.1.MEDULA ÓSSEA.....	17
1.2.MICROAMBIENTE MEDULAR	17
1.3.FATORES DE CRESCIMENTO E CITOCINAS ENVOLVIDAS NO PROCESSO DE DIFERENCIAÇÃO	18
1.4.HEMATOPOIESE E CÉLULAS TRONCO HEMATOPOIÉTICAS.....	19
1.5.SISTEMA FAGOCÍTICO MONONUCLEAR ORIGINADO A PARTIR DE CTH	22
1.5.1.Monócitos	22
1.5.2.Macrófagos derivados de monócito	23
1.5.3.Células dendríticas (CD) derivadas de monócitos	28
1.6.IMUNOMODULADORES	29
1.7.ÁCIDO KÓJICO.....	30
2.OBJETIVOS	33
2.1.OBJETIVO GERAL	33
2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	33
3.MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1.FLUXOGRAMA	34
3.2.OBTENÇÃO DOS ANIMAIS.....	35
3.3.OBTENÇÃO E PREPARO DO ÁCIDO KÓJICO (AK).....	35
3.4.PREPARO E COLETA DE CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS.....	35

3.5.CULTIVO DAS CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA.....	36
3.6.TESTES DE VIABILIDADE CELULAR	36
3.6.1.Método do <i>Thiazolyblue</i> (MTT)	36
3.6.2. Detecção de Apoptose em células da medula óssea tratadas com AK.	37
3.7.CONTAGEM DAS CÉLULAS MONONUCLEARES OBTIDAS DO SOBRENADANTE DAS CULTURAS CELULARES DA MEDULA ÓSSEA.	37
3.8.ANÁLISE MORFOLÓGICA.....	38
3.9.DETECÇÃO DE PROTEÍNAS ENCONTRADAS NAS VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR ENVOLVIDAS NA DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES.....	38
3.9.1.Western Blotting.....	38
3.10.DETECÇÃO DE MARCADORES DE SUPERFÍCIE CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO	39
3.11.RESPOSTA MICROBICIDA DAS CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA TRATADAS COM AK.....	39
3.11.1.Dosagem da produção de Oxido Nítrico (NO) pelas células da medula óssea tratadas com AK.....	39
3.11.2.Dosagem da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) pelas células da medula óssea tratadas com AK	40
3.11.2.1.Dosagem de radicais superóxidos pelo método do Nitroblue Tetrazolium (NBT).....	40
3.11.2.2.Pelo kit CellROX®	41
3.11.3.Análise da atividade fagocítica das células da medula óssea tratadas com AK.....	39
3.12.ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41

4.RESULTADOS42
4.1.VIABILIDADE CELULAR.....	42
4.1.1.Citotoxicidade do AK através do teste MTT.....	42
4.1.2.Determinação de células apoptóticas e necróticas da medula óssea tratadas com AK.....	42
4.2.ANÁLISE QUANTITATIVA DAS CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA TRATADAS COM AK.....	44
4.2.1.Análise quantitativa das células do sobrenadante das culturas de células da medula óssea.....	44
4.2.2.Quantificação e tipos celulares observados após o tratamento com AK.....	45
4.2.2.1.Monócitos	45
4.2.2.2.Macrófagos residentes	45
4.2.2.3.Macrófagos ativados.....	46
4.3.ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA TRATADAS COM AK.....	48
4.4.DETECCÃO DE PROTEÍNAS ENCONTRADAS NAS VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR ENVOLVIDAS NA DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES.....	53
4.5.CARACTERIZAÇÃO POR CITOMETRIA DE FLUXO DAS CÉLULAS TRATADAS COM AK ATRAVÉS DE MARCADORES DE SUPERFÍCIE.....	53
4.5.1.Marcação com a proteína de superfície CD11b	53
4.5.2.Marcação com a proteína de superfície F4/80.....	54
4.5.3.Marcação com a proteína de superfície CD11c.....	55

4.6.RESPOSTA MICROBICIDA DAS CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA TRATADAS COM AK.....	56
4.6.1.Análise da atividade fagocítica de células da medula óssea tratadas com AK.....	56
4.6.2.Dosagem da produção de NO pelas células da medula óssea tratadas com AK	57
4.6.3.Dosagem da produção de ERO de células da medula óssea tratadas com AK	58
4.6.3.1.Pelo método do Nitroblue Tetrazolium (NBT).....	58
4.6.3.2.Pelo kit CellROX®.....	59
5.DISSCUSSÃO	61
6.CONCLUSÃO.....	67
7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Figura 1. Figura esquemática mostrando as principais citocinas envolvidas na hematopoiese e na diferenciação das células da medula óssea	19
Figura 2. Imagem ilustrativa da hematopoiese e os marcadores de superfície expressos nos diferentes estágios de diferenciação da CTH.	21
Figura 3. Diferenciação de monócitos a partir das CTH presentes na medula óssea.	23
Figura 4. Precursores envolvidos na diferenciação dos macrófagos e as denominações e morfologias de macrófagos encontrados em diferentes locais do organismo.	25
Figura 5. Desenho esquemático da ação da enzima iNOS sobre a L-arginina.	26
Figura 6. Formas de polarização que os macrófagos podem sofrer e suas propriedades funcionais específicas para cada tipo de estímulo derivado do microambiente durante a ativação.	27
Figura 7. Estrutura química do ácido kójico, 5-hidroxi-2-hidroximetil- γ -pirona.	30
Figura 8. Fluxograma mostrando as atividades realizadas para avaliar a ação do AK sobre as células da medula óssea de camundongos.	34
Figura 9. Viabilidade celular pelo método MTT em células da medula óssea	43
Figura 10. Detecção de apoptose por citometria de fluxo em macrófagos tratados com AK no período de 96 horas de cultivo.	43
Figura 11. Análise quantitativa das células do sobrenadante em culturas de medula óssea tratadas com o AK por 24, 48, 72 e 96 de cultivo.	44
Figura 12. Análise quantitativa dos tipos celulares encontrados em culturas de medula óssea tratadas com o AK-100 $\mu\text{g/mL}$ por 24, 48, 72 e 96 horas.	47
Figura 13. Imagens de microscopia de campo claro das células cultivadas após 24 horas.	50
Figura 14. Imagens de microscopia de campo claro das células cultivadas após 48 horas.	50
Figura 15. Imagens de microscopia de campo claro das células cultivadas após 72	

horas.....	52
Figura 16. Imagens de microscopia de campo claro das células cultivadas após 96 horas.....	52
Figura 17. Detecção de proteínas Akt e PDK1 envolvidas na via de sinalização celular que induz a diferenciação das células mononucleares.....	53
Figura 18. Detecção do marcador de superfície CD11b através da citometria de fluxo em células da medula cultivadas após 96 horas.....	54
Figura 19. Detecção do marcador de superfície F4/80 através da citometria de fluxo em células da medula óssea de camundongos cultivadas após 96 horas.....	55
Figura 20. Detecção do marcador de superfície CD11c através da citometria de fluxo em células da medula cultivadas após 96 horas.....	56
Figura 21. Índice endocítico da interação de células da medula óssea tratadas com AK-100 µg/mL por 96 horas e infectadas com <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	57
Figura 22. Dosagem de óxido nítrico (NO) de células tratadas com a concentração de AK-100 µg/mL por 96 horas.....	58
Figura 23. Detecção da produção de superóxido através da reação citoquímica com NBT em macrófagos derivados da medula óssea tratada com AK-100 µg/mL por 96 horas.....	59
Figura 24. Detecção da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) em células da medula óssea tratados com AK-100 µg/mL por meio do marcador fluorescente CellRox® Green.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS

AK – Ácido Kójico

APC – Células apresentadoras de antígenos

CCL17 – quimiocina

CCL22 – quimiocina

CFE - Fatores estimuladores de colônias

CFU-GM - unidades formadoras de colônias de granulócitos/monócitos/macrófagos

CFU-M - unidades formadoras de colônias de macrófagos

CTH - células tronco hematopoiéticas

DMEN - Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO – Dimetilsufóxido

ERO – Espécies reativas de Oxigênio

GM-CSF - fator estimulador de colônia de granulócitos/monócitos/macrófagos)

G-CSF - fator estimulador de colônia de granulócitos

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

HMP – 5-hidroxi-2-hidroximetil- γ -pirona

INF - interferon

iNOS – óxido nítrico sintetase induzida

IL - interleucinas

IP – iodeto de propídio

LPS – Lipopolisacarídeos

M1 – Macrófagos ativados pela via clássica

M2 – macrófagos ativados pela via não clássica

M-CSF – fator estimulador de colônias de macrófagos

MEC - matriz extracelular

MTT – Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide

MHC - complexo principal de histocompatibilidade

MO – Medula óssea

NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NO – Óxido nítrico

O_2^- – Íon superóxido

PBS – tampão fosfato salino

OH^- – Radical hidroxila

SBF – Soro bovino fetal

SOD – Superóxido dismutase

TGF- fator de crescimento transformador

TNF - fator de necrose tumoral

RESUMO

A medula óssea é um tecido de aspecto gelatinoso que contém células hematopoiéticas responsáveis pela proliferação e diferenciação das células sanguíneas circulantes. A proliferação de monócitos na medula óssea e a diferenciação destas células em macrófagos desempenham papel crucial para a resposta imune. Neste contexto, a busca por medicamentos que potencializem a resposta imune inata se faz necessária para restaurar a homeostasia e resposta imune. O Ácido Kójico (AK) é um metabólito secundário obtido de fungos do gênero *Aspergillus* que apresenta várias aplicações (aditivo alimentar, cosméticos, agente antitumoral, radioprotetor e ativador de macrófagos), por este motivo, este trabalho tem o objetivo de avaliar a ação imunomodulatória do AK em células da medula óssea de camundongos. Estas células foram obtidas a partir de fêmures de camundongos, tratadas com AK na concentração de 100 µg/mL e mantidas em cultura por 24-96 horas. Foi possível observar através da microscopia óptica que células mononucleares da medula óssea tratadas com AK promoveram o aumento da adesão celular, maior espriamento celular, maior volume citoplasmático e grande quantidade de vacúolos. Para confirmar estes resultados, foi analisado por Western blot a via de sinalização Akt. AK foi capaz de ativar esta via, que apresenta papel regulatório muito importante no desenvolvimento e diferenciação celular. Também foi detectado por citometria de fluxo o aumento de F4/80 e do CD11b, seguido da diminuição do CD11c em células tratadas por 96 horas, mostrando que o AK é capaz de induzir o processo de diferenciação das células da medula óssea em macrófagos e não em células dendríticas. A análise microbicida revelou que o AK também potencializou a fagocitose e aumentou a produção de ânion superóxido, entretanto, não promoveu o aumento na produção de óxido nítrico. Além disso, não foram observados efeitos citotóxicos nas células tratadas com AK quando comparadas as células não tratadas. Assim, o AK parece atuar como agente imunomodulador, sendo capaz de induzir as células da medula óssea durante o processo de diferenciação da linhagem monocítica.

Palavras-chave: Diferenciação celular, Ácido Kójico, Medula óssea.

ABSTRACT

Bone marrow is soft and sponge-like material found inside bones that contains hematopoietic cells responsible for development and proliferation of peripheral blood cells. The monocytes proliferation generated in the bone marrow and the differentiation of these cells into macrophages plays a key role in the immune response. In this context, the research for drugs that enhance the innate immune response is needed to restore the homeostasis and the immune response. Kojic Acid (KA) is a secondary metabolite synthesized by some species of fungi from *Aspergillus* genera and has several applications (food additive, cosmetics, antitumor agent and macrophage activator). Thus, the aim of this study is to evaluate the immunomodulatory effects of kojic acid (KA) in the bone marrow cells of mice. These cells were obtained by flushing femurs, and maintained in cultures treated with KA at the concentration of 100 µg/mL for 24-96 hours of culture. It was observed by optical microscopy that KA promoted increased cell adhesion, spreading ability and high number of cytoplasmic projections and vacuoles in cytoplasm in the mononuclear cells from bone marrow treated with KA. To confirm these results, Akt signaling pathway was analyzed by western blot. KA seems to be able to activate the Akt signaling pathway that has a critical regulatory role in cellular development and differentiation. In addition, we detected by cytometer analysis, increase in the F4/80 and in the CD11b expression, and decrease in CD11c when cells were treated for 96 hours, showing that KA induce the differentiation of bone marrow cells into macrophages, but not into dendritic cells. The analysis of the microbicidal response revealed that KA also potentiated phagocytosis and increased the production of superoxide anion, but not promoted increases of nitric oxide production. Furthermore, no cytotoxic effects were observed in cells treated with KA when compared to the untreated bone marrow cells. Thus, KA acts as an immunomodulatory and is able to induce bone marrow monocyte-macrophage differentiation process.

Keywords: Cell differentiation, kojic acid, bone marrow.

1. INTRODUÇÃO

1.1. MEDULA ÓSSEA

A medula óssea (MO) é um tecido esponjoso altamente vascularizado, responsável pela proliferação, diferenciação, sobrevivência e renovação das células sanguíneas circulantes no organismo (Mazo *et al.*, 2011). Este tecido está localizado nos canais medulares de ossos longos e nas trabéculas de alguns ossos chatos, como o íliaco, esterno, vértebras e costelas, apresentando vascularização especializada através dos capilares sinusóides, o que possibilita a migração das células diferenciadas à circulação sanguínea (Papayannopoulou & Scadden, 2008).

As células sanguíneas geradas pela MO são originadas a partir do mesmo precursor comum, as células tronco hematopoiéticas (CTH), que apresentam extensivo potencial de auto-renovação e proliferação (Kondo *et al.*, 2003). Estas células são capazes de se diferenciar e adquirir morfologia e funções distintas na presença de um estímulo específico, gerado pelos fatores estimuladores de colônias (CFE) ou pelas citocinas (Geissmann *et al.*, 2010). Para que ocorra este processo, é necessário que exista um microambiente medular favorável ao desenvolvimento das CTH, o qual é constituído por células estromais, matriz extracelular (MEC), fatores de crescimento e citocinas produzidas pelas células estromais (Monteiro & Bonomo, 2005).

Por ser um órgão de extrema importância para a manutenção do organismo, qualquer tipo de anomalia que venha a interferir na produção e proliferação das células hematopoiéticas pode levar o indivíduo a apresentar doenças que, em alguns casos, podem ser fatais. Por isso, a busca por novas terapias e novos medicamentos de baixo custo, em baixas doses e que não apresentem citotoxicidade que atuem na diferenciação e ativação das células da medula óssea tem despertado interesse de muitos pesquisadores.

1.2. MICROAMBIENTE MEDULAR

O microambiente medular é o responsável por abrigar e sustentar as CTH. É um sistema formado, basicamente, por células estromais, as quais tem função de produzir os componentes necessários para a formação da MEC e produzir os fatores de crescimento envolvidos na diferenciação celular (Nardi & Afonso, 1999; Junqueira & Carneiro, 2008).

O estroma da MO é constituído por um conjunto de células heterogêneas que atuam mutuamente para promover o suporte estrutural e fisiológico necessário à hematopoiese. Esse conjunto de células heterogêneas é composto por macrófagos, capazes de fagocitar as células ineficazes produzidas durante a eritropoiese (Nadir & Afonso, 1999); os adipócitos que servem como reservatório de lipídios necessários para o metabolismo celular durante a proliferação das CTH (Nadir & Afonso, 1999); as células endoteliais, que produzem uma variedade de proteínas como a laminina e a fibronectina (Zuckerman & Wicha, 1983) e os fibroblastos, também conhecidos como células reticulares, as quais são responsáveis pela formação do retículo tridimensional onde se instalam todas as células hematopoiéticas, além de expressar colágeno e osteonectinas necessárias a formação da MEC (Krebsbach *et al.*, 1999).

A MEC que tem papel fundamental na sustentação, adesão e migração das células estromais e hematopoiéticas dentro da MO (Klein, 1995), armazena fatores de crescimento e citocinas (Klein, 1995) e está relacionada à potencialização e regulação da hematopoiese (Gu *et al.*, 2003; Vituri *et al.*, 2008).

1.3. FATORES DE CRESCIMENTO E CITOCINAS ENVOLVIDAS NO PROCESSO DE DIFERENCIAÇÃO

As citocinas são glicoproteínas responsáveis por desencadear vários processos no organismo. As principais citocinas envolvidas na hematopoiese são os chamados fatores estimuladores de colônia (CFE) e as interleucinas (IL) que irão interagir com as CTH induzindo o processo de proliferação, diferenciação e maturação celular (Barreda *et al.*, 2004). Estes fatores podem ser encontrados no microambiente medular como proteínas solúveis, proteínas expressas na membrana das células estromais ou associadas com componentes da MEC, as quais irão agir de forma conjunta sobre as CTH (Barreda *et al.*, 2004; Hamilton & Achuthan, 2012).

Os principais fatores de crescimento envolvidos na diferenciação das CTH são o fator estimulador de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), que é responsável pela regulação do número de monócitos e sua funcionalidade, além de promover a maturação de células dendríticas (DC) e macrófagos alveolares e a sobrevivência de neutrófilos e eosinófilos (Bober *et al.*, 1995); o fator estimulador de macrófagos (M-CSF) e o fator estimulador de

granulócitos (G-CSF), que são essenciais para a manutenção e maturação dos macrófagos e dos neutrófilos, respectivamente (Hamilton & Achuthan, 2012) (Figura 1).

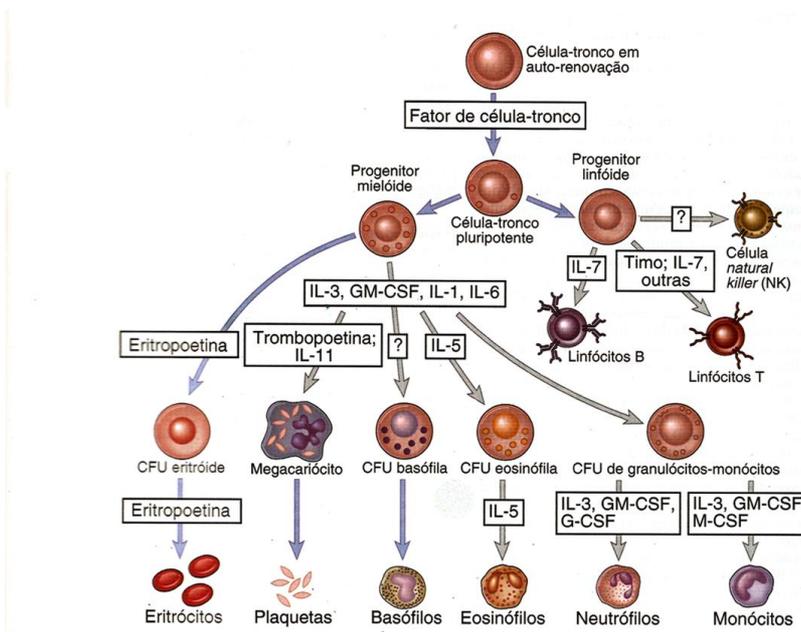


Figura 1. Figura esquemática mostrando as principais citocinas envolvidas na hematopoiese e na diferenciação das células da medula óssea. Fonte: Abbas, 2008.

O M-CSF é um dos principais fatores de crescimento responsáveis pela proliferação e diferenciação da linhagem monocítica (Stanley *et al.*, 1997; Fixe & Praloran, 1997), fazendo com que estas células sejam capazes de migrar através do processo de quimiotaxia e aumentar sua capacidade fagocítica. Além disso, o M-CSF é capaz de estimular a produção de algumas citocinas, como IL-1, IL-6, IL-8, fator de necrose tumoral (TNF- α), GM-CSF, G-CSF e interferon (IFN- γ) (Barreda *et al.*, 2004).

Além disso, o M-CSF também está envolvido nas respostas contra infecções e inflamações, agindo nas células através do contato célula a célula de forma autócrina, parácrina e endócrina (Fixe & Praloran, 1997).

1.4. HEMATOPOIESE E CÉLULAS TRONCO HEMATOPOIÉTICAS (CTH)

A hematopoiese consiste na contínua renovação das células sanguíneas circulantes a partir de células precursoras comuns e indiferenciadas, as CTH. Para que este processo

ocorra, é necessária uma complexa interação entre as células e moléculas que compõem o seu microambiente medular (Monteiro & Bonomo, 2005).

O primeiro local a ocorrer a hematopoiese é o mesoderma do saco vitelínico, sendo esta estrutura responsável pela geração de células hematopoiéticas primitivas, que consiste principalmente na produção de eritrócitos nucleados (Kondo *et al.*, 2003) que posteriormente são capazes de migrar para o fígado fetal, principal local de produção da hematopoiese durante a vida embrionária (Oh & Kwon, 2010). A partir do quarto mês de gestação, a hematopoiese começa ser realizada na MO, de forma que a produção medular vai aumentando até o momento do nascimento, onde a MO se transforma no principal local de produção de células sanguíneas durante a vida adulta do indivíduo (Silveira, 2000; Oh & Kwon, 2010).

Inicialmente, as CTH sofrem um ativo processo de auto-renovação para aumentar a sua população e com o tempo, a maioria destas células se tornam quiescentes, onde sua manutenção é rigidamente controlada por CFE (Oh & Kwon, 2010), as CTH também podem ser encontradas em pequenas quantidades em órgãos como o baço e fígado e no sangue periférico (Kondo *et al.*, 2003; Abdelhay *et al.*, 2009).

As CTH são capazes de se comprometer de forma progressiva com as diferentes linhagens hematopoiéticas até resultar nas células sanguíneas diferenciadas (Figura 2), sendo caracterizada por ser um processo contínuo que acontece de forma hierárquica, podendo ser separado em três estágios distintos (Bryder *et al.*, 2006).

No primeiro estágio da hematopoiese estão envolvidas as CTH, que apresentam como principais características a grande capacidade de auto-renovação e multipotencialidade. As CTH correspondem à 0,01% das células residentes da MO e, de acordo com a necessidade, fatores específicos produzidos pelo microambiente medular influenciam a diferenciação das CTH em células progenitoras de linhagem mielóide e linfóide, formando assim o segundo estágio da hematopoiese (Abdelhay *et al.*, 2009; Yona & Jung, 2010). O segundo estágio compõem cerca de 0,5% da população total de células da MO e os progenitores hematopoiéticos apresentam grande capacidade de se diferenciar em células maduras, porém o potencial de auto-renovação é limitado (Bryder *et al.*, 2006; Mayani *et al.*, 2007).

O terceiro estágio corresponde a 90% da população total da MO, é composto por células progenitoras comprometidas que são influenciadas por CFE, que darão origem aos progenitores das células sanguíneas circulantes (Bryder *et al.*, 2006; Travlos, 2006).

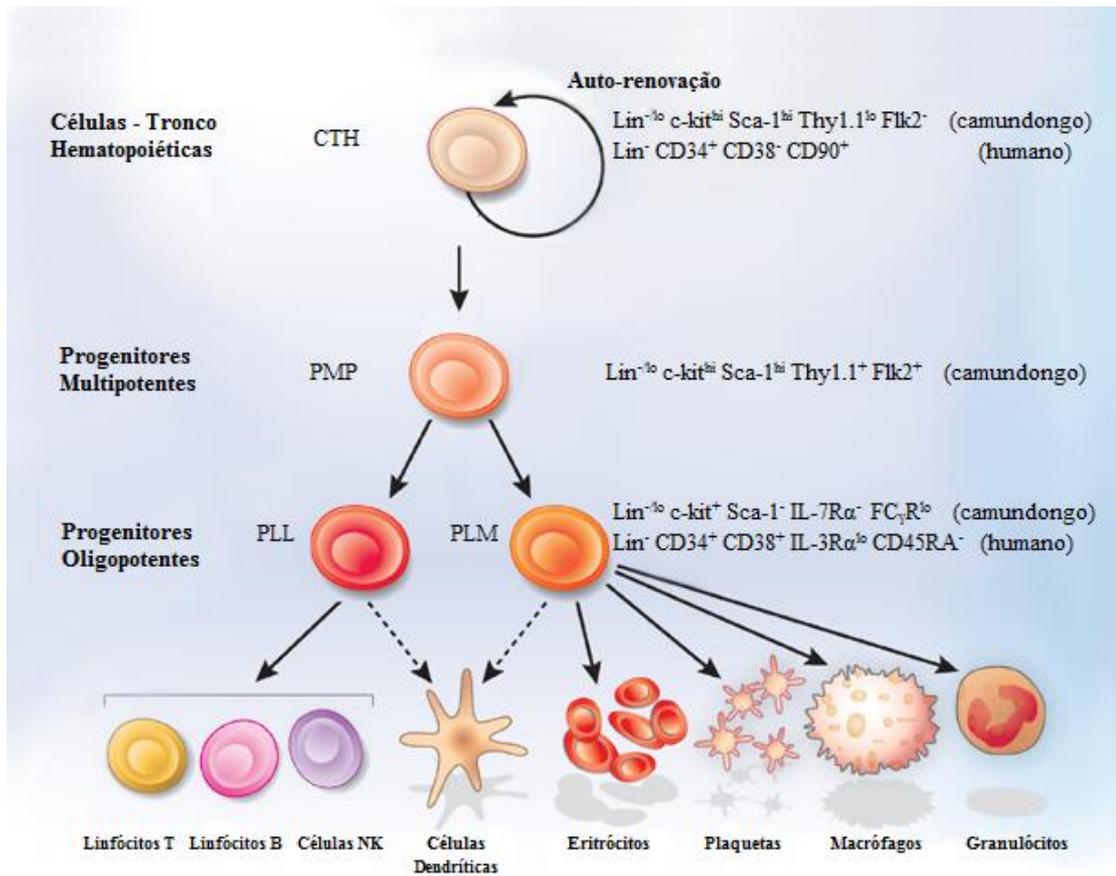


Figura 2. Imagem ilustrativa da hematopoiese e os marcadores de superfície expressos nos diferentes estágios de diferenciação da CTH. PMP: progenitor hematopoiético comum. PLL: progenitor linhagem linfoide. PLM: Progenitor linhagem mieloide. Fonte: Tan et al., 2006 (Modificado).

Outra característica marcante das CTH é o processo denominado de "homing" (Hidalgo, 2008; Fonseca & Corbei, 2011; Mazo *et al.*, 2011), que consiste na capacidade das CTH de migrar do sangue periférico para diferentes órgãos e para a MO. O processo de homing apresenta papel fisiológico na homeostase da MO, podendo ser amplificado devido ao estresse causado à MO durante o recrutamento de leucócitos do seu reservatório frente a infecções (Lapidot *et al.*, 2005). As CTH também contribuem para a regeneração de tecidos lesados quando estimuladas apropriadamente (Kondo *et al.*, 2003; Papayannopoulou & Scadden, 2008).

As CTH podem se diferenciar em diversos grupos celulares, como os leucócitos, que são formados por um conjunto de células heterogêneas encontradas na circulação sanguínea.

Estes leucócitos apresentam-se altamente especializadas e com uma incrível diversidade de funções, atuando principalmente na imunidade do organismo (Mosser & Edwards, 2008).

1.5. SISTEMA FAGOCÍTICO MONONUCLEAR ORIGINADO A PARTIR DE CTH

1.5.1. Monócitos

Os monócitos são um importante grupo de células do sistema fagocítico mononuclear, fundamentais para o sucesso da resposta imune inata. Apresentam citoplasma com leve granulação, núcleo em forma de ferradura, poucas ou nenhuma projeção citoplasmática (Dickout *et al.*, 2010). Estas células se originam na MO a partir de monoblastos que se diferenciam em pró-monócitos, os quais migram para o sangue periférico e se diferenciam nos diferentes tipos de monócitos (Figura 3). Uma vez na circulação sanguínea, os monócitos migram para diferentes tipos de tecidos, se diferenciando então em macrófagos ou DC (Puka *et al.*, 2005; Yona & Jung, 2010), os quais vão desempenhar papel fundamental nos mecanismos efetores da resposta imune (Rogacev & Heine, 2010; Saha & Geissmann, 2011).

Devido à enorme plasticidade apresentada pelos monócitos, estas células são capazes de assumir diversos fenótipos de acordo com o estímulo provocado pelo meio (Daigneaut *et al.*, 2010). Na presença do fator estimulador de M-CSF e IL-6, os monócitos se diferenciam em macrófagos e na presença do GM-CSF e IL-4, se diferenciam em DC (Chomarat *et al.*, 2000; Randolph *et al.*, 2008; Polacec *et al.*, 2012).

Os monócitos apresentam uma população heterogênea tanto em humanos quanto em camundongos, sendo divididos em subgrupos que apresentam funções distintas e variações quanto ao fenótipo, tamanho, granulosidade, morfologia do núcleo e fatores que provavelmente refletirão na especialização de populações de macrófagos dentro de cada microambiente (Rogacev & Heine, 2010).

Estas células são caracterizadas e classificadas a partir de marcadores específicos e podem ser divididos em subgrupos denominados de monócitos clássicos e não clássicos. Os monócitos clássicos ou inflamatórios, expressam alguns marcadores de superfície, como Ly-6C^{hi} e CD43^{low} em camundongos. Em humanos, os marcadores de superfície específicos para este subgrupo são CD14^{hi} e CD16⁻ (Rogacev *et al.*, 2011). Este subgrupo é recrutado

rapidamente para os locais onde ocorre inflamação ou invasão por patógenos, resultando na diferenciação destas células em macrófagos e conseqüentemente a sua ativação. Este processo desencadeia a produção de citocinas envolvidas na inflamação, aumento da capacidade fagocítica e a produção de mediadores inflamatórios como o NO e ERO, culminando na eliminação do patógeno (Ziegler-Heitbrock *et al.*, 2010; Geissman *et al.*, 2010)

O subgrupo dos monócitos não clássicos, ao contrário dos monócitos inflamatórios, expressam Ly-6c^{low} e CD43^{hi} em camundongos e CD14^{low} e CD16^{hi} em humanos. São caracterizados por sobreviver por longos períodos em diferentes tecidos. Embora sejam heterogêneos, todos os monócitos respondem aos estímulos pró-inflamatórios e apresentam a mesma capacidade de migração e diferenciação (Gordon & Taylor, 2005; Rogacev *et al.*, 2011). Os monócitos também expressam os grandes quantidades dos marcadores de superfície CD11b e CD115 (Ziegler-heitbrock et al., 2010).

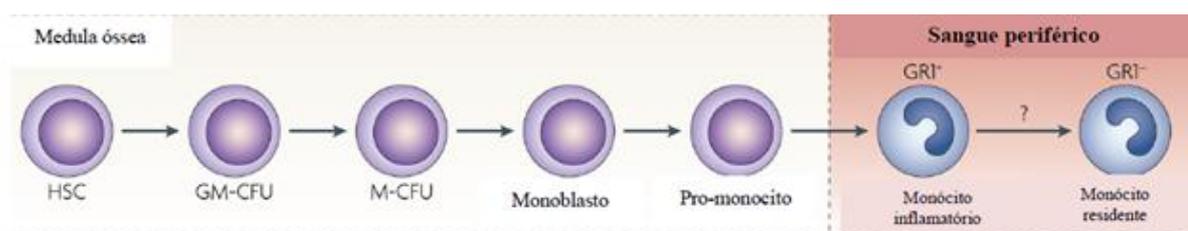


Figura 3. Diferenciação de monócitos a partir das CTH presentes na medula óssea. HSC: Celulas tronco hematopoiéticas. HSC: célula tronco hematopoiética pluripotente. GM-CFU: unidade formadora de colônia de granulócitos/macrófagos. M-CFU: unidade formadora de colônia de macrófagos. GR1⁺: marcador de superfície encontrado em grandes quantidades em monócitos inflamatórios. de macrófagos. GR1⁻: marcador de superfície encontrado em baixas quantidades em monócitos residentes. Fonte: Mosser & Edwards, 2008 (Modificado)

1.5.2. Macrófagos derivados de monócito

Os macrófagos são células mononucleadas encontradas em quase todos os tecidos e que apresentam um papel central na resposta imune inata. Estas células são consideradas como fagócitos profissionais extremamente eficientes, ou seja, a sua função primária é de fagocitar partículas estranhas, restos celulares e microrganismos invasores ao organismo (Chang *et al.*, 2010).

Os macrófagos são originados a partir da diferenciação dos monócitos presentes na circulação sanguínea que migram para os tecidos, conforme a necessidade do organismo. Para

que estes monócitos se diferenciem em macrófagos, é preciso que algumas citocinas e fatores de crescimento estejam presentes, como a IL-6, GM-CSF e M-CSF, sendo esse último o principal fator de crescimento responsável pela diferenciação dos monócitos em macrófagos (Barreda *et al.*, 2004; Mayani *et al.*, 2007).

Os efeitos biológicos de M-CSF são mediados a partir de um único receptor transmembrana denominado M-CSFR. A ligação deste fator de crescimento ao seu receptor causa a dimerização do M-CSFR, levando a ativação da atividade de proteínas tirosina quinases, ativando assim algumas vias de sinalização envolvidas na diferenciação celular, como a via fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K)/ proteína quinase B (Akt) (Pixley & Stanley, 2004).

A ativação destas proteínas tirosina quinases resulta na fosforilação do PI3K, o qual induz a fosforilação de alguns lipídios de membrana, formando assim um segundo mensageiro, o fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP₃) (Cantley, 2002; Osaki *et al.*, 2004). O Akt é encontrado no citosol em sua forma inativa e pode ser ativado pela fosforilação da Thr308 pela fosfoinositida dependente de quinase-1 (PDK1) e a Ser473 pelo complexo de proteína alvo da rapamicina (mTORC) (Vanhaesebroeck & Alessi, 2000; Hemmings & Restuccia, 2012).

Para que seja ativado, o Akt necessita de um estímulo específico para que sofra a translocação para membrana plasmática, se ligando preferencialmente ao PIP₃ devido a alta afinidade por este segundo mensageiro (Miao *et al.*, 2010). A ligação do Akt com PIP₃ causa alterações conformacionais e a exposição de sítios de fosforilação. A via de sinalização celular PI3K/Akt também está envolvida em outras inúmeras funções celulares como metabolismo, transcrição, síntese de proteínas, crescimento, proliferação e sobrevivência celular (Manning & Cantley, 2007).

Uma vez diferenciadas, estas células sofrem algumas alterações, sendo possível observar o complexo de Golgi (CG) bem desenvolvido, retículo endoplasmático (RE) proeminente, o aumento do tamanho celular e no número de mitocôndrias, um maior desenvolvimento do sistema lisossomal e alteração nas proteínas de superfície e autofagia (Zhang *et al.*, 2012). Estes fagócitos recebem diferentes denominações e funções, de acordo com cada tecido em que residem, como as células de Küppfer no fígado, microglias no Sistema Nervoso Central (SNC), osteoclastos nos ossos e macrófagos alveolares nos pulmões (Daigneaut *et al.*, 2010) (Figura 4).

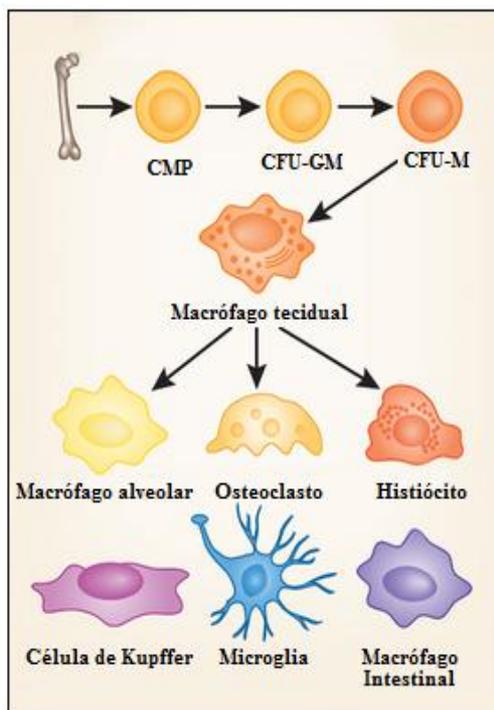


Figura 4. Precusores envolvidos na diferenciação dos macrófagos e as denominações e morfologias de macrófagos encontrados em diferentes locais do organismo. CMP: progenitor mielóide comum. CFU-GM: unidade formadora de colônias de granulócitos e macrófagos. CFU-M: unidade formadora de colônia monocítica. Fonte: Galli *et al.*, 2012 (modificado).

Os macrófagos, assim como os monócitos, também apresentam uma população heterogênea, sendo capazes de mudar seu fenótipo e fisiologia em resposta a diferentes estímulos do ambiente (Edwards *et al.*, 2006; Mosser & Edwards, 2008). Estão distribuídos no organismo como células pequenas e imaturas, chamadas de macrófagos residentes, que alteram suas propriedades endocíticas e biológicas quando recrutados para os locais de inflamação e ativados (Casseta *et al.*, 2011). Este processo de ativação é iniciado através de estímulos externos que interagem com receptores de superfície dos macrófagos desencadeando uma cascata de sinalizações que implicarão em alterações fisiológicas e morfológicas (Chang *et al.*, 2010).

Quando ativados, apresentam-se como grandes células fagocíticas com núcleo aumentado, citoplasma volumoso com expressivas projeções citoplasmáticas, numerosos vacúolos no citoplasma, aumento de retículos endoplasmáticos rugoso e liso, numerosos CG, lisossomos e mitocôndrias. Esta mudança está associada ao aumento da produção de proteínas, enzimas e RNA (Smit *et al.*, 2008).

Os macrófagos ativados podem ser classificados em dois tipos de fenótipos:

A) O fenótipo M1, também conhecidos como macrófagos pró-inflamatórios ativados pela via clássica. A ativação do tipo M1 é caracterizado pelo tipo de resposta Th1, onde a ativação do macrófago é causada por estímulos de $\text{INF-}\gamma$, na presença ou não de lipopolisacarídeos (LPS) ou TNF, os quais irão induzir a secreção de altas quantidades de citocinas pró-inflamatórias, que irão induzir a produção de NO e ERO, tornando os macrófagos capazes de promover a morte de patógenos intracelulares (Vereyken *et al.*, 2011; Biswas & Mantovani, 2011).

Macrófagos M1 convertem o oxigênio molecular em ERO através da enzima superóxido dismutase (SOD) e NADPH oxidase (Verreck *et al.*, 2006), que são encontradas na membrana do fagolisossomo. As ERO são formadas principalmente por íons superóxidos (O_2^-), radicais hidroxila (OH^\cdot) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que juntos constituem o "burst oxidativo" (Mosser & Edwards, 2008).

Os macrófagos M1 também produzem radicais reativos intermediários, como o NO, que é produzido principalmente pela enzima óxido nítrico sintetase induzida (iNOS), uma enzima que é ativa após a invasão de algum agente agressor. A iNOS é uma enzima que catalisa a conversão da L-arginina em L-citrulina e NO, o qual, dentro do fagolisossomo reage com os produtos dos ERO, acarretando na eliminação do patógeno fagocitado (Flora Filho & Zilberstein, 2000) (Figura 5).

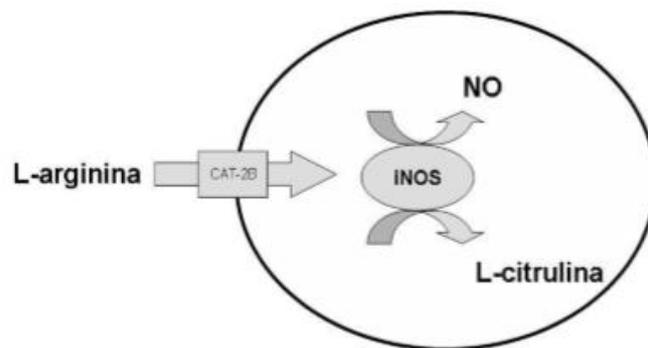


Figura 5. Desenho esquemático da ação da enzima iNOS sobre a L-arginina. A L-arginina é transportada para o interior da célula através da proteína de membrana CAT-2B, local onde a iNOS irá catalisar a conversão da L-arginina em L-citrulina, liberando NO. Fonte:

Este tipo de macrófago também é capaz de secretar algumas citocinas como TNF, IL-1, IL-6, IL-12 e IL-23, as quais atuam como citocinas inflamatórias e estimulam as células da

imunidade adquirida, tornando o macrófago uma potente célula efetora (Biswas & Mantovani, 2010).

B) O fenótipo M2, também conhecidos como macrófagos ativados pela via alternativa. Os macrófagos M2 estão envolvidos com a supressão da resposta inflamatória, remodelação e reparo tecidual, em reações alérgicas e parasitárias (Gordon & Taylor, 2005). O tipo M2 é caracterizado por ativar os macrófagos a partir do estímulo causado por citocinas IL-4 e IL-13 (M2_A), imunocomplexos e glicocorticoides (M2_B), ou por IL-10 e pelo fator de transformação de crescimento β (TGF- β) (M2_C) (Figura 6). Após a ativação pela via alternativa, estes macrófagos passam a secretar moléculas anti-inflamatórias, como IL-10, CCL17, CCL22 e TGF- β , reduzindo assim o processo inflamatório. Além disso, exercem função imunossupressora seletiva e inibem a proliferação das células T (Biswas & Mantovani, 2010) (Figura 6).

A ativação do tipo M2 é responsável pela liberação de uma grande quantidade de arginase, enzima que utiliza o substrato L-arginina para produzir ornitina e poliaminas, as quais estão envolvidas na proliferação celular e na síntese de colágeno (Mantovani *et al.*, 2002).

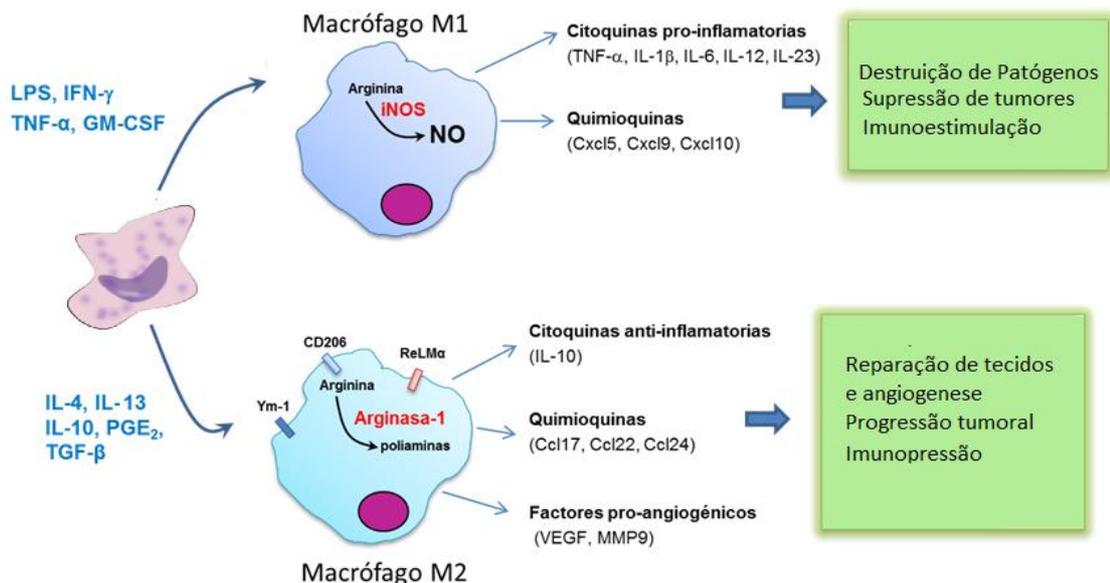


Figura 6. Formas de polarização que os macrófagos podem sofrer e suas propriedades funcionais específicas para cada tipo de estímulo derivado do microambiente durante a ativação. Fonte: Hortelano, 2014 (Modificado).

Além da fagocitose e destruição de microrganismos, os macrófagos estão envolvidos em outras funções importantes, como remoção de células senis ou danificadas, reconhecimento e fagocitose de células tumorais, cicatrização, remodelação tecidual, hematopoiese e homeostase (Klimp *et al.*, 2002). Estas células apresentam algumas proteínas de superfície, como a proteína F4/80 que é específica para este tipo celular. Pode-se encontrar também a proteína CD11b, encontrada na superfície de linfócitos, granulócitos, macrófagos e monócitos. Estas duas proteínas estão envolvidas com o processo de adesão e migração celular (Khazen *et al.*, 2005).

Os macrófagos, assim como os neutrófilos, são considerados fagócitos profissionais extremamente eficientes em internalizar grandes partículas e promover a defesa do organismo contra a invasão de patógenos. Porém o tempo de vida de um macrófago é extremamente maior quando comparado à de um neutrófilo. Esta característica é de extrema importância, pois em algumas situações, como na quimioterapia do câncer, no transplante de MO, onde a produção de neutrófilos se encontra provisoriamente baixa ou interrompida, os macrófagos são capazes de proteger o organismo contra infecções secundárias (Dale *et al.*, 2008; Rogacev *et al.*, 2011).

1.5.3. Células dendríticas (DC) derivadas de monócitos

As DC são altamente especializadas na apresentação de antígenos (Hespe & Moser, 2012), apresentando-se como células grandes, com citoplasma irregular e longas projeções citoplasmáticas. Em humanos, estas células expressam vários marcadores de superfície, como o CD3, CD19/20, CD56, CD11c⁺ e CD103. Em humanos, todas DC expressam altos níveis de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade classe II (MHC II) (Collin *et al.*, 2013)

As DC também apresentam uma população heterogênea, assim como os monócitos e os macrófagos, sendo divididas em DC clássicas (também conhecidas como DC mielóides ou convencionais) e DC plasmocitóides. As DC convencionais apresentam uma maquinaria especializada em processar e apresentar antígenos as células T e, além disso, apresentam alta capacidade de produzir citocinas envolvidas na resposta imune (Geissman *et al.*, 2010). Estas células se localizam nos tecidos não linfóides e nas principais portas de entrada dos patógenos no organismo: zona marginal do fígado, barreiras epiteliais, tratos respiratórios e gastrointestinais (Merad *et al.*, 2013). Na presença de algum patógeno ou antígeno estranho ao

organismo, as DC endocitam estes organismos e se locomovem para os linfonodos, onde residem os linfócitos T “naives”. Durante este percurso, as DC amadurecem e desenvolvem-se como potentes células apresentadoras de antígenos, aumentando a expressão de MHC II e de moléculas coestimulatórias capazes de ativar os linfócitos T “naives”, regulando assim as respostas das células T (Geissman *et al.*, 2010; Collin *et al.*, 2013).

Descritas recentemente, as DC plasmocitóides apresentam a mesma origem das DC convencionais, porém são caracterizadas por residirem na circulação e em tecidos linfoides, apresentando um ciclo de vida maior e diferente das DC convencionais. Este subgrupo expressam baixos níveis de MCH II, CD11c e de moléculas estimulatórias quando não ativadas (Merad *et al.*, 2013). Estas células estão envolvidas na resposta contra infecções virais, liberando grandes quantidades de interferon (IFN), e também são capazes de apresentar antígenos as células T (Geissman *et al.*, 2010; Merad *et al.*, 2013).

1.6. IMUNOMODULADORES

O sistema imunológico pode ser regulado através de moléculas conhecidas como imunomoduladores, que são capazes de modificar a resposta imunológica do organismo de forma a exacerbá-la (imunoestimuladores) ou suprimi-la (imunossuppressores) de acordo com a necessidade, assumindo assim um papel de extrema importância na homeostase do organismo (Lima, 2007; Fischer *et al.*, 2008).

Atualmente, sabe-se que várias substâncias podem ser utilizadas como imunomoduladores, dentre eles destacam-se drogas de origem natural e sintética, além dos bioprodutos encontrados em vegetais e microrganismos (Masihi, 2000), os quais são de grande importância na terapia de doenças que acometem o sistema imunológico, como doenças causadas por hipersensibilidade, imunodeficiências, rejeição de enxertos e combate a microrganismos invasores (Dutta, 2002; Lima, 2007).

Uma gama de bioprodutos tem sido extensivamente estudados e reconhecidos pela sua eficácia na ação imunomodulatória e por agirem, principalmente, estimulando as células da medula óssea (Pinheiro *et al.*, 2003; Abud *et al.*, 2006; Jordan *et al.*, 2008; Cesar *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2011). Dentre os imunomoduladores já descritos podemos citar o Própolis, que apresentou tanto ação estimulante quanto a ação supressora em determinados eventos da resposta imune (Fisher *et al.*, 2008) e também o medicamento homeopático Canova, que foi

capaz de ativar células mononucleares da medula óssea (Abud *et al.*, 2006; Cesar *et al.*, 2008).

Além destes bioprodutos, o Àcido Kójico (AK) é um metabólito produzido por fungos do gênero *Aspergillus* que apresenta, entre outras funções, a capacidade de ativar macrófagos e induzir a fagocitose, podendo ser utilizado no combate contra patógenos sem causar danos à célula hospedeira (Rodrigues *et al.*, 2011; 2014) e parece ter ação imunomoduladora sobre monócitos humanos (Costa, 2012).

1.7. ÁCIDO KÓJICO

O AK ou o 5-Hidroxi-2-hidroximetil- γ -pirona (HMP) (Figura 7) é um metabólito secundário comumente obtido a partir de vários microrganismos, embora os fungos do gênero *Aspergillus*, *Penicillium* e *Acetobacter* sejam os principais produtores. O AK é formado a partir de carboidratos durante o processo de fermentação, sendo caracterizado pelo aspecto transparente e cristalino e por ser facilmente dissolvido em água, etanol e acetona (Burdock *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2001; Mohamad *et al.*, 2010).

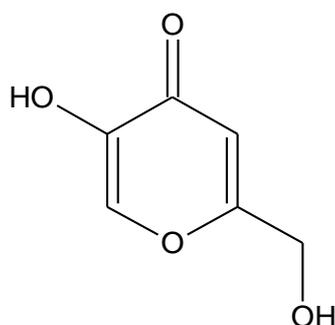


Figura 7. Estrutura química do Àcido Kójico, 5-hidroxi-2-hidroximetil- γ -pirona. **Fonte:** Rodrigues *et al.*, 2010.

Anteriormente a descoberta do AK, em 1907 por K. Saito, os fungos eram utilizados como fermentadores de alimentos e bebidas alcoólicas, em especial a espécie *Aspergillus oryzae*, também conhecido como “*Koji*” (Bentley *et al.*, 2006). Atualmente, no Japão e em outros países, o AK é utilizado como aditivo alimentar por causa de seu papel antioxidante, capaz de preservar vegetais e evitar o escurecimento de alguns alimentos causado pela enzima tirosinase (Burdock *et al.*, 2001; Nohyneck *et al.*, 2004; Mohamad *et al.*, 2010).

Na literatura existem diversos trabalhos que mostram inúmeras ações biológicas do AK, dentre elas: Atividade antioxidante (Gomes *et al.*, 2001; Rho *et al.*, 2011), inibidor da tirosinase (Burdock *et al.*, 2001; Bentley *et al.*, 2006; Rho *et al.*, 2011), em cosméticos e para o tratamentos de melasma (Lim *et al.*, 1999; Ahn *et al.*, 2011; Cho *et al.*, 2012), como aditivo alimentar (Burdock *et al.*, 2001; Nohynek *et al.*, 2004; Bentley *et al.*, 2006; Mohamad *et al.*, 2010), antitumoral (Burdock *et al.*, 2001), agente radioprotetor (Emami *et al.*, 2007; Hosseinimehr *et al.*, 2009), ativador de macrófagos (Rodrigues *et al.*, 2011), como modulador no processo de diferenciação de monócitos em macrófagos (Costa, 2012), ativador de neutrófilos (Niwa & Akamatsu, 1991; Frade, 2015), além de apresentar atividade bacteriostática, fungistática e leishmanicida (Bentley *et al.*, 2006; Chee & Lee, 2003; Rodrigues *et al.*, 2014).

O AK é utilizado tanto em cosméticos quanto no tratamento de melasmas, inibindo a melanogênese em áreas hiperpigmentadas da pele (Leyden *et al.*, 2011; Lajis *et al.*, 2012). Cremes e pomadas a base de AK combinadas a hidroquinona (outro inibidor de tirosinase) apresentam ação despigmentante mais eficaz do que estes compostos separados (Lim *et al.*, 1999). Estudos recentes mostraram que derivados do AK também são capazes de regular a melanogênese e induzir a despigmentação através de uma via que não envolva a enzima tirosinase (Choi *et al.*, 2012; Cho *et al.*, 2012). Além de todas estas aplicabilidades já descritas, o AK também é capaz de agir contra alguns patógenos através da inibição da tirosinase, enzima importante para a virulência de alguns patógenos. Foi mostrado que helmintos da espécie *Schistosoma mansoni*, que necessitam de tirosinase para a formação da membrana de seus ovos, quando tratados com AK sofriam inibição da tirosinase 1 e 2, resultando assim na diminuição de ovos com fenótipo normal, interferindo assim na progressão da doença (Fitzpatrick *et al.*, 2007). Recentemente foi demonstrado a ação leishmanicida de AK, onde foi mostrado que uma formulação tópica de AK (pomada) foi capaz de promover a morte do protozoário *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e ainda promoveu o processo de cicatrização das lesões cutâneas (Rodrigues *et al.*, 2014)

O AK, parece apresentar ação imunomoduladora, influenciando no crescimento de alguns agentes infecciosos. Entretanto, este metabólito também age aumentando a imunidade do organismo hospedeiro, ativando células envolvidas na imunidade inata e adquirida, aumentando a fagocitose e induzindo a produção de ERO (Niwa & Akamatsu, 1991; Rodrigues *et al.*, 2011).

A ação do AK em células de defesa do organismo foi descrita primeiramente por Niwa & Akamatsu (1991) que, mostraram uma ação antioxidante do metabólito. No entanto, o AK também foi capaz de aumentar a fagocitose e produção de ERO em neutrófilos. O mesmo foi observado por Frade (2015), onde após tratamento com 50 µg/mL de AK, os neutrófilos apresentaram morfologia de células ativadas e foi observado também aumento das ERO. Vale ressaltar ainda que o AK foi capaz de aumentar a sobrevivência dos neutrófilos.

O AK também foi capaz de induzir a diferenciação de monócitos em macrófagos. Foi observado que a partir do período de 48 horas de tratamento com 50 µg/mL, os monócitos tratados apresentaram aumento do número de filopódios, tamanho celular, aumento do número de organelas e alteração no padrão de proteínas de superfície, características de células em processo de diferenciação, mostrando que o AK, apresenta a capacidade de induzir a diferenciação de monócitos em macrófagos (Costa, 2012).

Além disso, Rodrigues e colaboradores (2011) mostraram que macrófagos peritoneais de murinos foram ativados após tratamento com 50 µg/mL de AK, que também foi capaz de promover ativação de macrófagos através do rearranjo do citoesqueleto, aumento da fagocitose e produção de radicais superóxidos, sem causar efeitos citotóxicos em células de mamíferos.

Embora o AK tenha diversas aplicações biológicas, poucos trabalhos na literatura mostram sua ação sobre as células do sistema imunológico. Além disso, ainda não é conhecida a ação do AK sobre os precursores das células sanguíneas presentes na MO, importantes para manter o organismo protegido contra diversos patógenos. Desta forma, é de grande importância a busca por medicamentos naturais que estimulem a diferenciação e a resposta microbicida das células hospedeiras envolvidas na resposta imune inata. Portanto, o presente estudo teve como objetivo investigar a ação do AK sobre as células do sistema fagocitário obtidas da medula óssea de camundongos.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Estudar os efeitos *in vitro* do AK sobre populações de células mononucleares provenientes da medula óssea de camundongos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Verificar a viabilidade das células da medula óssea tratadas com AK;
- Realizar análise quantitativa e morfológica das células da medula óssea tratadas com AK;
- Analisar a ativação da via de sinalização PI3K/Akt durante o processo de diferenciação de células tratadas com AK;
- Detectar a presença de marcadores de superfície em células tratadas com AK;
- Analisar a resposta microbicida das células da medula óssea tratadas com AK.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. FLUXOGRAMA

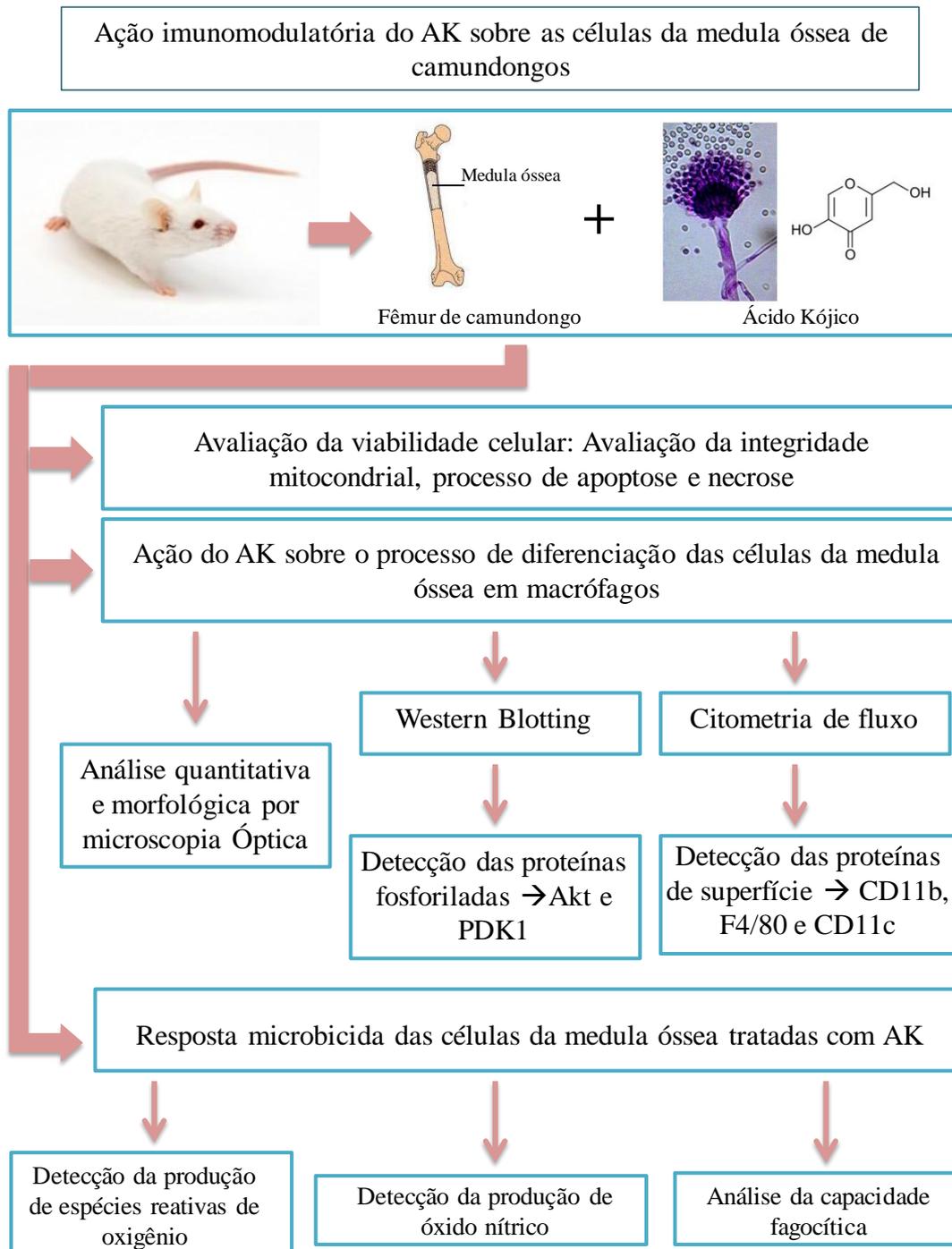


Figura 8. Fluxograma mostrando as atividades realizadas para avaliar a ação do AK sobre as células da medula óssea de camundongos.

3.2. OBTENÇÃO DOS ANIMAIS

Os camundongos utilizados neste trabalho eram machos albinos de 6 a 10 semanas de idade, da espécie *Mus musculus*, os quais foram mantidos em racks ventiladas ALESCO[®], com acesso a ração e água filtrada. Estes animais foram doados pelo Biotério do Instituto Evandro Chagas (IEC) e foram sacrificados em câmara de CO₂ (Insight[®]), conforme as normas do Comitê de ética para uso de animais (processo nº 047-2015 CEPAE/ICB/UFPA).

3.3. OBTENÇÃO E PREPARO DO ÁCIDO KÓJICO (AK)

O Ácido Kójico foi obtido através da Companhia Sigma-Aldrich Brasil Ltda (Referência: K3125-5G). A solução estoque foi preparada à uma concentração de 1 mg/mL de AK diluído em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM). As concentrações utilizadas neste trabalho a partir da solução estoque foram de 25, 50, 100 e 200 µg/mL em um teste de viabilidade celular e para todos os demais experimentos foi utilizada somente a concentração de 100µg/mL, pois foi a concentração que apresentou resultados mais satisfatórios obtidos anteriormente.

3.4. PREPARO E COLETA DE CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS

A medula óssea foi obtida a partir da extração dos fêmures dos camundongos sacrificados em câmara de CO₂. Após a dissecação, os fêmures obtidos foram lavados em PBS e, dentro do fluxo, transferidos para uma placa de Petri contendo solução salina (PBS) estéril, os quais foram mantidos a temperatura de 4°C. Logo depois, foram retiradas as epífises proximais e distais com o auxílio de tesoura e pinça de ponta serrilhada. Após a retirada das epífises, a medula óssea foi removida através da lavagem do canal medular com o auxílio de uma seringa contendo também PBS estéril (Marin *et al.*, 2010).

3.5. CULTIVO DAS CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA

As células obtidas foram centrifugadas a 1500 RPM a 4°C por 10 minutos. Após a centrifugação, as células foram homogeneizadas em meio DMEM, contadas em câmara de Neubauer e transferidas para placas ou em garrafas de cultivo celular. Em seguida, as células foram mantidas em estufa a 37°C contendo 5% de CO₂ durante o período determinado para cada tipo de análise. Foram utilizados para cada experimento uma quantidade de 2x10⁶ células por poço/garrafa e os grupos de experimentação foram divididos em: controle sem tratamento, células tratadas como o AK na concentração 100 µg/mL e células do grupo controle positivo, tratadas com fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) na concentração de 100 nM.

3.6. TESTES DE VIABILIDADE CELULAR

3.6.1. Método do *Thiazolyblue* (MTT)

O MTT é utilizado em ensaios colorimétricos para medir a viabilidade celular. O MTT é um sal tetrazolium que é convertido pelas desidrogenases mitocondriais em cristais azuis de formazan insolúveis em água. O produto formazan é impermeável às membranas celulares, acumulando-se em células viáveis, sendo posteriormente diluído em DMSO (Fotakis & Timbrell, 2006). Logo, a redução do MTT em cristais de formazan é diretamente proporcional à atividade mitocondrial e a viabilidade celular.

As células da medula foram cultivadas como descrito no item 3.5 em placas de 96 poços e submetidos ao tratamento com o AK. As células foram tratadas em meio DMEM suplementado em 10% SBF por 24, 48, 72 e 96 horas. Após o cultivo, o sobrenadante foi retirado e os poços lavados com PBS pH 7,2. Logo após a lavagem, foi adicionado 0,5 mg/mL MTT (Sigma) diluído em PBS sendo, posteriormente, incubados à 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂ por 3 horas. Após o término da incubação, foram retirados os sobrenadantes, e os poços lavados uma vez com PBS. Após esta etapa, foi adicionado 200 µL DMSO em cada poço para solubilização dos cristais de formazan e depois colocados em agitação por 10 minutos. A solução resultante foi lida em leitor de ELISA (BIO-RAD Model

450 Microplate Reader) em um comprimento de onda de 570 nm. Como controle negativo da reação, células foram mortas com solução de 15% de formol em PBS.

3.6.2. Detecção de Apoptose em células da medula óssea tratadas com AK.

Para este ensaio foram utilizados dois tipos de marcadores fluorescentes: O Iodeto de Propídio (IP) que é um marcador nuclear de fluorescência vermelha de alto peso molecular e a Anexina V que é um marcador de fluorescência verde o qual se liga à fosfatidilserina na presença de Ca^{2+} . Dessa forma, a marcação simultânea de células com estes dois marcadores permite distinguir células integras e viáveis de células apoptóticas e necróticas, além de discriminar o estágio de apoptose sofrido pela célula.

A detecção da apoptose em macrófagos tratados com AK na concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foi realizada utilizando a marcação com Iodeto de Propídio (IP) (Sigma) e Anexina V-FITC (Molecular Probes Invitrogen®). As células da medula óssea foram cultivadas como descrito no item 3.5 em placas de 12 poços e submetidas ao tratamento com o AK. Em seguida, estas células foram raspadas, lavadas com PBS, centrifugadas a 1500 RPM por 5 minutos e coradas inicialmente com Anexina V por 30 minutos e logo depois, coradas com IP por 30 minutos, como descrito por Rieger *et al.* (2011) com algumas modificações. A contagem das células marcadas pelo IP foi realizada por citometria de fluxo (BD, FACS CANTO™ II) e os dados foram obtidos utilizando o *software* WinMDI versão 2.9.

3.7. CONTAGEM DAS CÉLULAS MONONUCLEARES OBTIDAS DO SOBRENADANTE DAS CULTURAS CELULARES DA MEDULA ÓSSEA.

Após o cultivo das células da medula óssea como descrito no item 3.5 em placas de 24 poços e tratadas com AK, foram retiradas alíquotas dos sobrenadantes da cultura (onde se encontram as células não aderentes à placa de cultura). Estas células foram homogeneizadas e contadas em câmara de Neubauer.

3.8. ANÁLISE MORFOLÓGICA

3.8.1. Microscopia óptica

As células da medula foram cultivadas em placas de 24 poços, como descrito no item 3.5. As células foram tratadas com AK nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas. A cada 24 horas, as células foram tratadas e ao término do tratamento, as células aderidas às lamínulas foram fixadas (paraformaldeído 4% em tampão PHEM 0,1 M) por 30 minutos, coradas com Giemsa diluído a 25 % em tampão fosfato pH 8.0, durante 25 minutos, lavadas com água destilada duas vezes e montadas em lâminas de vidro com o uso do Etellan[®]. Foram contadas 200 células por lamínula e a análise morfológica foi feita em microscópio óptico Olympus BX45. Foram analisadas somente as células do sistema fagocítico mononuclear (Monócitos e Macrófagos). O M- CSF na concentração de 100 nM foi utilizado como controle positivo do ensaio.

3.9. DETECÇÃO DE PROTEÍNAS ENCONTRADAS NAS VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR ENVOLVIDAS NA DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES.

3.9.1. Western Blotting

As células da medula óssea foram cultivadas como descrito no item 3.5. em placas de 12 poços e submetidas ao tratamento com o AK. Em seguida, estas células foram raspadas e colocadas em eppendorf. A lise das células foi feita com tampão de lise RIPA (10 mM Tris-Cl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 1% Triton X-100, 0.1% sodium deoxycholate, 0,1% SDS, 140 mM NaCl). Após isso, as células foram agitadas em vórtex e centrifugadas por 10 minutos, a 4 °C e 10.000 r.p.m, como descrito por Azevedo *et al.* (2013). Depois foi feita a transferência das proteínas para o gel de corrida e submetidas a eletroforese por aproximadamente 2 horas. Em seguida, foi feita a transferência das proteínas do gel para as membranas PVDF de baixa fluorescência (Millipore, Billerica, MA, USA). Após a transferência, as membranas foram colocadas em tampão de bloqueio (Li-cor Biosciences, Lincoln, NE, USA) por 1 hora, sob agitação e depois incubadas *overnight* com o anticorpo primário anti-pAkt (Ser473) (1 : 1000) e pPDK-1 (Ser241) na diluição e 1 : 1000, (Cell

Signaling) à uma temperatura de 4 °C. Após incubação, as membranas foram lavadas com tampão PBS contendo 0,1% Tween-20 e incubadas com anticorpo secundário anti-rabbit IgG-Dylight700 em uma diluição de 1:5000 (Li-cor Biosciences) por uma hora em temperatura ambiente. Posteriormente, as membranas foram lavadas com tampão PBS, escaneadas com Odyssey Infrared Imaging System (Li-cor Biosciences) e os dados obtidos analisados no programa *Image J*.

3.10. DETECÇÃO DE MARCADORES DE SUPERFÍCIE CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO

Células provenientes da medula óssea foram cultivadas em placas de 24 poços como descrito no item 3.5 e tratadas com o AK por 96 horas. Após o tratamento, estas células foram raspadas, transferidas para falcons, centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos e ressuspensas em solução de PBS pH 7,2. Em seguida, essas células foram centrifugadas novamente a 1500 rpm por 10 minutos e incubadas com anticorpo primário CD11b, F4/80 e CD11c por 30 minutos. Os anticorpos primários foram diluídos na proporção 1:50 em PBS a 37°C. Posteriormente, uma segunda incubação foi realizada com anticorpo secundário *PE- goat anti-rat* IgG (Abcam) diluídos na proporção 1:50 em PBS por 40 minutos, e por fim uma nova centrifugação foi realizada e as células ressuspensas em PBS, para assim determinar a fluorescência das células por citometria de fluxo. As células foram analisadas em citômetro de fluxo BD FACS Canto II e os dados foram obtidos utilizando o *software* WinMDI versão 2.9.

3.11. RESPOSTA MICROBICIDA DAS CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA TRATADAS COM AK

3.11.1. Análise da atividade fagocítica das células da medula óssea tratadas com AK

Para observar o efeito do AK sobre a capacidade fagocítica das células da medula óssea, as células foram cultivadas como descrito no item 3.5 e tratadas com AK por 96 horas. Em seguida, foi realizada a interação com a levedura em uma proporção de (1:10) durante 2

horas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. Após esse período, o sobrenadante foi desprezado e as células lavadas com PBS pH 7.2 por três vezes, para retirar as leveduras não internalizadas.

Em seguida, as células foram coradas com o corante Giemsa. Foram contadas 200 células por lamínula e o índice endocítico obtido calculando-se a porcentagem de células que endocitaram e a média de parasitas por células. As células foram contadas em microscópio óptico Olympus BX41.

3.11.2. Dosagem da produção de Óxido Nítrico (NO) pelas células da medula óssea tratadas com AK

A dosagem da concentração do nitrito em meio de cultura é uma forma indireta de se determinar a concentração NO. As células da medula óssea foram cultivadas como descrito no item 3.5 em placas de 96 poços e tratadas com AK na concentração de 100 µg/mL por 96 horas. Para a dosagem de NO foi utilizado o método de Griess, no qual consiste em adicionar 50 µl do reagente de Griess (sulfanilamida a 1% em ácido fosfórico a 5% e Naftilenodiamina a 0,1% em água destilada) e 50 µl do sobrenadante das células tratadas ou não com AK. A leitura foi feita pelo leitor de ELISA sobre um comprimento de onda de 570 nm e a concentração de nitrito foi expressa em µM de acordo com a curva padrão estabelecida.

3.11.3. Dosagem da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) pelas células da medula óssea tratadas com AK

3.11.3.1. Dosagem de radicais superóxidos pelo método do Nitroblue Tetrazolium (NBT)

O Nitroblue Tetrazolium (NBT) é um corante solúvel amarelo utilizado para determinar a produção de radicais superóxidos durante incubação com fagócitos (granulócitos e monócitos). Este sal, na presença de O₂⁻ sofre redução para cristais de formazan insolúvel, os quais se acumulam no citoplasma dos fagócitos.

Células da medula foram cultivadas em placa de cultura de 24 poços como descrito no item 3.5 e mantidas em cultivo por um período de 96 horas. As células foram lavadas com PBS e incubadas com meio contendo 1 mg/mL de NBT. Como controle positivo foram utilizadas células da medula tratadas com M-CSF. Após 1 h a 37 °C e em atmosfera de 5% de CO₂, as células foram lavadas com PBS, pH 7.2, e fixadas em paraformaldeído 3% por 30 minutos, desidratadas e montadas em lâminas de vidro, tendo *Entellan*® como meio de montagem. Após a montagem as células foram analisadas e contadas em microscópio óptico Olympus BX41.

3.11.3.2. Pelo kit CellROX®

Células da medula óssea foram cultivadas em placas de cultura de 12 poços como descrito no item 3.5 e tratadas com AK na concentração de 100 µg/mL por um período de 96 horas. Após o cultivo, as células foram lavadas com PBS pH 7.2 e incubadas com o marcador fluorescente CellROX® Green (Molecular Probes Invitrogen) na concentração de 5 µM, diluído em meio de cultura DMEM por 30 minutos a 37 °C e em atmosfera de 5% de CO₂, conforme descrito por Hyo-Yang *et al.* (2012), com algumas modificações. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS, pH 7.2 e lidas em um fluorímetro (VICTOR X Multilabel Plate Readers) em comprimento de onda de 490 nm. Células não marcadas com CellROX® Green foram utilizadas como controle negativo. Células tratadas com M-CSF foram utilizadas como controle positivo.

3.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados utilizando o GraphPad Prism 5. Os testes utilizados foram o de análise de variância, ANOVA seguido do teste Tukey ou Teste t de Student, considerando significantes resultados com $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (***)

4. RESULTADOS

4.1. VIABILIDADE CELULAR

Para verificar se o uso de AK no tratamento de células da medula óssea induziam alterações na viabilidade celular, foram realizados os seguintes testes de viabilidade: o teste MTT e o teste detecção de apoptose e necrose celular com o uso dos marcadores IP e Anexina V-FITC.

4.1.1. Citotoxicidade do AK através do teste MTT

Este ensaio detecta se as células da medula óssea tratadas com o AK sofrem danos na viabilidade celular através da quantificação da atividade das desidrogenases mitocondriais. Os resultados obtidos neste estudo mostraram que as células tratadas com o AK na concentração de 25, 50, 100 e 200 µg/mL e cultivadas nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas não apresentaram diminuição significativa de células viáveis quando comparadas ao controle sem tratamento (figura 9).

4.1.2. Determinação de células apoptóticas e necróticas da medula óssea tratadas com AK

Para a detecção de apoptose e necrose foram utilizados: a proteína Anexina V que é capaz de detectar células em estágio de apoptose inicial devido a alta afinidade à fosfatidilserina externalizada na superfície de células apoptóticas. Além da Anexina V, foi utilizado o marcador nuclear fluorescente IP que, devido ao alto peso molecular, só é penetrável em células que apresentem danos à membrana plasmática, o que ocorre em estágios tardios de apoptose ou em necrose. Os resultados obtidos mostraram que as células cultivadas com AK por 96 horas apresentaram uma porcentagem de células não marcadas com IP e Anexina V-FITC de 86,68%, semelhante a porcentagem encontrada no grupo controle sem tratamento, que foi de 87,23%, demonstrando assim que o AK não é citotóxico à célula e não induz a morte celular (Figura 10).

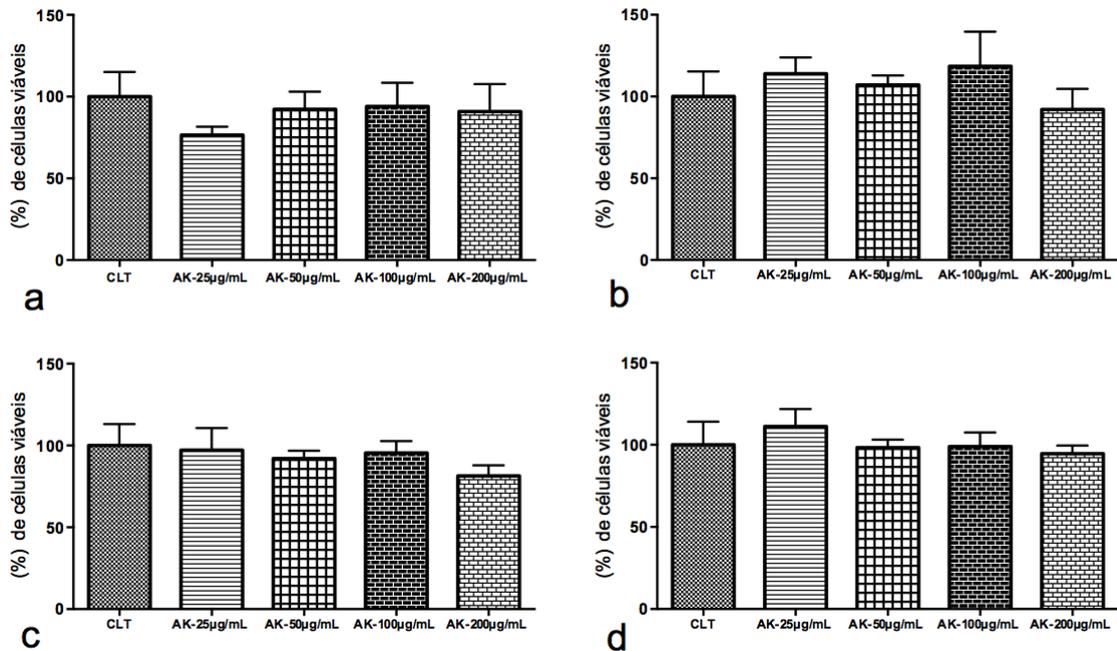


Figura 9. Viabilidade celular pelo método MTT em células da medula óssea tratadas com AK nas concentrações de 25, 50, 100 e 200 µg/mL por (a) 24 horas, (b) 48 horas, (c) 72 horas e (d) 96 horas. Observar que a viabilidade celular das células tratadas com AK foi mantida em todos os tempos de tratamento, quando comparadas ao controle sem tratamento.

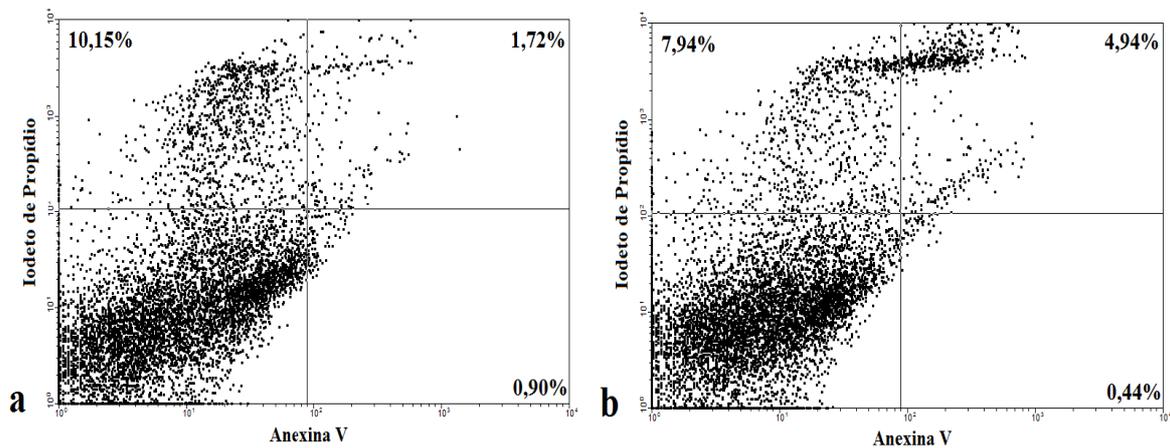


Figura 10. Detecção de apoptose por citometria de fluxo em macrófagos tratados com AK no período de 96 horas de cultivo. (a) Células do controle sem tratamento. (b) Células da medula óssea tratadas com AK na concentração de 100 µg/mL.

4.2. ANÁLISE QUANTITATIVA DAS CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA TRATADAS COM AK

A cada 24 horas de cultivo, as células do sobrenadante e as aderidas destas culturas foram quantificadas.

4.2.1. Análise quantitativa das células do sobrenadante das culturas de células da medula óssea

Para realizar a contagem das células não aderentes, a cada 24 horas de cultivo o sobrenadante da cultura era removido, homogeneizado e as células contadas em câmara de Neubauer. Os resultados obtidos demonstraram que há uma tendência à redução na quantidade de células conforme o tempo de cultura, tanto no grupo controle sem tratamento, quanto no grupo tratado com AK. As células do sobrenadante das culturas tratadas com o AK mostraram uma diminuição significativa do número de células no sobrenadante quando comparadas ao grupo controle sem tratamento nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Também foi possível observar uma diminuição significativa do número de células do sobrenadante somente nos períodos de 72 e 96 horas de cultivo no grupo que foi tratado com M-CSF (Figura 11).

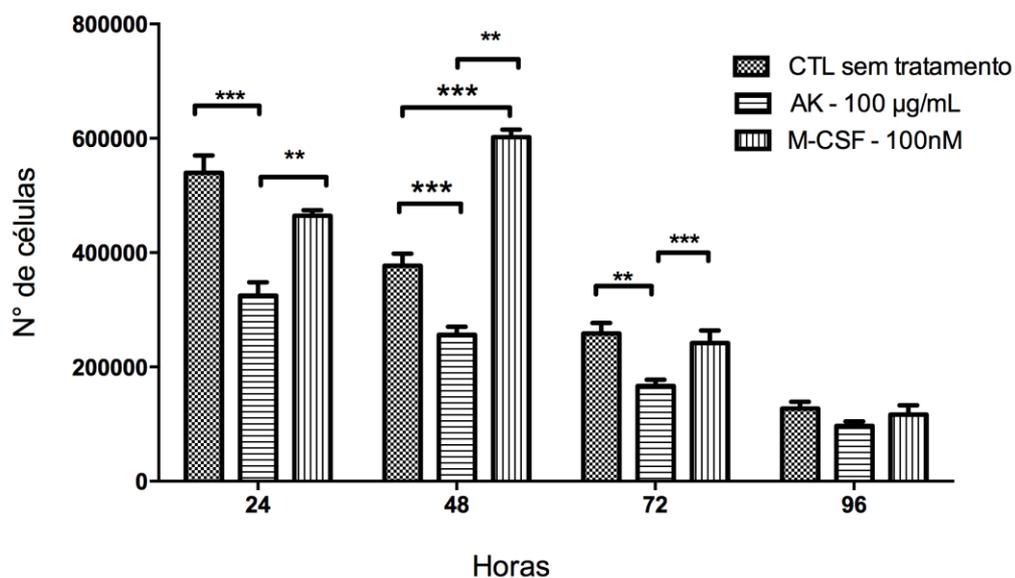


Figura 11. Análise quantitativa das células do sobrenadante em culturas de medula óssea tratadas com o AK por 24, 48, 72 e 96 horas. Foi observada uma diminuição significativa entre os grupos tratados com AK e CTL no

período de 24, 48 e 72 horas de cultura. Foi utilizado para a análise estatística o teste ANOVA, onde (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$. CTL: grupo controle sem tratamento, M-CSF: grupo tratado somente com o fator de crescimento M-CSF.

4.2.2. Quantificação e tipos celulares observados após o tratamento com AK

Para realizar a análise quantitativa das células aderentes, estas foram coradas com Giemsa e contadas em microscópio de acordo com as características morfológicas de cada célula. Foram encontrados os seguintes tipos celulares: monócitos, macrófagos ativados e residentes, linfócitos e polimorfonucleares (PMN). Porém, neste trabalho foram analisadas somente as células pertencentes ao sistema fagocítico mononuclear.

4.2.2.1. Monócitos

Os monócitos são células precursoras de macrófagos e células dendríticas, apresentando pouco citoplasma e núcleo em forma de rim. De acordo com o gráfico, a quantidade de monócitos nas primeiras 24 horas de cultura é significativamente alta quando comparada as outras populações de células. Sua população tende a diminuir ao longo do tempo, já que dão origem a outras linhagens celulares. No tempo de 24 horas de tratamento, o grupo tratado com AK na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ aumentou significativamente sua população em relação ao controle sem tratamento. Já o grupo tratado com M-CSF apresentou uma diminuição significativa dos monócitos nos tempos de 24, 48 e 72 horas quando comparadas ao controle sem tratamento (Figura 12a).

4.2.2.2. Macrófagos residentes

Os macrófagos residentes apresentam núcleo irregular, granulação e citoplasma abundante com margens irregulares, porém são células em estado de repouso. Para que ocorra ativação é necessário que a célula reconheça antígenos estranhos ao organismo. Os resultados obtidos mostraram que os macrófagos residentes tendem a aumentar sua população ao longo do tratamento. As células tratadas com AK na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram no

tempo de 24 horas aumento significativo deste tipo celular quando comparados ao controle sem tratamento. O grupo tratado também apresentou, no tempo de 72 horas, um aumento significativo de células quando comparado ao grupo controle sem tratamento. Já o grupo tratado com M-CSF apresentou aumento significativo nos tempos de 24 e 48 horas quando comparados ao controle e uma diminuição significativa no período de 96 horas (Figura 12b).

4.2.2.3. Macrófagos ativados

Os macrófagos ativados apresentam vacúolos e um grande espriamento celular quando comparados aos macrófagos residentes. Os resultados obtidos demonstraram gradual ativação destas células ao longo do experimento. Logo, o grupo de células tratadas com AK-100µg/mL apresentou um aumento significativo na quantidade destas células em relação ao grupo controle sem tratamento (Figura 12c).

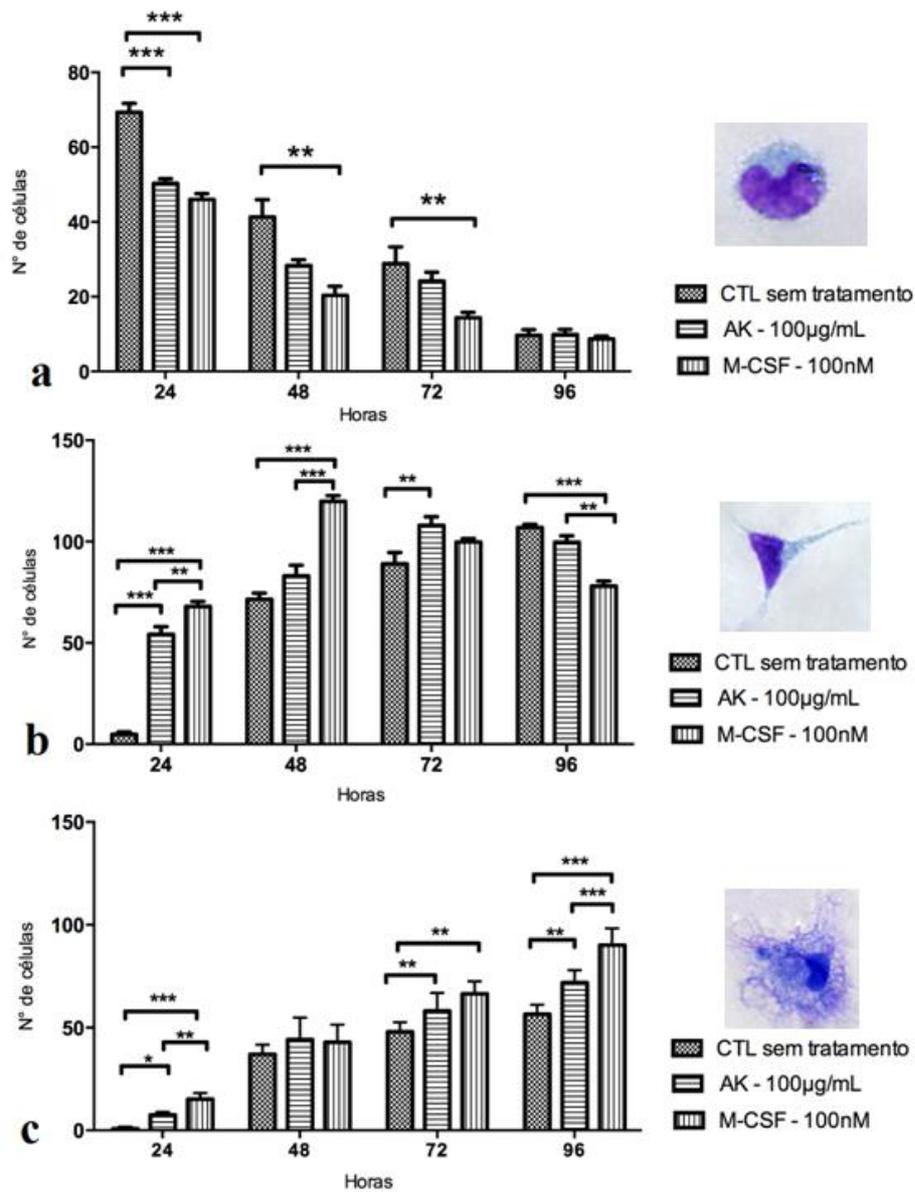


Figura 12. Análise quantitativa dos tipos celulares encontrados em culturas de medula óssea tratadas com o AK-100 µg/mL por 24, 48, 72 e 96 horas. (a) Análise quantitativa dos monócitos: Foi observada diminuição significativa do grupo tratado e controle sem tratamento no período de 24 horas de cultura. (b) Análise quantitativa dos macrófagos residentes: Foi observado um aumento significativo do grupo tratado e controle sem tratamento no período de 24 e 72 horas de cultura. (c) Análise quantitativa dos macrófagos ativados: Foi observado um aumento significativo do grupo tratado e controle sem tratamento no período de 24 horas de cultura, porém só houve aumento significativo de células nos períodos de 72 e 96 horas de cultivo quando comparadas ao controle sem tratamento. Para a análise estatística foi utilizado o teste ANOVA, onde (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$.

4.3. ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA TRATADAS COM AK

A análise morfológica mostrou que grande parte das células que aderiam ao substrato pertencia à linhagem monocítica, as quais ao longo do tempo de cultivo diferenciavam-se em macrófagos. As células tratadas com o metabólito apresentaram uma maior quantidade de células aderidas ao substrato, aumento do volume citoplasmático característico de ativação celular, presença de inúmeros vacúolos citoplasmáticos e grande quantidade de eucromatina quando comparados ao controle sem tratamento, assemelhando-se as células tratadas com o M-CSF.

No período de 24 horas de cultura, as principais populações encontradas tanto no controle quanto nas células tratadas foram os monócitos e os linfócitos. As células tratadas com AK-100 µg/mL apresentaram uma menor quantidade destas células e um aumento no número de macrófagos residentes e ativados quando comparados ao controle sem tratamento (Figura 13). No período de 48 e 72 horas, foi observada uma quantidade maior de células aderidas no grupo tratado quando comparado ao controle e o aumento de células espreiadas características de macrófagos residentes e ativados (Figuras 14 e 15). As células que já apresentavam um progressivo aumento na aderência e espreiamento celular demonstram no último dia de cultivo uma quantidade ainda maior de células aderidas e muito mais células espreiadas quando comparadas ao controle, além de apresentarem algumas modificações morfológicas como a presença de vacúolos citoplasmáticos quando comparados ao controle. No grupo tratado com M-CSF, algumas células apresentaram um processo denominado de fusão celular, formando células com mais de um núcleo e com enorme volume citoplasmático (Figura16).

Figura 13. Imagens de microscopia de campo claro das células cultivadas após 24 horas. (a) Células do controle sem tratamento. (b) Células tratadas com AK-100 $\mu\text{g/mL}$, observar aumento do citoplasma o processo de ativação celular (setas). (c) Células tratadas com M-CSF, observar espraiamento e processo de ativação celular (setas). Barra de 10 μm .

Figura 14. Imagens de microscopia de campo claro das células cultivadas após 48 horas. (a) Células do controle sem tratamento. (b) Células tratadas com AK-100 $\mu\text{g/mL}$, observar presença de macrófagos ativados (setas). (c) Células tratadas com M-CSF, observar presença de macrófagos ativados (setas). Barra de 10 μm .

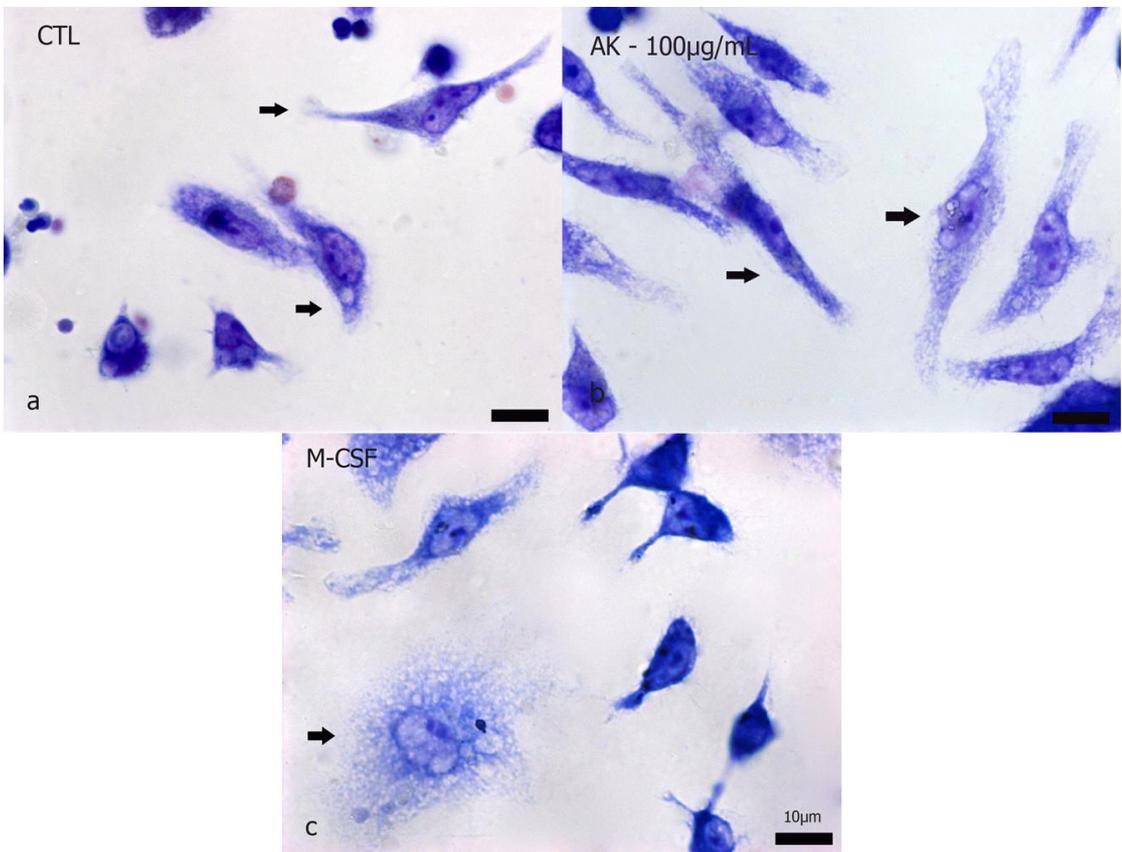
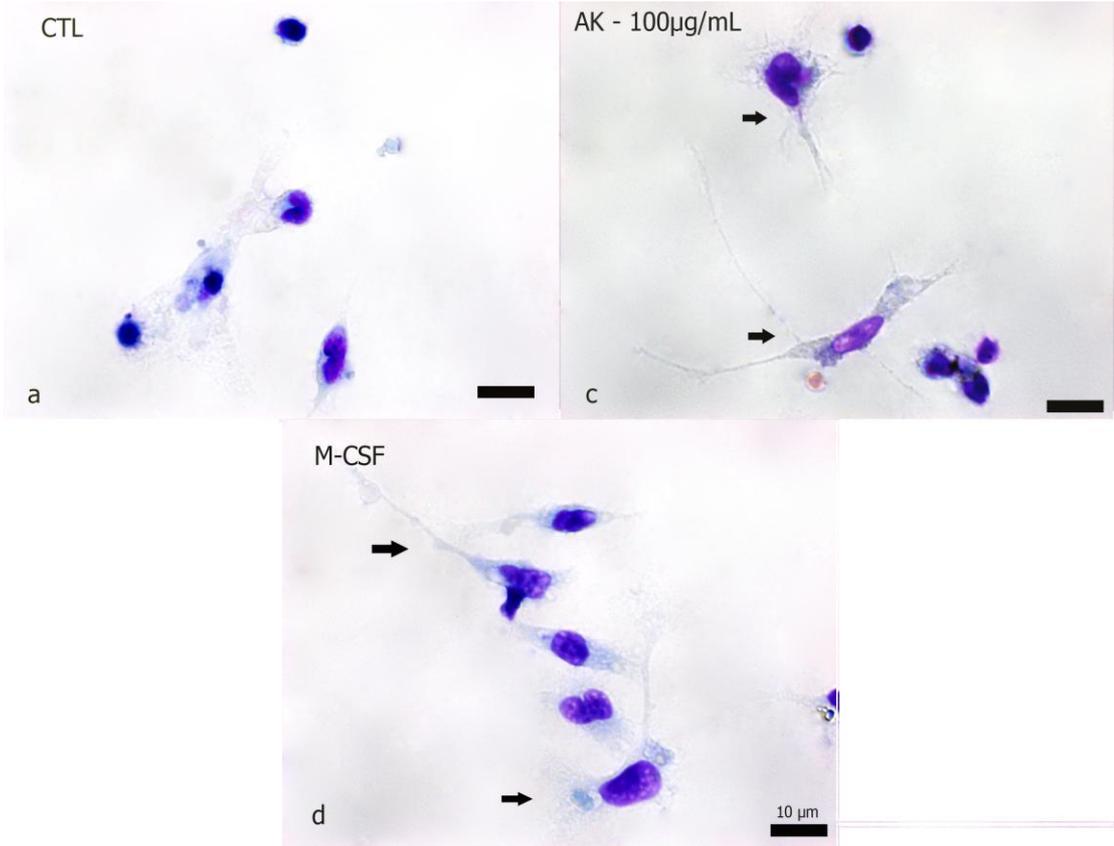
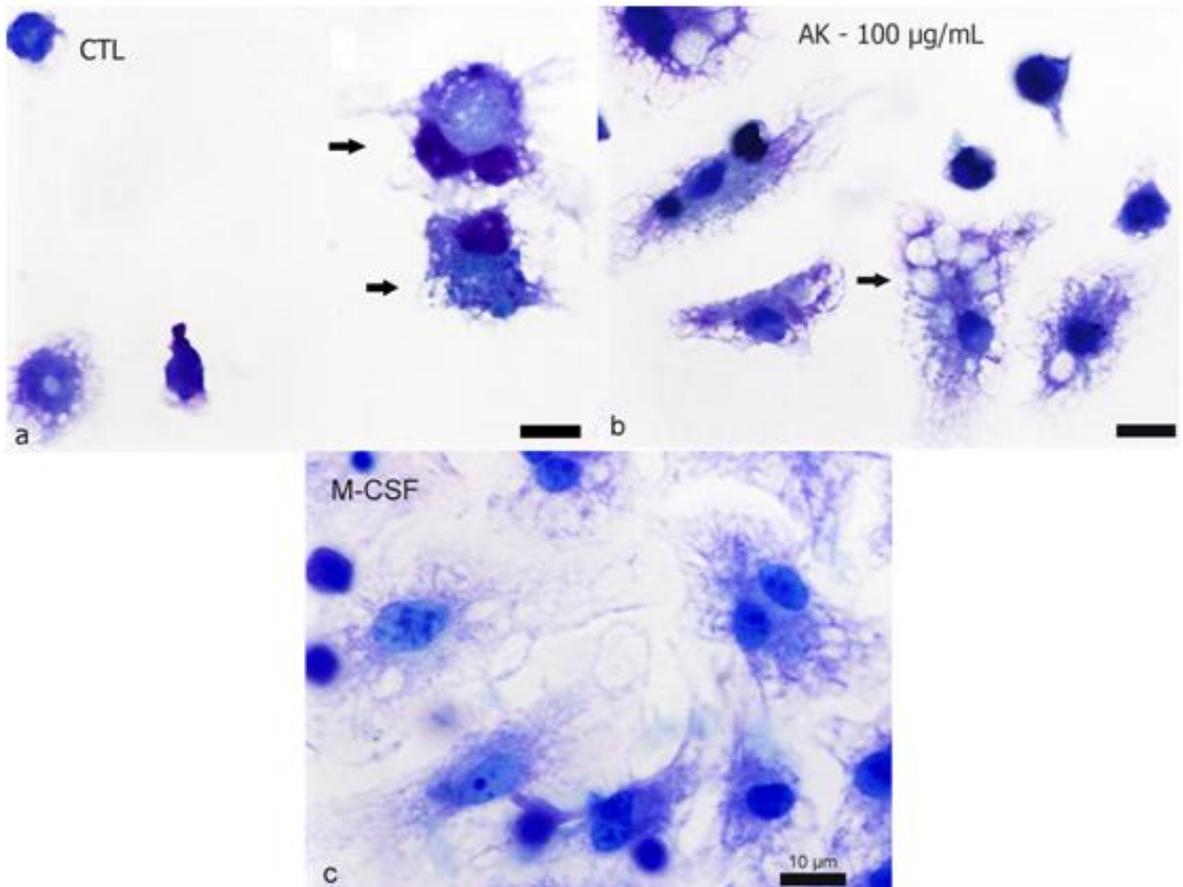
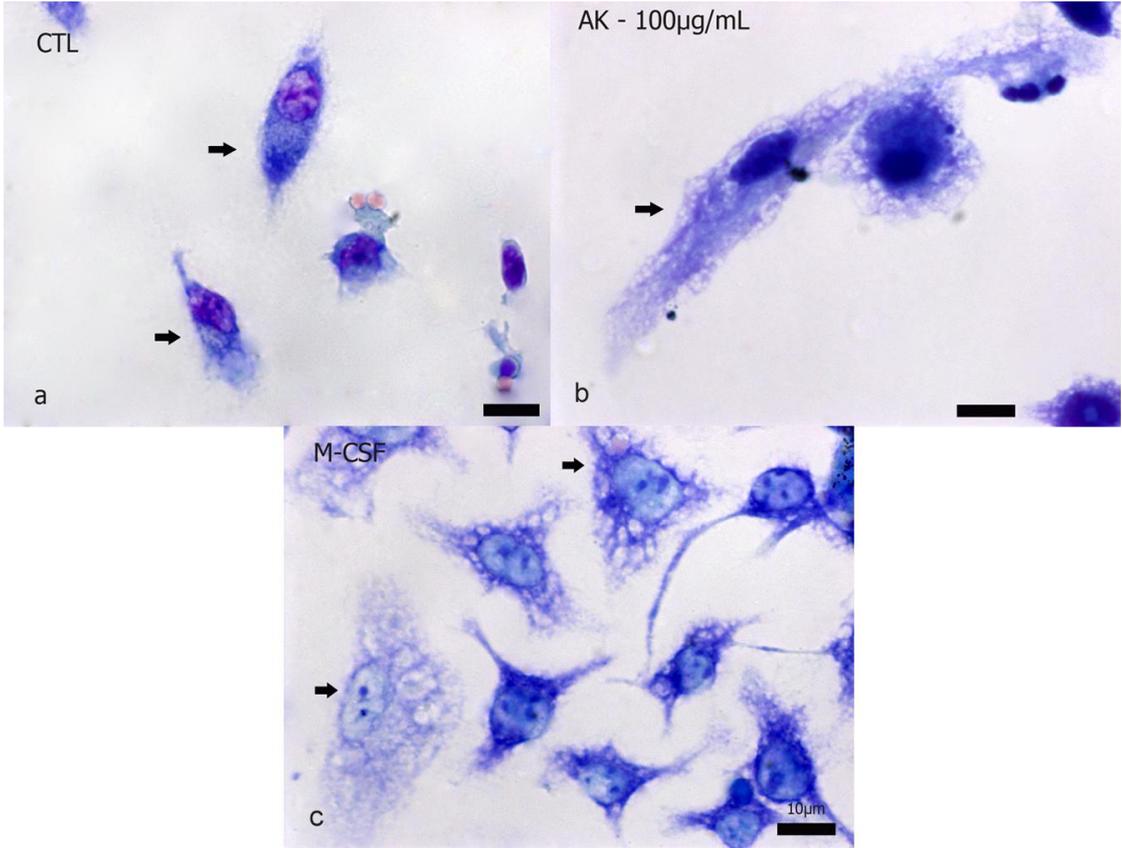


Figura 15. Imagens de microscopia de campo claro das células cultivadas após 72 horas. (a) Células do controle sem tratamento. (b) Células tratadas com AK numa concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, observar presença de células muito espalhadas e com grande volume citoplasmático, característicos de macrófagos ativados (setas). (c) Células tratadas com M-CSF, observar presença de macrófagos ativados (setas). Barra de 10 μm .

Figura 16. Imagens de microscopia de campo claro das células cultivadas após 96 horas. (a) Células do controle sem tratamento. (b) Células tratadas com AK numa concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, observar presença de macrófagos ativados e a presença de inúmeros vacúolos citoplasmáticos (setas). (c) Células tratadas com M-CSF. Barra de 10 μm .



4.4. DETECÇÃO DE PROTEÍNAS ENCONTRADAS NAS VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR ENVOLVIDAS NA DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES.

Para investigar se a via de sinalização envolvida na diferenciação das células da medula óssea tratadas com AK era ativada, foram analisados os lisados celulares destas células cultivadas por 96h através da técnica de Western blotting. Os resultados obtidos mostraram que as células tratadas apresentavam aumento na ativação das proteínas Akt e PDK-1, através da fosforilação dos domínios Ser473 e Ser241, respectivamente, quando comparados ao grupo controle sem tratamento (figura 17).

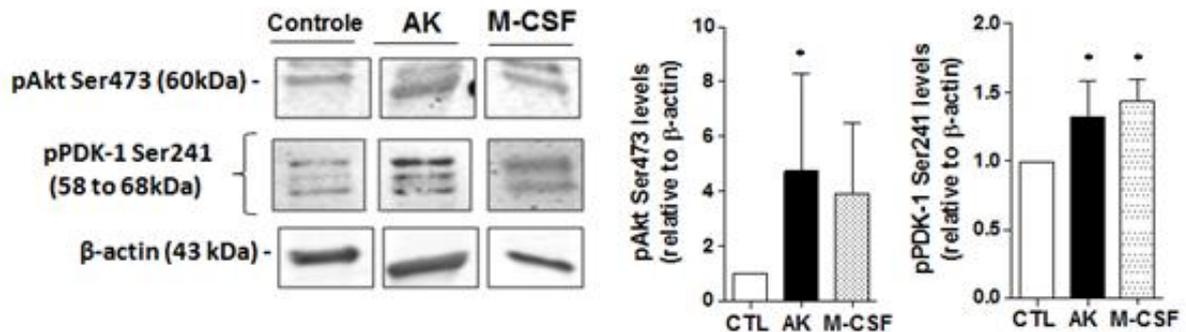


Figura 17. Detecção de proteínas Akt e PDK1 envolvidas na via de sinalização celular que induz a diferenciação das células mononucleares. Foi utilizado para a análise estatística o teste ANOVA, seguido pelo Teste de Tukey onde (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$.

4.5. CARACTERIZAÇÃO POR CITOMETRIA DE FLUXO DAS CÉLULAS TRATADAS COM AK ATRAVÉS DE MARCADORES DE SUPERFÍCIE

4.5.1. Marcação com a proteína de superfície CD11b

A análise por citometria de fluxo foi realizada para verificar se o AK é capaz de estimular ou não a diferenciação das células tronco hematopoiéticas em células da linhagem monocítica. As células tratadas com AK mostraram que o padrão de marcação de CD11b em sua superfície foi de 22,74%, enquanto que a marcação com controle positivo, estimulado

com M-CSF, foi de somente 13,74%. Quando comparadas ao controle sem tratamento, as células tratadas com AK demonstram marcar pouco maior que o dobro, já que apenas 10,73% das células sem tratamento apresentaram marcação (Figura 18).

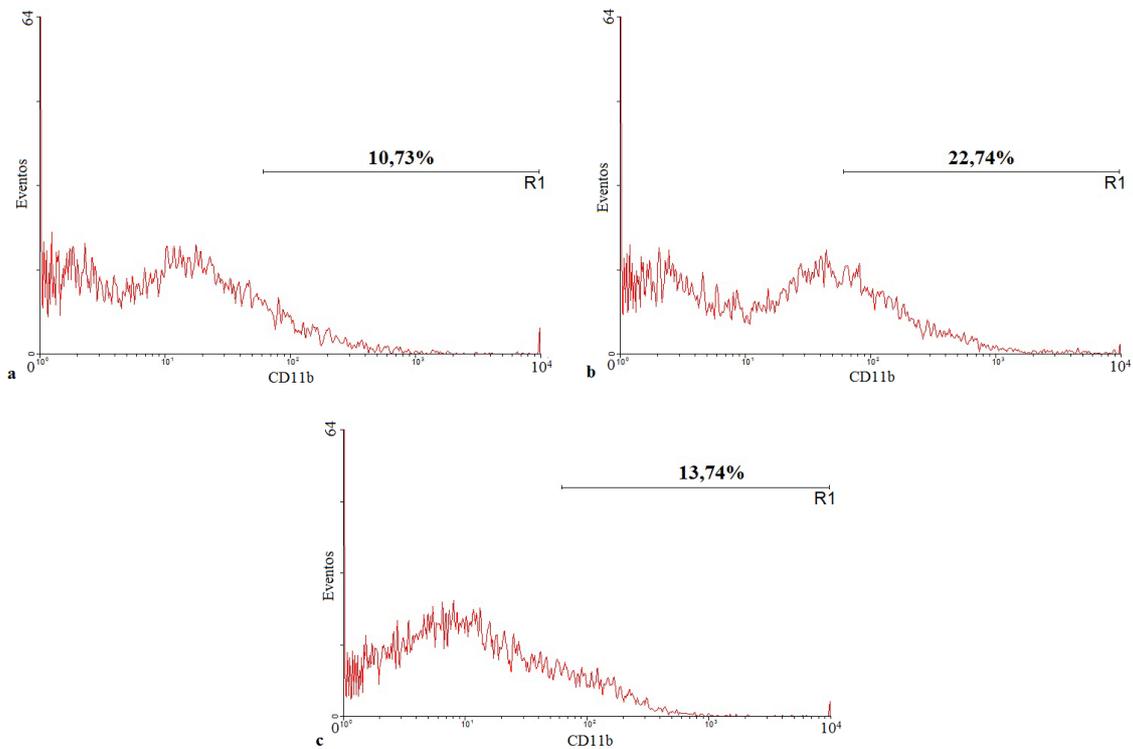


Figura 18. Detecção do marcador de superfície CD11b através da citometria de fluxo em células da medula cultivadas após 96 horas. (a) Células do controle sem tratamento. (b) Células da medula tratadas com AK-100 µg/ml. (c) Células da medula tratadas com M-CSF-100 nM.

4.5.2. Marcação com a proteína de superfície F4/80

Quanto a análise do marcador de superfície celular F4/80, encontrado em grandes quantidades na superfície celular de macrófagos, foi observado que células tratadas com AK apresentaram marcação de 38,52%. Este valor foi bem semelhante a marcação encontrada em macrófagos peritoneais, que foi de 40,37%, enquanto que a marcação do controle sem tratamento foi de 27,25%, bem menor que as marcações do grupo tratado e do controle positivo utilizado neste experimento (Figura 19).

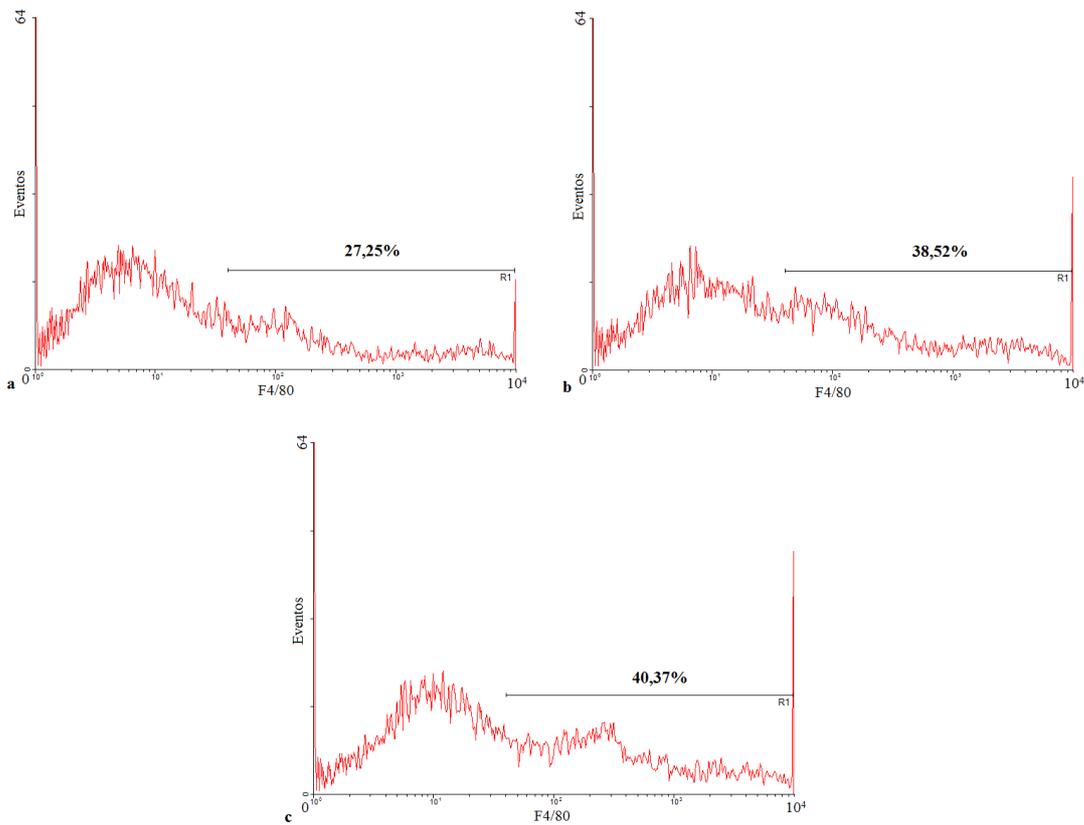


Figura 19. Detecção do marcador de superfície F4/80 através da citometria de fluxo em células da medula óssea de camundongos cultivadas após 96 horas. (a) Células do controle sem tratamento. (b) Células da medula tratadas com AK-100 µg/ml. (c) Controle positivo de macrófagos peritoneais.

4.5.3. Marcação com a proteína de superfície CD11c

O principal marcador de células dendríticas é o CD11c⁺. Com o intuito de verificar se o AK estimula a diferenciação e proliferação das CTH em células dendríticas, foi feita a análise da expressão deste marcador por citometria de fluxo, onde foram observados que as células tratadas com AK marcaram somente 6,88% das células, enquanto que o controle sem tratamento marcou 10,73% de células. Desta forma, o AK parece não estimular a diferenciação e proliferação das CDs (Figura 20).

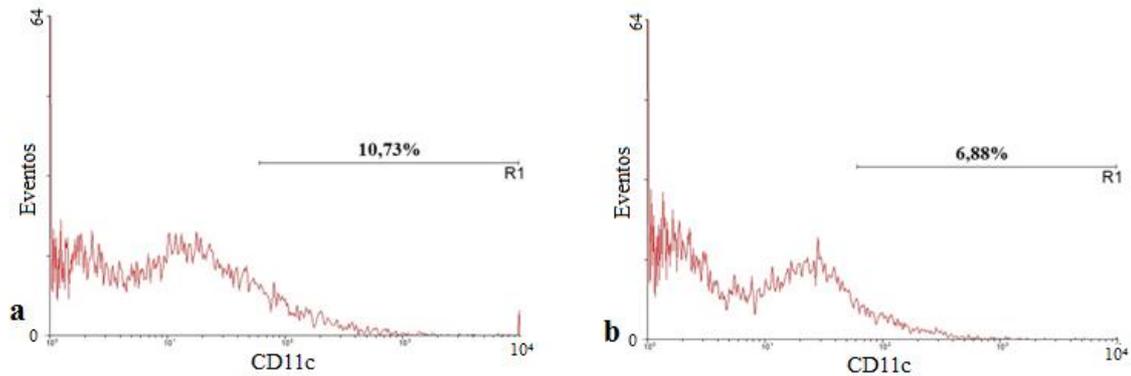


Figura 20. Detecção do marcador de superfície CD11c através da citometria de fluxo em células da medula cultivadas após 96 horas. (a) Células do controle sem tratamento. (b) Células da medula tratadas com AK-100 $\mu\text{g/ml}$.

4.6. RESPOSTA MICROBICIDA DAS CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA TRATADAS COM AK

4.6.1. Análise da atividade fagocítica de células da medula óssea tratadas com AK

Para avaliar capacidade fagocítica das células da medula óssea tratadas com AK após período de cultivo de 96 horas, foi realizada a interação destas células com *Saccharomyces cerevisiae*. Após a análise, foi observado que houve um aumento do índice fagocítico em células tratadas com AK-100 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 21).

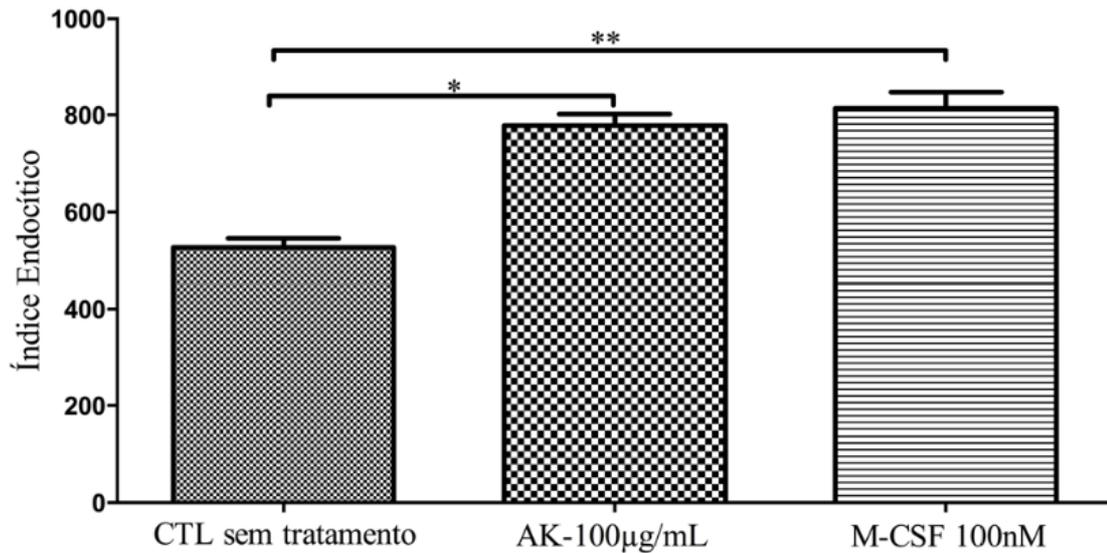


Figura 21. Índice endocítico da interação de células da medula óssea tratadas com AK-100 µg/mL por 96 horas e incubadas com *Saccharomyces cerevisiae*. Como controle positivo foi utilizado células da medula óssea tratadas com M-CSF. Foi utilizado para a análise estatística o teste ANOVA, seguido pelo Teste de Tukey onde (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$.

4.6.2. Dosagem da produção de NO pelas células da medula óssea tratadas com AK

Para saber se as células da medula óssea tratadas com AK produziam NO, foi utilizado o método indireto que dosa a produção de nitrito, conhecido como método de Griess. Os resultados observados mostraram que culturas de células tratadas com AK por 96 horas não produziram NO quando comparadas ao controle sem tratamento (Figura 22).

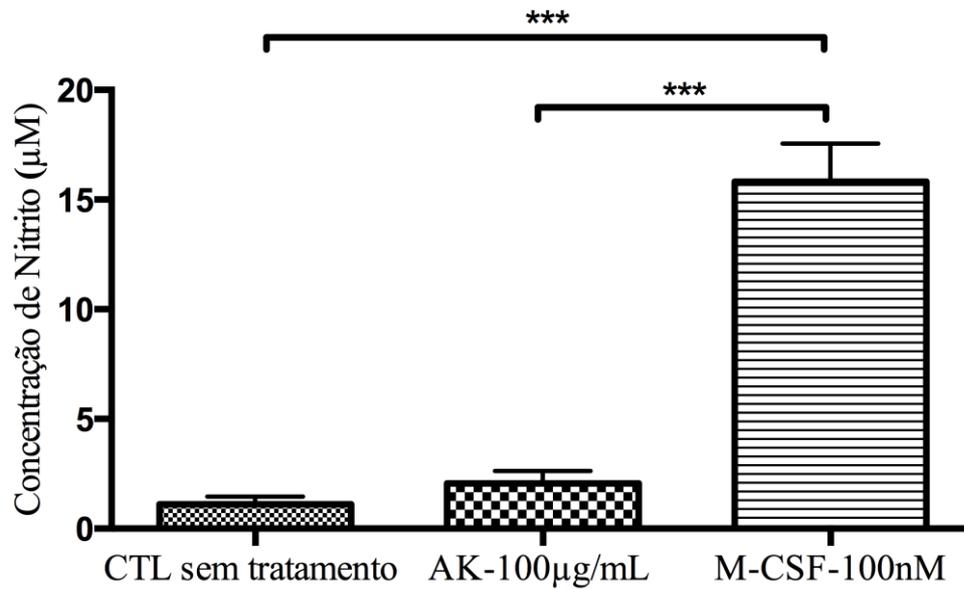


Figura 22. Dosagem de óxido nítrico (NO) de células tratadas com a concentração de AK-100 µg/mL por 96 horas. Foi utilizado para a análise estatística o teste ANOVA, seguido pelo Teste de Tukey onde (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$

4.6.3. Dosagem da produção de ERO pelas células da medula óssea tratadas com AK

4.6.3.1. Pelo método do Nitroblue Tetrazolium (NBT)

O método do NBT consiste em uma reação citoquímica que transforma o NBT em formazan na presença O_2^- . Para detectar se as culturas de células da medula óssea tratadas com AK foram capazes de produzir os radicais superóxidos, foi utilizado então o método do NBT. Dados observados mostraram que houve aumento da produção destes radicais no grupo de células tratadas com AK quando comparadas as células do grupo controle sem tratamento. O grupo tratado com M-CSF também foi capaz de produzir radicais superóxidos (Figura 23).

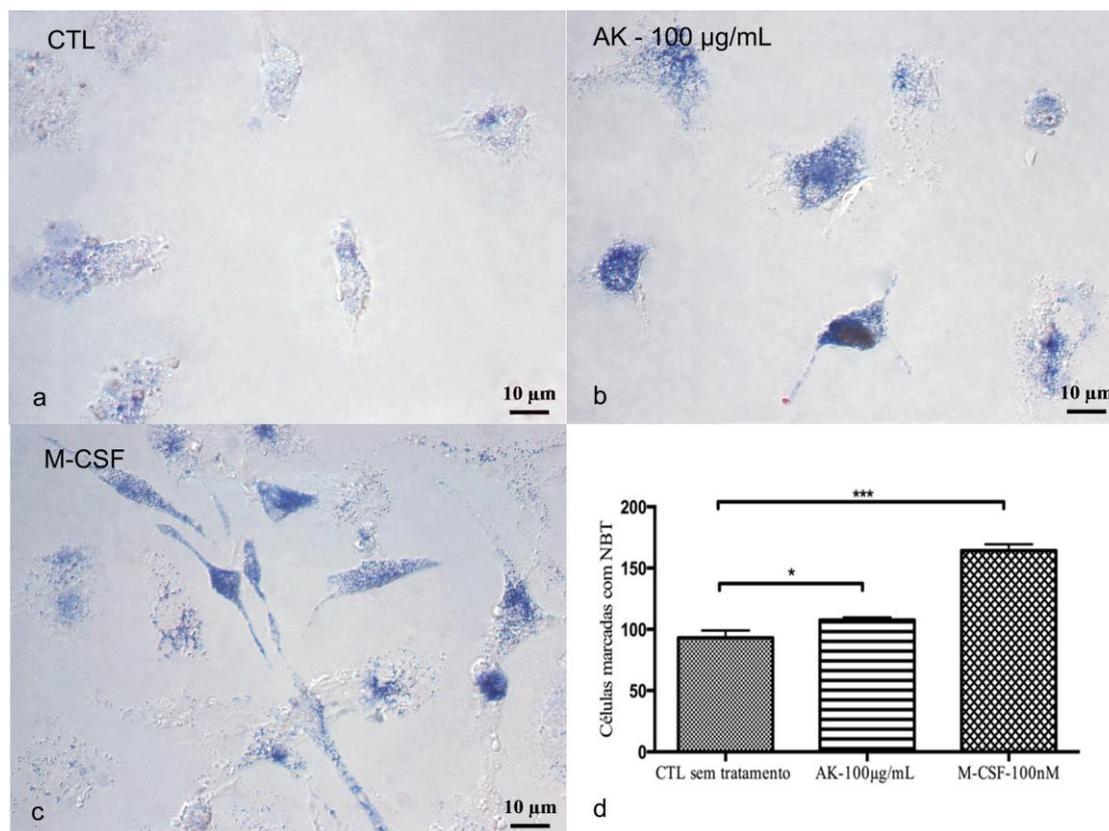


Figura 23. Detecção da produção de superóxido através da reação citoquímica com NBT em macrófagos derivados da medula óssea tratada com AK-100 µg/mL por 96 horas. (a) Controle sem tratamento, (b) Células tratadas com AK-100 µg/mL, (c) Células tratadas com M-CSF, (d) Gráfico da produção de radicais superóxidos a partir da reação citoquímica do NBT . Foi utilizado para a análise estatística o teste ANOVA, seguido pelo Teste de Tukey onde (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$.

4.6.3.2. Pelo kit CellROX®

A detecção de ERO em culturas de células de medula óssea tratadas com AK por um período de 96 horas foi feita pela marcação com o CellRox® Green. Resultados obtidos mostraram que as células tratadas com AK-100 µg/mL não foram capazes de aumentar a produção de ERO, quando comparadas ao grupo controle sem tratamento. Ao contrário das células tratadas com AK, o controle positivo estimulado com M-CSF foi capaz de produzir ERO (Figura 24).

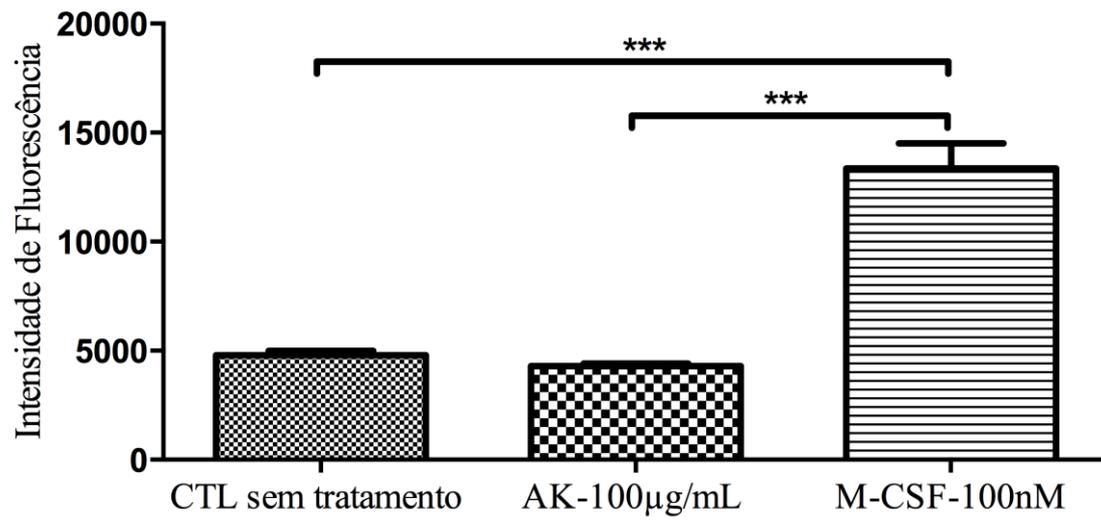


Figura 24. Detecção da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) em células da medula óssea tratados com AK-100 µg/mL por meio do marcador fluorescente CellRox® Green. Como controle positivo foi utilizado células da medula óssea tratadas com M-CSF. Foi utilizado para a análise estatística o teste ANOVA, seguido pelo Teste de Tukey onde (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$.

5. DISCUSSÃO

A medula óssea é um órgão difuso que apresenta intensa atividade hematopoiética, sendo responsável por renovar continuamente todas as células sanguíneas circulantes, como os linfócitos, os polimorfonucleares e mononucleares. Considerando-se que estas células são de fundamental importância para homeostasia e que estão envolvidas na resposta imune do organismo, qualquer anomalia que venha interferir na proliferação e diferenciação dessas células pode levar o organismo a apresentar deficiência no combate a patógenos e ao desenvolvimento de doenças, como as doenças auto-imunes (Silveira, 2000; Abdelhay *et al.*, 2009).

Tendo em vista a importância da proliferação e da diferenciação das células sanguíneas para a defesa do organismo, a busca por novos medicamentos capazes de atuar como imunomoduladores, amplificando ou reprimindo a resposta imune do organismo e que não apresentem citotoxicidade estão sendo alvo de várias pesquisas. Atualmente, um grande número de bioprodutos vem sendo empregados na medicina popular devido aos seus efeitos imunomodulatórios (Missima & Sforcin, 2007; Jordan *et al.*, 2008; Hamsa & kuttan, 2010; Oliveira *et al.*, 2011; Ghonime *et al.*, 2011; Da Silva *et al.*, 2014), porém a ação de metabólitos obtidos de fungos sobre leucócitos é pouco conhecida na literatura.

Dentre estes produtos podemos citar o AK, um metabólito secundário obtido de fungos do gênero *Aspergillus*, muito usado como aditivo alimentar (Bentley *et al.*, 2006), em cosméticos para tratamento de melasmas (Lin *et al.*, 2007; Mi Ha *et al.*, 2007), agente anti-tumoral (Tamura *et al.*, 2006; Moto *et al.*, 2006) e radioprotetor (Emami *et al.*, 2007; Hosseinimehr *et al.*, 2009). Resultados prévios mostrados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Parasitologia da UFPA mostraram que o AK é capaz de induzir a diferenciação de monócitos em macrófagos (Costa, 2012), além de ativar macrófagos, induzindo assim a fagocitose (Rodrigues *et al.*, 2011). Porém, ainda não são conhecidos os efeitos que o AK pode provocar sobre os precursores das células sanguíneas presentes na MO.

Este trabalho mostrou pela primeira vez a ação do AK sobre as células mononucleares provenientes da medula óssea. Primeiramente, foi verificado se o AK é capaz de alterar a viabilidade celular através dos testes de MTT e pela detecção de apoptose e necrose celular através da marcação com Anexina V e PI. Os resultados obtidos mostraram que o metabólito não comprometeu as desidrogenases mitocondriais das células tratadas com AK e nem foi capaz de induzir a morte celular por apoptose após 96 horas de cultivo. Resultados

semelhantes foram obtidos por Rodrigues *et al.* (2011) ao tratar macrófagos peritoneais de camundongos com AK na concentração de 50µg/mL e por Costa (2012) ao tratar monócitos humanos com AK na mesma concentração, concluindo que o AK, quando utilizado nas concentrações de 50 e 100 µg/mL, não é citotóxico para as células da medula óssea.

Após isso, foi realizada a análise por microscopia óptica das células da MO tratadas com 100 µg/mL de AK, onde foi observado que ao longo do período de cultivo, alguns tipos celulares presentes na cultura foram progressivamente aderindo ao substrato, sugerindo assim que o AK estimula a adesão celular ao longo do tempo. Resultados obtidos por da Silva (2013) também demonstrou que o extrato aquoso de *Physalis angulata* (EAPa) estimulou a adesão destas células ao substrato ao longo do tempo de cultivo, reduzindo assim a população de células do sobrenadante.

Na cultura de células obtidas da MO foram observados vários tipos celulares, como linfócitos, polimorfonucleares e mononucleares. Porém, neste estudo foram analisadas somente as células mononucleares tratadas com AK.

As células da medula óssea pertencentes ao sistema fagocítico mononuclear percorrem um longo caminho até se diferenciarem em macrófagos. São originadas a partir de progenitores mielóides, dando origem aos monócitos, os quais migram para os tecidos e podem se diferenciar em macrófagos ou DC (Ziegler-Heitbrock, 2000; Hume, 2006; Geissmann *et al.*, 2010), dependendo do estímulo causado por alguns tipos de citocinas e fatores de crescimento, como o M-CSF (Chomarat *et al.*, 2000).

Os resultados obtidos pela análise quantitativa dos mononucleares mostraram que os monócitos tendem a diminuir progressivamente sua população ao longo do tempo de cultura em todos os grupos, embora os monócitos tratados com AK por 24 horas tenham apresentado uma redução significativa deste tipo celular quando comparadas ao grupo controle sem tratamento. O mesmo resultado foi obtido quando as células foram tratadas com M-CSF.

Quanto à análise quantitativa de macrófagos residentes e ativados, foi observado um aumento no número destas células ao longo do tempo de cultivo em todos os grupos. Porém as células tratadas com AK e M-CSF apresentaram um maior número de células ativadas quando comparado ao grupo controle. Estes resultados sugerem que estas células estejam se diferenciando em macrófagos ao longo do período de cultivo e, que o AK e o M-CSF acelerem este processo de diferenciação, induzindo também a ativação dos macrófagos. Alguns trabalhos descritos na literatura corroboram com os resultados obtidos neste estudo, como Jordan *et al.*, (2008) que mostraram que o fungo *Cordyceps sinensis* promoveu a ativação da resposta imune através da ativação de macrófagos e induziu a produção de

citocinas pró-inflamatórias. Mais recentemente, Rodrigues *et al.*, (2011) mostraram que o AK induziu a ativação de macrófagos murinos promovendo o espraiamento celular e Costa (2012) demonstrou que o AK também é capaz de induzir diferenciação de monócitos humanos em macrófagos.

A análise morfológica das células mononucleares ao longo dos períodos de cultivo mostrou que a maior parte das células tratadas com AK que aderiam ao substrato tinham características típicas de macrófagos, devido às células apresentarem aumento citoplasmático em função do aumento do volume celular, vacuolização citoplasmática e maior número de projeções citoplasmáticas. Esta morfologia foi semelhante àquela exibida pelo grupo tratado com M-CSF, sugerindo que o AK pode estar atuando na diferenciação das células da medula óssea de camundongos de forma semelhante ao fator de crescimento envolvido neste processo. Um estudo realizado por Rodrigues *et al.* (2011) mostrou que células murinas residentes tratadas com o AK também apresentavam um maior espraiamento celular e vacuolização citoplasmática, corroborando com os resultados obtidos neste estudo.

Durante o processo de diferenciação de monócitos em macrófagos, uma série de mudanças e alterações celulares puderam ser observadas, como o aumento do volume celular, o aumento no número de organelas citoplasmáticas, alterações de proteínas de superfície celular encontradas na membrana, o processo de autofagia a indução de vias de sinalização que atuam na diferenciação celular, como a via do PI3K/Akt (Smith *et al.*, 2008; Jaquel *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2012).

Este estudo mostrou que o AK é capaz de aumentar a ativação do PDK-1 e, conseqüentemente, aumentar também a ativação do Akt, através da fosforilação destas proteínas, sugerindo assim que o AK é capaz de ativar a via de sinalização PI3K/Akt induzindo à diferenciação de monócitos em macrófagos. Resultados semelhantes foram obtidos por Jaquel *et al.* (2009) que mostraram que quando o fator de crescimento M-CSF, responsável pela diferenciação de monócitos em macrófagos, se liga ao seu receptor M-CSFR, esta interação induzia a ativação de múltiplos complexos de sinalização celular, incluindo a via PI3K/Akt.

Esta via de sinalização pode estar envolvida também em processos de autofagia, visto que parte deste processo necessita da ativação de caspases (Droin *et al.*, 2009; Jaquel *et al.*, 2012) que são ativadas a partir da via de sinalização PI3K/Akt (Jaquel *et al.*, 2009). Entretanto, mais estudos serão necessários para comprovar se esta via é mesmo capaz de promover autofagia.

Os monócitos podem dar origem tanto a macrófagos quanto a DC (Geissman *et al.*, 2010). Estes dois tipos celulares são muito semelhantes e somente a análise morfológica por microscopia óptica não é suficiente para afirmar que estas células sejam macrófagos. Devido a isso, foi feita uma imunofenotipagem utilizando as proteínas de superfície celular CD11b, F4/80 e CD11c para confirmar os resultados obtidos pela análise morfológica.

O CD11b é uma proteína que está relacionada a adesão e a migração celular e tem seus níveis de expressão progressivamente aumentados conforme o grau de maturação da célula, sendo encontrado em grandes quantidades na superfície celular de monócitos (Gordon & Taylor, 2005). Enquanto que o F4/80 está presente em grandes quantidades somente na superfície de macrófagos. (Khazen *et al.*, 2005). Já o CD11c é uma integrina encontrada em grandes quantidades na superfície de células dendríticas maduras (Hespel & Moser, 2012).

Os resultados obtidos por citometria de fluxo mostraram que células tratadas com AK apresentaram um padrão de marcação das proteínas de superfície CD11b e F4/80 semelhante ou até mesmo maior que ao verificado nos controles positivos utilizados. Estes dados reforçam a ideia de que o metabólito age em células pertencentes à linhagem monocítica e que ele estimula a diferenciação destas células em macrófagos. Resultados semelhantes foram obtidos por Costa (2012) que mostrou monócitos humanos tratados com AK nas concentrações de 50 e 100 µg/mL por 48 e 72 horas também apresentavam um padrão de marcação elevado para a proteína F4/80.

Por outro lado, a marcação com CD11c mostrou que as células tratadas com AK apresentaram marcação positiva de 6,88%, inferior ao controle sem tratamento, que obteve marcação de 10,73%. Este resultado reforça os dados obtidos anteriormente, sugerindo assim que as células da linhagem monocítica tratadas com o metabólito estejam induzindo a diferenciação das células da medula óssea em macrófagos e não em DC. Resultados semelhantes foram observados por Da Silva *et al.* (2014), que mostrou que EAPa promove a diferenciação da linhagem monocítica apenas em macrófagos, sendo incapaz de estimular a diferenciação de monócitos em células dendríticas.

Os macrófagos desempenham um papel fundamental na manutenção da resposta imune inata, desempenhando importantes funções microbidas e participando de mecanismos inflamatórios e imunoregulatórios (Serbina *et al.*, 2008; Rogacev & Heine, 2010). Uma vez ativados, os macrófagos modificam sua morfologia, aumentando o volume citoplasmático devido ao aumento no número de mitocôndrias, retículo endoplasmático e complexo de Golgi (Smith *et al.*, 2008), ocorre vacuolização citoplasmática intensa, expressivo espraiamento celular e redução da cromatina condensada no núcleo (Dickout *et al.*, 2010). As alterações

morfológicas são seguidas do aumento na atividade fagocítica e a produção de agentes microbicidas como NO e ERO (Mosser, 2003).

Como o processo de fagocitose é extremamente útil no combate contra patógenos e na remoção de células apoptóticas, foi verificado neste trabalho se o AK era capaz de induzir o aumento da atividade fagocítica em macrófagos derivados da medula óssea. Os resultados obtidos mostraram que o grupo de células tratadas com AK apresentaram um aumento significativo da atividade fagocítica quando comparadas ao grupo controle, apresentando resultados semelhantes ao grupo tratado com M-CSF. Já foi descrito na literatura que o AK foi capaz de potencializar a atividade fagocítica em neutrófilos (Niwa & Akamatsu, 1991) e mais recentemente em macrófagos murinos (Rodrigues *et al.*, 2011). Chen *et al.*, 2010 também mostraram que frações de ácido polissacarídeo obtidos do fungo *Cordyceps sinensis* potencializaram o mecanismo de fagocitose devido ao seu efeito imunomodulatório, aumentando a defesa do organismo e a ativação de macrófagos. Estes estudos estão de acordo com os resultados obtidos neste estudo e reforçam a ideia de que o AK aumenta a atividade fagocítica de macrófagos.

Sabe-se que o processo de fagocitose desencadeia uma resposta microbicida que culmina na produção de moléculas como NO e ERO (Fang, 2004). Desta forma, este estudo também avaliou se o AK induzia a produção de NO e ERO em macrófagos diferenciados da medula óssea de camundongos. Os resultados obtidos neste estudo mostraram que o AK não foi capaz de induzir a produção de NO, mantendo os níveis de NO semelhantes ao do grupo sem tratamento. Resultados semelhantes foram mostrados por Martins e colaboradores (2008) que mostraram o polissacarídeo proveniente do fungo *Agaricus brasiliensis* também não foi capaz de estimular a produção de NO. Dung *et al.* (2013) também mostrou que o AK e um de seus derivados suprimiam a produção de NO de forma dose dependente, corroborando assim com os resultados obtidos neste trabalho.

Quanto à produção de ERO, o presente estudo mostrou que o AK promoveu o aumento de O_2^- em macrófagos diferenciados a partir da medula óssea quando comparados aos macrófagos do grupo controle, resultado obtido através do teste NBT. Porém, a marcação com o CellRox® Green, que analisa o estresse oxidativo celular, indicou que não ocorreu aumento da produção de nenhum tipo de ERO, visto que não houve diferença significativa entre as células tratadas com AK e as do grupo controle. Porém, este experimento pode ter dado um resultado falso-negativo visto que o tratamento utilizado é muito longo e sendo que estes radicais são instáveis e podem ser reduzidos antes da detecção com Kit CellRox Green. Niwa & Akamatsu (1991) demonstraram que o AK foi capaz de aumentar a capacidade de

neutrófilos produzirem ERO e também o mecanismo de fagocitose. Rodrigues e colaboradores (2011) também mostraram que o AK promoveu a ativação de macrófagos murinos através da produção de superóxidos.

As ERO são produtos do metabolismo celular, podendo apresentar um papel tanto deletério quanto benéfico para o organismo. A superprodução de ERO resulta em estresse oxidativo que é deletério para as células. Porém, as ERO também apresentam papel importante na regulação da transdução de sinal em processos de sinalização (Finkel & Holbrook, 2000). Alguns estudos sugerem também que as ERO podem estar envolvidas com a diferenciação de linhagens hematopoéticas e monocíticas (Sardina *et al.*, 2010). Portanto, esta produção de radicais superóxidos pode estar envolvida com o crescimento e diferenciação celular, visto que as ERO são importantes não somente para a eliminação de patógenos intracelulares, mas também estão envolvidas com a sinalização e a diferenciação celular (Dupré-Crochet *et al.*, 2013).

Por serem células que desempenham importantes funções na resposta imune inata e adquirida, se faz importante o estudo de substâncias que possam potencializar esta resposta imune, tornando-a mais eficaz, através do aumento da diferenciação/ativação das células da medula em macrófagos, em um curto período de tempo. Os resultados obtidos neste trabalho ratificam os estudos já publicados na literatura sobre a ação do AK em células mononucleares. Porém, este estudo mostrou pela primeira vez que o AK poderia ser utilizado como possível agente imunomodulador, atuando em estágios primários da diferenciação das células mononucleares, que ocorrem ainda na medula óssea, promovendo a diferenciação destas células em macrófagos, além de potencializar a resposta imune inata devido a ativação destas células. Embora os resultados obtidos neste trabalho mostrem que o AK atue na diferenciação/ativação destas células, faz-se necessária a realização estudos adicionais para descrever que mecanismos de ação que o AK utiliza para realizar esta diferenciação e ativação dos macrófagos derivados da MO de camundongos.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos e discutidos neste estudo permitem concluir que o Ácido Kójico:

1. Não apresentou citotoxicidade e nem o aumento na indução de morte celular para as células da medula óssea obtidas de camundongos que foram tratadas durante 24, 48, 72 e 96 horas.
2. Interferiu no processo de proliferação e diferenciação das células monocíticas, provocando aumento do número deste tipo celular.
3. Promoveu a diferenciação das células da medula óssea em macrófagos, promovendo também a ativação destas células.
4. Induziu alterações morfológicas nas células diferenciadas, já que houve maior espriamento celular, aumento do volume celular, no número de filopódios e a presença de vacúolos citoplasmáticos.
5. Ativou a via de sinalização celular envolvida na diferenciação de monócitos e macrófagos.
6. Provocou aumento da atividade fagocítica em células diferenciadas e o aumento da produção de radicais superóxidos em macrófagos diferenciados a partir da medula óssea, porém, não foi detectada a produção de NO nas células diferenciadas após 96 horas de cultivo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELHAY, E.S.F.W; BRAGA, F.H.P;BINATO, R; BOUZAS, L.F.S. Hematopoietic stem cells: expansion and perspectives for therapeutic use. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** **31**(Supl. 1):2-8. 2009.
- ABUD, A.P.R., CESAR, B., CAVAZZANI, L.F.M., DE OLIVEIRA, C.C., GABARDO, J., BUCHI, D. F. Activation of bone marrow cells treated with Canova *in vitro*. **Cell Biology International** **30** (10), p. 808--816. 2006.
- AHN, S.M.; RHO, H.S; BAEK, H.S.; JOO, Y.H.; HONG, Y.D.; SHIN, S.S.; PARK, Y.; PARK, S.N. Inhibitory activity of novel kojic acid derivative containing trolox moiety on melanogenesis. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.** **21.** 7466–7469. 2011
- AZEVEDO, E. P.; LEDO, J. H.; BARBOSA, G.; SOBRINHO, M.; DINIZ, L.; FONSECA, A. C. C.; GOMES, F.; ROMÃO, L.; LIMA, F. R. S.; PALHANO, F. L.; FERREIRA, S. T.; FOGUEL, D. Activated microglia mediate synapse loss and short-term memory deficits in a mouse model of transthyretin-related oculoleptomeningeal amyloidosis. **Cell Death & Disease**, **4**(9), e789. 2013.
- BARREDA, D. R., HANINGTON, P. C., BELOSEVIC, M. Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. **Developmental & Comparative Immunology.** **28,** (5);509-554. 2004.
- BENTLEY, R. From *miso*, *sake* and *shoyu* to cosmetics: a century of science for kojic acid. **Nat Prod Rep.** **23**:1046-62, 2006.
- BISWAS, S. K.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. **Nature immunology,** **11** (10): 889 -896, 2010.
- BOBER, L. A.; GRACE, M. J.; PUGLIESE-SIVO, C.; ROJAS-TRIANA, A.; SULLIVAN, L. M.; NARULA, S.K.. The Effects of Colony Stimulating Factors on Human Monocyte Cell Function. **Inl. J. Immunopharmac.****17,** (5): 385-392, 1995.
- BRYDER, D.; ROSSI, D. J.; WEISSMAN, I. L.Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell. **Am J Pathol.** **169,** (2):338-346. 2006.
- BURDOCK, G. A.; SONI, M.G.; CARABIN, I. G. Evaluation of Health Aspects of Kojic Acid in Food. **Regul Toxicol Pharmacol.** **33**:80-101, 2001.

- CANTLEY, L. C. The phosphoinositide 3-kinase pathway. **Science**. 296(5573):1655-7. 2002.
- CASSETTA, L. ; CASSOL, E.; POLI, G. Macrophage Polarization in Health and Disease. **Scientific World Journal**. **11**: 2391-2402, 2011.
- CESAR, B. Avaliação do medicamento homeopático imunomodulador em células de medula óssea de camundongos tratados *in vitro e in vivo*. Curitiba. **Tese (Doutorado em Biologia Celular)**, Universidade Federal do Paraná, 2008.
- CHANG, Z. Q.; LEE, J. S.; GEBRU, E.; HONG, J. H.; JUNG, H. K.; JO, W. S.; PARK, S. C. Mechanism of macrophage activation induced by beta-glucan produced from *Paenibacillus polymyxa* JB115. **Biochem Biophys Res Commun**. **391**:1358-62, 2010.
- CHEE, Y. C.; LEE, E. H. Fungistatic Activity of Kojic Acid Against Human Pathogenic Fungi and Inhibition of Melanin-production in *Cryptococcus neoformans*. **Mycobiology**. **31**(4):248-250. 2003.
- CHEN, W.; ZHANG, W.; SHEN, W.; WANG, K. Effects of the acid polysaccharide fraction isolated from a cultivated *Cordyceps sinensis* on macrophages *in vitro*. **Cell Immun** **262**:69–74. 2010.
- CHO, J. C.; RHO, H.S.; JOO, Y.H.; LEE, C.S.; LEE, J.; AHN S.M.; KIM J.E.; SHIN, S.S.; PARK, Y-H.; SUH, K-D.; PARK, S.N. Depigmenting activities of kojic acid derivatives without tyrosinase inhibitory activities, **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. **22**, 12, 4159-4162, 2012.
- CHOI, H; KIM, K; HAN, J; CHOI, H; JIN, SH; LEE, EK; SHIN, DW; LEE, TR; LEE, A. Y; NOH, M. Kojic acid-induced IL-6 production in human keratinocytes plays a role in its anti-melanogenic activity in skin. **J Dermatol Sci**. **66**(3):207-15, 2012.
- CHOMARAT, P.; BANCHEREAU, J.; DAVOUST, J.; PALUCKA, A. K. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. **Nat Immunol**. **1**(6):510-4, 2000.
- COLLIN M, MCGOVERN N, HANIFFA M. Human dendritic cell subsets. **Immunology**. **140** (1) :22-30, 2013
- COSTA, J. P.; Ação do metabólito secundário 5-hidroxi-2-hidroximetil gama-pirona isolado de fungos do gênero *Aspergillus* sobre monócitos humanos *in vitro*. **Belém, Dissertação (Mestrado em Biologia Celular), Universidade Federal do Pará**. 2012.

- DAIGNEAUT, M.; PRESTON, J. A.; MARRIOTT, H. M.; WHYTE, M. K.; DOCKRELL, D. H. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. **Plos one**. **5**: 1-10, 2010.
- DALE, D. C.; BOXER, L.; LILES, W. C. The phagocytes: neutrophils and monocytes. **Blood**, **112**: 934-945, 2008.
- DA SILVA, B. J. M.; RODRIGUES, A. P. D. FARIAS, L. H. S.; HAGE1, A. A. P.; DO NASCIMENTO, J. L. M.; SILVA, E.O. *Physalis angulata* induces in vitro differentiation of murine bone marrow cells into macrophages. **BMC Cell Biology** 15:37. 2014.
- DA SILVA, Estudo da Ação do Extrato Aquoso Proveniente da Raiz da Planta *Physalis Angulata* sob Células Obtidas da Medula Óssea de Camundongos. **Belém, Universidade Federal do Pará**. 2013.
- DICKOUT, J. G.; LHOTÁK, S.; HILDITCH, B.A.; BASSERI, S.; COLGAN, S. M.; LYNN, E. G.; CARLISLE, R. E.; ZHOU, J.; SOOD, S. K.; INGRAM, A. J.; AUSTIN, R. C. Induction of the unfolded protein response after monocyte to macrophage differentiation augments cell survival in early atherosclerotic lesions. **FASEB Journal** **25**: 1-14, 2010.
- DROIN, N.; JACQUEL, A.; GUERY, L.; DUFOUR, E.; GARRIDO, C.; SOLARY, E. Various functions of caspases in hematopoiesis. **Front Biosci**. **14**:2358-2371. 2009.
- DUNG, T. T.; KIM, S.C.; YOO, B.C.; SUNG, G.H.; YANG, W.S.; KIM, H.G.; PARK, J.G.; RHEE, M.H.; PARK, K.W.; YOON, K.; LEE, Y.; HONG, S.; KIM, J.H.; CHO, J.Y. (5-Hydroxy-4-oxo-4H-pyran-2-yl)methyl 6-hydroxynaphthalene-2-carboxylate, a kojic acid derivative, inhibits inflammatory mediator production via the suppression of Syk/Src and NF- κ B activation. **Int Immunopharmacol**. **20**(1):37-45.2014.
- DUPRÉ-CROCHET, S., ERARD, M., NÜ, O. ROS production in phagocytes: why, when, and where?. **J. Leukoc. Biol**. **94** (4): 657-670, 2013.
- DUTTA, R. C. Peptide immunomodulators versus infection: an analysis. **Immunology Letters**, p.1-9, 2002.
- EDWARDS, J.P.; ZHANG X.; FRAUWIRTH, K.A.; MOSSER, D.M. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. **J Leukoc Biol**, **80**:1298-1307. 2006.

- EMAMI, S.; HOSSEINIMEHR, S.J.; TAGHDISI, S.M.; AKHLAGHPOOR, S. Kojic acid and its manganese and zinc complexes as potential radioprotective agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** **17**, 45–48. 2007.
- FANG, F. C. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. **Nature Reviews Microbiology**. **(2)** 820-832. 2004.
- FINKEL, T.; HOLBOOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**. **408** (6809):239-47. 2000.
- FISCHER, S.O., HÜBNER, G.D., VARGAS, T.V. Imunomodulação pelo própolis. *Arq. Inst. Biol.* **75** (2): 247-253, 2008.
- FITZPATRICK, J. M.; HIRAI, Y.; HIRAI, H.; HOFFMANN, K. F. Schistosome egg production is dependent upon the activities of two developmentally regulated tyrosinases. **The FASEB Journal**. **23**:823-835, 2007.
- FIXE P.; PRALORAN V. Macrophage colony-stimulating-factor (M-CSF or CSF-1) and its receptor: structure–function relationships. **Eur Cytokine Netw**. **8**(2): 125–36) 410. 1997.
- FLORA FILHO, R. & ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. *Metabolismo, síntese e funções*. **Rev Ass Méd Bras** **46**: 265-271, 2000.
- FONSECA A. V. & CORBEIL D. The hematopoietic stem cell polarization and migration. **Communicative & Integrative Biology** **4**:2, 201-204. 2011.
- FOTAKIS, G., TIMBRELL, J.A. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, vermelho neutro, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol. Lett.* **160**: 171-77, 2006.
- FRADE, P. C. R. Ação do Ácido Kójico (AK) sobre neutrófilos humanos e durante infecção com *Leishmania* (*leishmania*) amazonensis. Belém. **Dissertação (Mestrado em Biologia de agentes infecciosos e parasitários)**. **Universidade Federal do Pará**. 2015.
- GEISSMANN F, MANZ MG, JUNG S, SIEWEKE MH, MERAD M, LEY K. Development of monocytes, macrophages and dendritic cells. *Science (New York, NY)*. **327**(5966):656-661, 2010.
- GHONIME, M., ELDOMANY, R., ABLELAZIZ, A., SOLIMAN, H. Evaluation of immunomodulatory effect of three herbal plants growing in Egypt. *Immunopharmacol Immunotoxicol* **33** (1): 141-145, 2011.

- GOBERT-GOSSE, S.; BOURGIN, C.; LIU, W. Q.; GARBAY, C.; MOUCHIROUD, G. M-CSF stimulated differentiation requires persistent MEK activity and MAPK phosphorylation independent of Grb2-Sos association and phosphatidylinositol 3-kinase activity. **Cell Signal.** **17**(11):1352-1362. 2005.
- GOMES, A.J.; LUNARDI, C.N.; GONZALEZ, S.; TEDESCO, A.C. The antioxidant action of *Polypodium leucotomos* extract and kojic acid: reactions with reactive oxygen species. **Braz J Med Biol Res.** **34**(11):1487-94, 2001.
- GORDON, S. & TAYLOR, P. R. Monocyte and Macrophage heterogeneity. **Nature reviews immunology**, volume 5, 2005.
- GU, Y.C.; KORTESMAA, J.; TRYGGVASON, K; PERSSON, J.; EKBLÖM, P.; JACOBSEN, S.E.; EKBLÖM, M. Laminin isoform-specific promotion of adhesion and migration of human bone marrow progenitor cells. **Blood.** **101**(3):877-85. 2003.
- HAMILTON J. A. & ACHUTHAN A. Colony stimulating factors and myeloid cell biology in health and disease. **Trends Immunol.** **12**, S1471-4906, 00144-5, 2012.
- HAMSA, T.P., KUTTAN, G. Ipomoea obscura ameliorates cyclophosphamide-induced toxicity by modulating the immune system and levels of proinflammatory cytokine and gsh. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** **88** (11): 1042-1053, 2010.
- HEMMINGS, B. A.; RESTUCCIA, D. F. PI3K-PKB/Akt pathway. **Cold Spring Harb Perspect Biol.** **4**(9):a011189. 2012.
- HESPEL, C. & MOSER, M. Role of inflammatory dendritic cells in innate and adaptive immunity. **Eur. J. Immunol.** **42** :2535–2543, 2012.
- HIDALGO, A. Hematopoietic stem cell homing: The long, winding and adhesive road to the bone marrow. **Inmunología Vol. 27**, (1) 22-35 2008.
- HORTELANO, S. Inflamación y Macrófagos: amigos e enemigos. Grupo de Terapias Farmacológicas. Instituto de Investigaciones de Enfermedades Raras (IIER), ISCIII. SEBBM
- HOSSEINIMEHR, S. J., EMAMI, S., ZAKARYAEE, V., AHMADI, A., MOSLEMI, D. Radioprotective effects of kojic acid against mortality induced by gamma irradiation in mice. **Saudi Med J.** **30** (4):490-3, 2009.
- HUME, D. A. The mononuclear phagocyte system. **Curr Opin Immunol.** **18**:49–5. 2006.
- HYO-YANG, A., KATHRYN, E., SMITH, F. Two-photon fluorescence microscopy imaging

- of cellular oxidative stress using profluorescent nitroxides. **Journal of the American Chemical Society.** **134** (10): 4721-4730, 2012.
- JACQUEL, A.; BENIKHLEF, N.; PAGGETTI, J.; LALAOUI, N.; GUERY, L.; DUFOUR, E. K.; CIUDAD, M.; RACOEUR, C.; MICHEAU, O.; DELVA, L.; DROIN, N.; SOLARY, E. Colony-stimulating factor-1-induced oscillations in phosphatidylinositol-3 kinase/AKT are required for caspase activation in monocytes undergoing differentiation into macrophages. **Blood.** **114**(17):3633-3641. 2009.
- JACQUEL, A.; OBBA, S.; BOYER, L.; DUFIES, M.; ROBERT, G.; GOUNON, P.; LEMICHEZ, E.; LUCIANO, F.; SOLARY, E.; AUBERGER, P. Autophagy is required for CSF-1 induced macrophagic differentiation and acquisition of phagocytic functions. **Blood.** **119** (19):4527-31. 2012.
- JORDAN J.L.; SULLIVAN A.M.; LEE T.D. Immune activation by a sterile aqueous extract of *Cordyceps sinensis*: mechanism of action. **Immuno pharmacol Immunotoxicol.** **30**(1):53-70. 2008.
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica.** Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, p. 237-240. 2008.
- KHAZEN, W; M'BIKA, J.P.; TOMKIEWICZ, C.; BENELLI, C.; CHANY, C.; ACHOUR, A.; FOREST, C. Expression of macrophages-selective markers in human and rodent adipocytes. **FEBS letters** **579**: 5631-5634. 2005.
- KLEIN, G. The extracellular matrix of the hematopoietic microenvironment. **Experientia.** **51**(9-10):914-26, 1995.
- KLIMP, A.H.; DE VRIES, .; E.G.E. ; SCHERPHOF, G.L. ; DAEMEN, T. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. **Crit Rev Oncol Hematol.** **(44)** 143–161. 2002.
- KONDO M.; WAGERS A. J.; MANZ M. G.; PROHASKA S. S.; SCHERER D. C.; BEILHACK G.F.; SHIZURU J. A.; WEISSMAN I. L. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. **Annu Rev Immunol.** **21**:759-806. 2003.
- KREBSBACH, P.H.; KUZNETSOV, S.A.; BIANCO, P.; ROBEY, P. G. Bone Marrow Stromal Cells: Characterization and Clinical Application. **Crit Rev Oral Biol Med.** **10**(2):165-181, 1999.

- LAJIS, A. F.; HAMID, M.; ARIFF, A. B. Depigmenting effect of kojic acid esters in hyperpigmented B16F1 melanoma cells. **J. Biomed. Biotechnol.** 2012.
- LAPIDOT, T.; DAR, A.; KOLLET, O. How do stem cells find their way home? **Blood.** **106** (6) 1901-1910, 2005.
- LAUSSMANN MA, PASSANTE E, DUSSMANN H, RAUEN JA, WÜRSTLE ML, DELGADO ME, DEVOCELLE M, PREHN JH, REHM M. Proteasome inhibition can induce an autophagy-dependent apical activation of caspase-8. **Cell Death Differ.** **18**(10):1584-1597. 2011.
- LEYDEN, J.J.; SHERGILL, B.; MICALI, G.; DOWNIE, J.; WALLO, W. Natural options for the management of hyperpigmentation. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.** **25**, 1140–1145. 2011.
- LIM, J.T. E. Treatment of melasma using kojic acid in a gel containing hydroquinone and glycolic acid. **Dermatol Surg** **25**: 282-84, 1999.
- LIN, C.H.; WU, H.L.; HUANG, Y.L. Combining high-performance liquid chromatography with on-line microdialysis sampling for the simultaneous determination of ascorbyl glucoside, kojic acid, and niacinamide in bleaching cosmetics. **Anal Chim Acta.** **581**: 102–107. 2007
- LIMA, H. C. Fatos e mitos sobre imunomoduladores. **An. Bras. Dermatol.** **82**, 3. 2007.
- MANNING, B. D.; CANTLEY, L. C. AKT/PKB signaling: navigating downstream. **Cell.** **129**(7):1261-74. 2007.
- MANTOVANI, A.; SOZZANI, S.; LOCATI, M.; ALLAVENA, P.; SICA, A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Trends Immunol.** **23**(11):549-55. 2002.
- MARIM, F.M., SILVEIRA, T.N., LIMA, S.D. JR., ZAMBONI, D.S. A method for generation of bone marrow-derived macrophages from cryopreserved mouse bone marrow cells. **PLoS One.** **5** (12): 152-63, 2010.
- MARTINS, P.R.; GAMEIRO, M.C.; CASTOLDI, L.; ROMAGNOLI, G.G.; LOPES, F.C.; PINTO, A.V. Polysaccharide-rich fraction of *Agaricus brasiliensis* enhances the candidacidal activity of murine macrophages. **Mem Inst Oswaldo Cruz** **103**:244-50, 2008.

- MASIHI, K. N. Immunomodulatory agents for prophylaxis and therapy of infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**. **14**,181-191,2000.
- MAYANI, H., FIGUEROA, E.F., PELAYO, R., MONTESINOS, J.J., GUZMÁN, P.F., GONZÁLEZ, A.C. Hematopoiesis. **Cancelorogia** **2**. 95-107, 2007.
- MAZO, I. B.; MASSBERG, S.; VON ANDRIAN, U.H. Hematopoietic stem and progenitor cell trafficking. **Trends in Immunology**. **32**, 10. 2011.
- MERAD, M.; SATHE, P.; HELFT, J.; MILLER, J.; MORTHA, A. The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting. **Annual review of immunology**. **31**(10).1146, 2013.
- MIAO, B.; SKIDAN, I.; YANG, J.; LUGOVSKOY, A.; REIBARKH, M.; LONG, K.; BRAZELL, T.; DURUGKAR, K. A.; MAKI, J.; RAMANA, C. V.; SCHAFFHAUSEN, B.; WAGNER, G.; TORCHILIN, V.; YUAN, J.; DEGTEREV, A. Small molecule inhibition of phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3) binding to pleckstrin homology domains. **Proc Natl Acad Sci U S A**. **107**(46):20126-31. 2010.
- MISSIMA, F. & SFORCIN, J.M. Green Brazilian Propolis Action on Macrophages and Lymphoid Organs of Chronically Stressed Mice. **eCAM**. **5**(1)71–75. 2008.
- MI-HA, Y.; CHUNG, S.W.; SONG, S.; LEE, H.; SUH, H.; CHUNG, H.Y. 4-(6-Hydroxy-2-naphthyl)-1,3-benzendiol: a potent, new tyrosinase inhibitor. **Biol Pharm Bull** **30**: 1711–1715. 2007.
- MOHAMAD, R.; MOHAMED M.S.; SUHAILI, N.; SALLEH M.M.; ARIFF, A.B. Kojic acid: Applications and development of fermentation process for production. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews** **5**(2), 24-37. 2010.
- MONTEIRO, J.P. & BONOMO, A. Linking immunity and hematopoiesis by bone marrow T cell activity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. **38**: 1475-1486. 2005.
- MOSSER, D.M. The many faces of macrophage activation. **Journal of leukocyte biology**. **73**, 209-212. 2003.
- MOSSER, M & EDWARDS, J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nat Rev Immunol**. **8**:958-969. 2008.

- MOTO, M.; MORI, T.; OKAMURA, M.; KASHIDA, Y.; MITSUMORI, K. Absence of liver tumor-initiating activity of kojic acid in mice. **Arch Toxicol** **80**: 299–304. 2006.
- NARDI, N.B. & ALFONSO, Z.Z.C. The hematopoietic stroma. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. **32**: 601-609. 1999.
- NIWA, Y. & AKAMATSU, H. Kojic acid scavenges free radicals while potentiating leukocyte functions including free radical generation. **Inflammation**. **15** (4):303-15. 1991.
- NOHYNEK, G.J.; KIRKLAND, D.; MARZIN, D.; TOUTAIN, H.; LECLERC-RIBAUD, C.; JINNAI, H. An assessment of the genotoxicity and human health risk of topical use of kojic acid [5-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-4H-pyran-4-one]. **Food Chem Toxicol**. **4**: 93-105, 2004.
- OH, I. H.; & KWON, K. R. Concise review: multiple niches for hematopoietic stem cell regulations. **Stem Cells**. **28**-1243-1249. 2010.
- OLIVEIRA, C.C.; ABUD, A.P.R.; de OLIVEIRA, S.M.; GUIMARÃES, F.S.F.; ANDRADE, L.F.; DI BERNARDI, R.P.; COLLETO, E.L.O.; KUCZERA, D.; da LOZZO, E.J.; GONÇALVES, J.; TRINDADE, E.S.; BUCHI, D.F. Developments on drug discovery and on new therapeutics: highly diluted tinctures act as biological response modifiers. **BMC Complement and Altern Med**, **11**:101. 2011.
- OSAKI, M.; OSHIMURA, M.; ITO, H. PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. **Apoptosis**. **9**(6):667-76. 2004.
- PAPAYANNOPOULOU, T. & SCADDEN, D. T. Stem-cell ecology and stem cells in motion. **Blood**. **111**,(8): 3923–3930. 2008.
- PINHEIRO, D. C. S. N.; LEITE, A. K. R. M.; FARIAS, V. M.; BRAGA, L. T.; LOPES, C. A. P. Atividade imunomoduladora das plantas medicinais: perspectivas em medicina veterinária. **Ciência Animal**. **13**(1):23-32, 2003.
- PIXLEY, F. J.; STANLEY, E. R. CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action. **Trends Cell Biol**. **14**(11):628-638. 2004.
- POLACEC D. S.; MUNIC KOS V; BANJANAC, M.; VRANCIC, M.; CUZIC, S.; BELAMARIC, D; PARNHAM, M. J.; POLANCEC, D. ERAKOVIC, H. V. Azithromycin drives in vitro GM-CSF/IL-4 induced differentiation of human blood

- monocytes toward dendritic-like cells with a regulatory properties. **J Leuk Biol** **91**: 229-243, 2012.
- PUKA, J.; DE MATTOS, H.H. R.V.; GAVRON, A. C.; VIANNA, S.E.O.; VAZ, R.S. Origem e tipos de fagócitos. **RUBS**. **1**: 25-35, 2005.
- RANDOLPH, G.J.; JAKUBZICK, C.; QU, C. Antigen Presentation by Monocytes and Monocyte-derived Cells. **Curr Opin Immunol**. **20**: 52-60. 2008.
- RHO, H.S.; LEE, C.S.; AHN, M.S.; HONG, Y.D.; SHIN, S.S.; PARK, Y.; PARK, S.N. Studies on Tyrosinase Inhibitory and Antioxidant Activities of Benzoic Acid Derivatives Containing Kojic Acid Moiety. **Bull. Korean Chem. Soc.** **32**, (12) 441-14. 2011.
- RIEGER, A. M.; NELSON, K. L.; KONOWALCHUK, J. D.; BARREDA, D. R. Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. **J Vis Exp**. (50) 2597. 2011.
- RODRIGUES, A.P.D.; CARVALHO, A.S.; SANTOS, A.S.; ALVES, C.N.; NASCIMENTO, J.L.M.; SILVA, E.O. Kojic acid, a secondary metabolite from *Aspergillus* sp., acts as an inducer of macrophage activation. **Cell Biol. Int.** **35**, 335–343. 2011.
- RODRIGUES, A.P.D.; FARIAS, L.H.S.; CARVALHO, A.S.C.; SANTOS, A.S.; DO NASCIMENTO, J.L.M.; SILVA, E.O. A novel function for kojic acid, a secondary metabolite from *Aspergillus* fungi, as antileishmanial agent. **PLoS One**. **9** (3);e91259. 2014.
- ROGACEV, K. S.; SEILER, S.; ZAWADA, A.M.; REICHART, B.; HERATH, E.; ROTH D.; ULRICH, C.; FLISER, D.; HEINE G. H. CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes and cardiovascular outcome in patients with chronic kidney disease. **Eur Heart** **32** : 84-92, 2011.
- ROGACEV, K. S. & HEINE, G. H. Human monocyte heterogeneity—a nephrological perspective. **Ne´phrologie & The´rapeutique**. **6**,219–225, 2010.
- SAHA, P. & GEISSMANN, F. Toward a functional characterization of blood monocytes. **Immunol Cell Biol** **89**: 2- 4, 2011.
- SARDINA, J. L.; LÓPEZ-RUANO, G.; SÁNCHEZ-ABARCA, L. I.; PÉREZ-SIMÓN, J. A.; GAZTELUMENDI, A.; TRIGUEROS, C.; LLANILLO, M.; SÁNCHEZ-YAGÜE, J.; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, A. P22^{phox}-dependent NADPH oxidase activity is

- required for megakaryocytic differentiation. **Cell Death and Differentiation**. **17**, 1842–1854. 2010.
- SERBINA, N.V.; JIA, T.; HOHL, T. M.; PAMER, E.G. Monocytemediated defense against microbial pathogens. **Rev Immunol**, **26**: 421–452. 2008.
- SHERR C.J. Regulation of mononuclear phagocyte proliferation by colony-stimulating factor-1. **Int J Cell Cloning**. **8**(1):46–60. Discussion-2. 1990.
- SILVEIRA, P. A. A. Hematopoiese: alguns aspectos. **J. Bras Nefrol**. **22**(Supl 5): 5-6, 2000.
- SMITH, E.; PRETORIUS, E.; ANDERSON, R.; OOMMEN, J.; POTJO, M.; Differentiation of Human Monocytes *in vitro* Following Exposure to Canova in the Absence of Cytokines. **Ultrastructural Pathology** **32**: 147-152, 2008.
- STANLEY E.R.; BERG K.L.; EINSTEIN D.B.; LEE P.S.; PIXLEY F.J.; WANG Y; YEUNG Y.G.. Biology and action of colony-stimulating factor-1. **Mol Reprod Dev** . 46(1):4-10. 1997.
- TAMURA, T.; MITSUMORI, K.; TOTSUKA, Y.; WAKABAYASHI, K.; KIDO, R.; KASAI, H.; NASU, M.; HIROSE, M. Absence of *in vivo* genotoxic potential and tumor initiation activity of kojic acid in the rat thyroid. **Toxicology**. **222**: 213–224. 2006.
- TRAVLOS, G. S. Normal structure, function, and stology of the bone marrow. **Toxicology Pathology** **34** (5):548-565. 2006.
- VANHAESEBROECK, B.; ALESSI, D. R. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. **Biochem J**. **346** (3):561-76. 2000.
- VEREYKEN, E.J.F.; HEIJNEN, P.D.; BARON, W.; VRIES, E. H. E.; DIJKSTRA, C.D.; TEUNISSEN, C.E. Classically and alternatively activated bone marrow derived macrophages differ in cytoskeletal functions and migration towards specific CNS cell types. **Journal of Neuro inflammation**. **8**:58. 2011.
- VERRECK, F. A.; DE BOER, T.; LANGENBERG, D.M.; VAN DE ZAN, L.; OTTENHOF, T. H. Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophage in response to microbial antigens and inf-gamma and CD40l-mediated coestimulation. **J. Leucok. Biol**. **79** (2):285-293, 2006.
- VITURI, C.L.; ALVAREZ-SILVA, M.; TRENTIN, A.G.; BORELLI, P. Capacidade da matriz extracelular da medula óssea de induzir proliferação de células mielóides *in vitro*

- no modelo de desnutrição protéica em camundongos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. **44**, (3) 2008.
- WING E.J.; AMPEL N.M.; WAHEED A.; SHADDUCK R.K. Macrophage colonystimulating factor (M-CSF) enhances the capacity of murine macrophages to secrete oxygen reduction products. **J Immunol**. **135**(3):2052–6. 1985.
- YONA, S. & JUNG, S. Monocytes subsets, origins, fates and functions. **Curr Op Hem**. **17**: 53-59, 2010.
- ZANG, Y.; MORGAN, M. J.; CHEN, K.; CHOKSI, S.; LIU, Z. G. Induction of autophagy is essential for monocyte-macrophage differentiation. **Blood**. **119** (12): 2895-2905. 2012.
- ZEIGLER- HEITBROCK, L.; ANCUTA, p.; CROWE, S.; DALOD, M.; GRAU, V.; HART, D.N.; LEENEN, P.J.M.; LIU Y.J.; PHERSON, M.G.; RANDOLPH, G. J.;SCHERBERICH, J.; SCHMITZ, J.; SHORTMAN, K.; SOZZANI, S.; STROBL, H.; ZEMBALA, M.; AUSTYN, J.M.; LUTZ, M.B. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. **J Amer Soc Hematol**. **6**: 74-80, 2010.
- ZIEGLER-HEITBROCK HW. Definition of human blood monocytes. **J Leukoc Biol**. **6** 67:603. 2000.
- ZUCKERMAN, K.S. & WICHA, M.S. Extracellular Matrix Production by the Adherent Cells of Long-Term Murine Bone Marrow Cultures. **Blood**, **61**. No. 3. 1983.