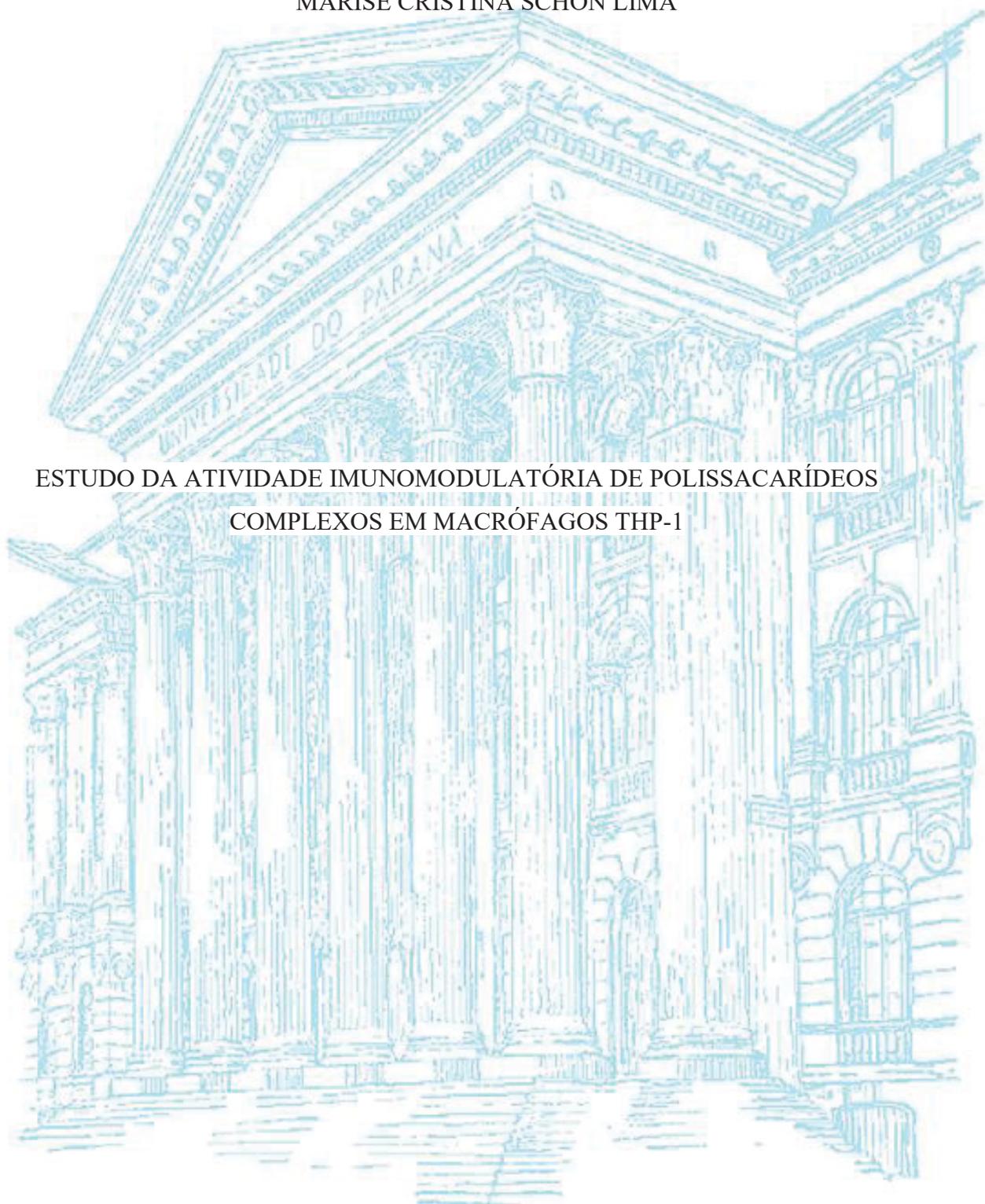


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARISE CRISTINA SCHON LIMA

ESTUDO DA ATIVIDADE IMUNOMODULATÓRIA DE POLISSACARÍDEOS
COMPLEXOS EM MACRÓFAGOS THP-1



CURITIBA

2019

MARISE CRISTINA SCHON LIMA

ESTUDO DA ATIVIDADE IMUNOMODULATÓRIA DE POLISSACARÍDEOS
COMPLEXOS EM MACRÓFAGOS THP-1

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências – Bioquímica.

Orientador: Prof(a) Dra. Lucimara M. C. Cordeiro

Co-orientadora: Prof(a) Dra. Georgia Erdmann do Nascimento

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Lima, Marise Cristina Schon.

Estudo da atividade imunomodulatória de polissacarídeos complexos em macrófagos THP-1. / Marise Cristina Schon Lima. – Curitiba, 2019.
77 f. : il.

Orientadora: Lucimara M. C. Cordeiro.

Coorientadora: Georgia Erdmann do Nascimento.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica.

1. Macrófagos. 2. Polissacarídeos. 3. Pesquisa biológica. I. Título. II. Cordeiro, Lucimara M. C.. III. Nascimento, Georgia Erdmann do. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

CDD (20. ed.) 547.782



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
(BIOQUÍMICA) - 40001016003P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **MARISE CRISTINA SCHON LIMA** intitulada: **ESTUDO DA ATIVIDADE IMUNOMODULATÓRIA DE POLISSACARÍDEOS COMPLEXOS EM MACRÓFAGOS THP-1**, sob orientação da Profa. Dra. LUCIMARA MACH CORTES CORDEIRO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 29 de Outubro de 2019.

LUCIMARA MACH CORTES CORDEIRO

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

SHEILA MARIA BROCHADO WINNISCHÖFER

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

FABÍOLA IAGHER

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

À Deus, pelo dom da vida,

à família, por tornar a vida mais fácil e aos amigos, por torná-la mais divertida.

AGRADECIMENTOS

No céu agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e por me proporcionar todas as condições físicas e mentais para desenvolver esse trabalho, a Maria, Mãe de Jesus pela proteção a mim concedida, conforme crê minha fé e a Jesus Cristo por ter dado sua vida em expiação de nossos pecados.

Na terra meu maior agradecimento a eles, meu querido pai, Conrado Schon *In memoriam*, por todo sacrifício, entrega, amor e apoio recebido e certeza tenho que está comemorando comigo em sentimento e me abraçando dos céus e a minha querida mãe, Regina Ripka Schon, pela personalização do amor e da entrega ao próximo, por todos os conselhos na hora certa, por todas as palavras de apoio e por nunca, nenhum dia sequer, no decorrer de nossas vidas se lamentar da caminhada difícil e com essa total entrega à sua família me mostrou toda a força que temos dentro de nós.

À meu amado esposo, Marcio, pelo apoio, paciência em suportar meus momentos de dúvida, estresse, ansiedade, ausência e por todo amor que sente por mim. Em especial dedico a meu maior tesouro, melhor parte de mim, meu amado filho Arthur, por compreender minha ausência, pelo apoio e pelas várias vezes “você consegue” e por me dar os melhores abraços de alma em todos os momentos que precisei. Amo te para todo o sempre!

A todos os meus familiares, pelo incentivo, apoio e por compartilhar essa caminhada junto a mim me proporcionando dias alegres e leves, onde tudo fica mais fácil. Amo! Amo!

Gratidão e amor eterno a vocês!

A minha querida professora orientadora e amiga Lucimara Mach C. Cordeiro, por me acolher, por todos os ensinamentos, tanto os técnico-científicos como os de ética, responsabilidade e amor à missão de ensinar. Você representa maravilhosamente bem esse pensamento de Cora Coralina “*Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina*”. Pra mim você sempre será a melhor porque, além do conhecimento, tens a habilidade de se colocar no mesmo nível de comunicação e assim fazer acessível o conteúdo. A minha eterna “mãe científica” meu muito obrigada! Jamais esquecerei!

A amiga Georgia Erdmann do Nascimento por ter aceitado ser minha co-orientadora, por toda paciência e competência em transmitir conhecimento. Pelos salvamentos com a tecnologia e pelo incentivo. Obrigada por ter sido você!

A professora Fabíola Iagher pela colaboração neste trabalho e pela participação na banca examinadora.

A professora Sheila Maria B. Winnischofer por todas as correções e sugestões durante o decorrer deste trabalho e pela participação na banca examinadora.

A Marcia Helena Appel pela colaboração com os protocolos, reagentes e ensinamentos.

A todos os professores pelos ensinamentos, ajuda com equipamentos, reagentes, materiais e também a outros professores que de uma forma ou outra me ajudaram.

A Fhernanda Smiderle pelos ensinamentos e apoio.

As amigas Hellen Abreu e Shayane Silva Milhorini pela parceria nos ensaios. Por dividirem comigo seus conhecimentos e esforços. Valeu meninas!

A Vanessa Scheneider, Kahlile Abboude e Salles Pethrers pela amizade e por dividir comigo as angústias, tarefas e alegrias!

A todos os amigos e colegas da pesquisa que me ajudaram ou apenas dedicaram seu tempo mesmo que para uma conversa!

A todos que purificaram, caracterizaram e cederam as frações para o trabalho. Meu muito obrigada!

E a todos os meus amigos fora da pesquisa por tornarem minha vida mais alegre e por acreditarem em mim.

A todos os técnicos pelas análises e disposição em ajudar. Vocês fazem a diferença!

Aos funcionários da limpeza, manutenção e restaurante universitário por tornar o caminho mais organizado, mais fácil e mais saboroso!

Quero expressar minha sincera gratidão a você, não importa quantos nomes tenha!

Ninguém cruza nosso caminho à toa! E espero ter deixado um pouco de luz!

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica da UFPR.

Ao CNPq e a CAPES pelo suporte financeiro.

QUE DEUS ABENÇOE A TODOS E MUITO OBRIGADA!!!

“Nada nesse mundo faz sentido se não tocarmos o coração das pessoas.

Se a gente cresce com os golpes duros da vida, também crescemos com os toques suaves da alma.”

Cora Coralina

RESUMO

Os polissacarídeos de plantas têm atraído atenção como uma importante classe de moléculas biomoduladoras e com poucos efeitos adversos quando comparados a polissacarídeos isolados de bactérias e compostos sintéticos. Assim, o objetivo do presente estudo foi testar a atividade imunomoduladora em macrófagos THP-1 de seis diferentes polissacarídeos já quimicamente caracterizadas pelo grupo de pesquisa de Química dos Carboidratos – UFPR. Para isso as frações foram testadas quanto ao seu potencial citotóxico pelos métodos MTT, Vermelho neutro e Cristal violeta e as concentrações não tóxicas foram estabelecidas para as frações. Com exceção das frações HG+Ara Acerola e AX Tucumã, todas as demais frações aumentaram a produção de ânion superóxido pelos macrófagos, de maneira inversamente proporcional, ou seja, quanto maior a concentração das amostras menor foi o nível deste radical livre. O aumento na atividade fagocítica somente foi observado para as frações HG + AG-I TAMARILHO e HG + Ara CARAMBOLA e em concentrações pontuais. Para a secreção de citocinas somente quatro frações foram testadas. Para a citocina IL-10, com exceção da fração HG + Ara – CARAMBOLA, as concentrações de 50 µg/mL e 200 µg/mL resultaram em um aumento significativo da produção desta citocina quando comparado ao controle negativo. Quando as frações foram incubadas na presença do LPS, com exceção da fração AG-I + AG-II – CARAMBOLA na concentração de 200µg/mL, não houve diferenças significativas na quantificação de IL-10 quando comparado com o LPS sozinho. Para a IL1-β, apenas as frações AG-I AMEIXA e AG-I + AG-II Carambola (ambas na concentração de 200 µg/mL) e HG + Ara Acerola (na concentração de 10 µg/mL), foram capazes de provocar aumento na secreção em comparação ao controle negativo – PBS. A fração HG + Ara Carambola diminuiu estatisticamente a secreção de IL1-β na concentração de 10 µg/mL quando comparada ao controle negativo – PBS. Quando as frações foram incubadas na presença do LPS, com exceção da fração AG-I 50E Ameixa (na concentração de 200µg/mL), que apresentou um aumento na secreção da IL1-β, não houve diferenças significativas na secreção desta citocina quando comparado com o LPS sozinho. Desta maneira, observou-se que a atividade imunomodulatória das frações variou, e isto poderia estar relacionado com as diferentes estruturas químicas dos polissacarídeos testados.

Palavras-chave: macrófagos, polissacarídeos, modificadores da resposta biológica.

ABSTRACT

Plant polysaccharides have attracted attention as an important class of biomodulatory molecules and with few adverse effects when compared to polysaccharides isolated from bacteria and synthetic compounds. Thus, the objective of the present study was to test the immunomodulatory activity in THP-1 macrophages of six different polysaccharides already chemically characterized by the research group of Carbohydrate Chemistry - UFPR. For this, the fractions were tested for their cytotoxic potential by the MTT, Neutral Red and Crystal violet methods and non-toxic concentrations were established for the fractions. With the exception of the HG + Ara Acerola and AX Tucumã fractions, all other fractions increased the production of superoxide anion by the macrophages, in an inversely proportional manner, that is, the higher the concentration of the samples, the lower the level of this free radical. The increase in phagocytic activity was only observed for the HG + AG-I TAMARILHO and HG + Ara CARAMBOLA fractions and in point concentrations. For cytokine secretion, only four fractions were tested. For the cytokine IL-10, except for the fraction HG + Ara - CARAMBOLA, the concentrations of 50 µg/mL and 200 µg/mL resulted in a significant increase in the production of this cytokine when compared to the negative control. When the fractions were incubated in the presence of LPS, with the exception of the fraction AG-I + AG-II - CARAMBOLA at a concentration of 200µg/mL, there were no significant differences in the quantification of IL-10 when compared to LPS alone. For IL1-β, only the fractions AG-I Ameixa and AG-I + AG-II Carambola (both at a concentration of 200 µg/mL) and HG + Ara Acerola (at a concentration of 10 µg/mL) were able to increase the secretion compared to the negative control - PBS. The HG + Ara Carambola fraction statistically decreased the secretion of IL1-β at a concentration of 10 µg/mL when compared to the negative control - PBS. When the fractions were incubated in the presence of LPS, with the exception of the AG-I 50E Ameixa fraction (at a concentration of 200µg/mL), which showed an increase in the secretion of IL1-β, there were no significant differences in the secretion of this cytokine when compared with the LPS alone. Thus, it was observed that the immunomodulatory activity of the fractions varied, and this could be related to the different chemical structures of the tested polysaccharides.

Keywords: macrophages, polysaccharides, biological response modifiers.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - OS DIFERENTES MEMBROS DA FAMÍLIA DE RECETORES TOLL-LIKE.....	24
FIGURA 2 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DA FAGOCITOSE.....	25
FIGURA 3 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DO <i>BURST</i> RESPIRATÓRIO.....	26
FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DA PAREDE CELULAR PRIMÁRIA VEGETAL DE DICOTILEDÔNEAS.....	30
FIGURA 5 - MODELOS ESQUEMÁTICOS DO COMPLEXO DE PECTINAS (A) MODELO TRADICIONAL COM CADEIA PRINCIPAL FORMADA POR HG INTERCALADA COM RG-I RAMIFICADA E RG-II. (B) MODELOS NÃO TRADICIONAIS MOSTRANDO QUE HG PODEM FAZER PARTEDAS CADEIASLATERAIS DE RG-I.....	31
FIGURA 6 - POLISSACARÍDEOS HEMICELULÓSICOS DE PLANTAS. (A) SÃO CARACTERIZADAS PELA LIGAÇÃO β -(1→4) EM CONFIGURAÇÃO EQUATORIAL NO C-1 E C-4. (B) REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL DE XILOGLUCANA E HETEROXILANAS.....	33
FIGURA 7 - MECANISMOS DE RECONHECIMENTO DE POLISSACARÍDEOS POR MACRÓFAGOS.....	35
FIGURA 8 - ESQUEMA COM OS POTENCIAIS MECANISMOS DA IMUNOMODULAÇÃO POR POLISSACARÍDEOS RESISTENTES QUANDO INGERIDOS VIA ORAL.....	37
FIGURA 9 - EFEITO DOS POLISSACARIDEOS SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE MACRÓFAGOS THP-1 PELO MÉTODO DO MTT.....	46
FIGURA 10- EFEITO DOS POLISSACARIDEOS SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE MACRÓFAGOS THP-1 PELO MÉTODO DO VERMELHO NEUTRO.....	49
FIGURA 11- EFEITO DOS POLISSACARIDEOS SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE MACRÓFAGOS THP-1 PELO MÉTODO DO CRISTAL VIOLETA.....	51
FIGURA 12 - EFEITO DOS POLISSACARIDEOS NA QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE	

ÂNION SUPERÓXIDO DE MACRÓFAGOS THP-1.....	53
FIGURA 13 - EFEITO DOS POLISSACARÍDEOS SOBRE A CAPACIDADE FAGOCÍTICA DE MACRÓFAGOS THP-1.....	55
FIGURA 14 - EFEITO DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS SOBRE A SECREÇÃO DE CITOCINA IL-10 EM MACRÓFAGOS THP-1.....	58
FIGURA 15 - EFEITO DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS SOBRE A SECREÇÃO DE CITOCINA IL-1 β EM MACRÓFAGOS THP-1.....	60
FIGURA 16 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Ac.COOH	-Ácido acético
ANWS	- Pectina do pimentão
APCs	- <i>Antigen-Presenting Cells</i>
Ara	- Arabinose
C-1	-Carbono 1
C-4	-Carbono 4
CD14	-Receptor CD14
CD40	-Receptor CD40
CD40L	-Receptor CD40L
CFU-GM	-Unidades formadoras de colônias de granulócitos-macrófagos
CNTG	-Goma de exudato do cajueiro
CNTG-AGP	-Fração arabinogalactana-proteína
CSF	-Fatores estimuladores de colônia
CV	-Cristal violeta
CXCL8	- <i>Motifchemokineligand 8 [Homo sapiens (human)]</i>
DC	-Céluladendrítica
DC-SIGN	- <i>Dendritic Cell-Specific Intercellularadhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin</i>
DE	-Grau de esterificação
D-GalA	-D-galacturônico
DMSO	-Dimetilsulfóxido
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
ELISA	- <i>Enzyme-Linked.Immuno.Sorbent.Assay</i>
EtOH	-Etanol

Gal	-Galactose
GalA	-Ácido galacturônico
Glc	-Glucose
H ₂ O	-Água
HG	-Homogalacturonana
HM	- <i>High methoxyl pectin</i>
HRP	-Estreptavidina
IgG-Fc	-Receptores Fc-gama (Imunoglobulina G)
IL-10	-Interleucina IL-10
IL-12	-Interleucina IL-12
IL-1 β	-Interleucina IL-1 β
IL-6	-Interleucina IL-6
J774.A1	-Linhagem de macrófago
K ⁺	-Potássio
KOH	- Hidróxido de potássio
LDL	- <i>Low Density Lipoprotein</i>
LM	- <i>Low methoxyl pectin</i>
LPS	-Lipopolissacarídeo
Man	-Manose
MHCII	-Moléculas complexo principal de histocompatibilidade classe II
ml	-Mililitro
MN	-Macrófagos mononucleares
MPO	-Mieloperoxidase
MR	-Receptorde manose

MRB	-Modificadores da Resposta Biológica
MTT	-Brometo de 3,4,5,-dimetil-2-tiazolil-2,5-difenil-2H-tetrazolium
MΦ	-Macrófagos
NADPH	-Nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato
NBT	- <i>Nitroblue tetrazolium</i>
Ng	-Nanograma
NK	- <i>Natural Killer Cell</i>
nM	-Nanomolar
OP	-Fração pectina da casca dos frutos de cacau (<i>Theobromacacao</i> L.)
PBMCs	-Células mononucleares de sangue periférico
PBS	- <i>PhosphateBuffered Saline</i>
Pg	-Picograma
PMA	- <i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
RAW 264.7	-Linhagem de macrófago
RG-I	-Ramnogalacturonana tipo I
RG-II	-Ramnogalacturonana tipo II
Rha	-Rhamnose
RNAs	-Ácidos ribonucleicos
RNI	-Intermediários reativos de nitrogênio
ROS	-Espécie reativa de oxigênio
RPMI 1640	- <i>Roswell Park Memorial Institute</i> (meio de cultura)
RRP	-Receptores de reconhecimento de padrões
SFB	-Soro fetal bovino
SF-WSP	-Arabinogalactana isolada do jambo

SOD	-Superóxido dismutase
TEDs	-Extensões dendríticas trans-epiteliais
TGF	-Fatores de transformação de crescimento
TH1	-T <i>helper</i> 1
TH2	-T <i>helper</i> 2
THP-1	- <i>Human acute monocytic leukemia cell line</i>
TLR	-Recetores "Toll-like"
TMB	-Tetrametilbenzidina
TNF α	-Fator de necrose tumoral alfa
Uronic acid	-Ácido urônico
VN	-Vermelho neutro
Xyl	-Xylose
α	-Alfa
B	-Beta
IFN γ	-Interferon gama
μ g	-Micrograma

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1. O SISTEMA IMUNE	20
2.2. MACRÓFAGOS	21
2.2.1. Capacidade fagocítica	23
2.2.2. Ativação do “burst” oxidativo	25
2.2.3. Capacidade secretória de citocinas IL-10, IL-1 β	27
2.2.3.1. Interleucina IL-10	27
2.2.3.2. Interleucina IL-1 β	28
2.3. POLISSACARÍDEO DE PLANTAS	29
2.3.1. Pectinas	29
2.3.2. Hemiceluloses	32
2.4. POLISSACARÍDEOS MODIFICADORES RESPOSTA BIOLÓGICA	34
2.5. IMUNOMODULAÇÃO POR POLISSACARÍDEOS RESISTENTES (FIBRAS DIETÉTICAS) INGERIDOS POR VIA ORAL	36
3. OBJETIVOS	38
3.1. OBJETIVO GERAL	38
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
4. MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1. AMOSTRAS	38
4.2. PREPARO DAS AMOSTRAS	39
4.3. ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS POLISSACARÍDEOS <i>IN VITRO</i>	39
4.3.1. Cultivo celular e diferenciação de macrófagos	39

4.3.2. Tratamentos utilizados	40
4.3.3. Viabilidade celular (método MTT)	41
4.3.4. Retenção lisossomal (Vermelho neutro)	41
4.3.5. Número de células aderidas (Cristal violeta)	42
4.3.6. Quantificação dos níveis de ânion superóxido	42
4.3.7. Capacidade fagocítica	43
4.3.8. Quantificação dos níveis de citocinas	43
4.3.9. Capacidade de adesão	44
4.4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	44
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1. VIABILIDADE CELULAR	45
5.1.1. MTT	45
5.1.2. Vermelho neutro	47
5.1.3. Cristal violeta	50
5.2. QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE ÂNION SUPERÓXIDO	52
5.3. CAPACIDADE FAGOCÍTICA	54
5.4. QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS	56
5.4.1. Interleucina IL-10	57
5.4.2. Interleucina IL-1 β	59
6. CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS	65

1. INTRODUÇÃO

O conjunto de reações bioquímicas em resposta a microorganismos invasores, macromoléculas (proteínas e polissacarídeos) sem necessariamente implicar num quadro patológico é designado imunidade. O sistema imune é constituído por moléculas e células e esta ação coletiva e coordenada destes componentes frente às substâncias invasoras constituem a chamada resposta imune (GOLDSBY *et al.*, 2000; ABBAS, 2000).

O sistema imune pode ser classificado didaticamente em dois mecanismos básicos, imunidade natural (inata) e imunidade específica (adquirida). A imunidade natural ou inata constitui a primeira linha de defesa do organismo, sendo que sua ação depende da participação de um componente celular, geralmente fagócitos (como neutrófilos e macrófagos) e também um componente não celular formado por moléculas circulantes, como o sistema complemento. A imunidade específica ou adquirida é formada principalmente por linfócitos e seus produtos de secreção, como os anticorpos. Diferente de fagócitos e do sistema complemento, os linfócitos e anticorpos são altamente específicos, podendo diferenciar antígenos e também aumentar a resposta frente a repetidas exposições ao mesmo antígeno (ABBAS, 2000). Estes dois mecanismos (inato e adquirido) atuam de forma cooperativa e interativa otimizando a defesa do organismo frente ao componente invasor (antígeno) (GOLDSBY *et al.*, 2000; ABBAS, 2000).

Para ser eficaz o sistema imunológico deve atender a quatro principais aspectos. O primeiro é o reconhecimento imunológico, realizado pelas células brancas presentes no sangue que proporcionarão uma resposta imediata. O segundo é controlar e eliminar a infecção, ação realizada pelo sistema complemento, anticorpos e por células com capacidade destrutiva, tais como linfócitos e macrófagos. O terceiro aspecto é um controle desta resposta, evitando maiores danos ao organismo como alergias e doenças autoimunes. O quarto e último aspecto é produzir uma memória imunológica (MURPHY, TRAVERS e WALPORT, 2010).

Macrófagos são células que fazem parte do sistema de fagócitos mononucleares e são amplamente distribuídos nos tecidos do organismo (BURKE; LEWIS, 2002; GORDON; TAYLOR, 2005). Derivam da medula óssea através de células progenitoras mielóides (unidades formadoras de colônias de granulócitos-macrófagos). Esta célula progenitora sequencialmente origina monoblastos, promonócitos e monócitos, que após saírem da medula óssea se distribuem, através da circulação sanguínea, para diversos tecidos e diferenciam-se em macrófagos específicos em função do tecido migrado (BURKE; LEWIS, 2002; GORDON; TAYLOR, 2005; TAYLOR *et al.*, 2005; TACKE; RANDOLPH, 2006).

Numerosos compostos de natureza diversa agem como Modificadores da Resposta Biológica (MRB), como proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos e lipídios (HAMILTON; ANDERSON, 2004; SCHILLER *et al.*, 2006, STAHEL; SMITH; MOORE, 2007). Dentre esses compostos destacam-se os polissacarídeos, que podem ser isolados de algas (PUGH *et al.*, 2001; PONCE *et al.*, 2003; COSTA *et al.*, 2010), bactérias (TZIANABOS; WANG; KASPER, 2003); fungos (LEE *et al.*, 2004; HSU *et al.*, 2004) e plantas (ANDO *et al.*, 2002; HAN *et al.*, 2003; SHAO *et al.*, 2004; SCHEPETKIN *et al.*, 2005).

É pela capacidade em biomodular a resposta de células do sistema imune que advém grande parte das propriedades terapêuticas dos polissacarídeos (LEUNG *et al.*, 2006; SCHEPETKIN; QUINN, 2006). Polissacarídeos e outras classes de moléculas MRB, que exercem efeitos sobre células do sistema imunológico, em especial macrófagos, são também classificados como imunomoduladores (TZIANABOS, 2000; LEUNG *et al.*, 2006; SCHEPETKIN; QUINN, 2006; ROSÁRIO *et al.*, 2008, 2011).

Sugere-se que a interação polissacarídeo e macrófago está relacionada às características estruturais de cada polímero, podendo ou não levar a uma resposta biológica. Esses polímeros são capazes de orientar esta resposta associando-se diretamente à membrana plasmática ou a receptores específicos na superfície dessas células. Essa interação irá desencadear a ativação de vias de sinalização intracelulares, as quais resultam na ativação ou repressão da transcrição de diferentes genes (SCHEPETKIN; QUINN, 2006).

No presente estudo, seis estruturas polissacarídicas devidamente caracterizadas por nosso grupo de pesquisa foram testadas quanto à sua capacidade de imunomodulação em modelo celular, utilizando-se linhagem de macrófagos THP-1, de leucemia mielóide humana, já amplamente usada para investigar os efeitos potenciais de compostos em monócitos e macrófagos.

Entre as muitas alterações encontradas em macrófagos após responderem a estímulos de ativação, pelas mais variadas fontes, encontram-se estímulo da atividade fagocítica, produção de intermediários reativos de oxigênio e citocinas, respostas que, por terem sido avaliadas neste trabalho, serão abordados a seguir.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O SISTEMA IMUNE

A função do sistema imunológico é defender o organismo não só de patógenos, mas também de substâncias não infecciosas (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008). Para defender o

organismo de forma eficaz, o sistema imunológico deve atender a quatro principais aspectos. O primeiro é o reconhecimento imunológico, no qual a infecção deve ser identificada. Este trabalho é feito pelas células brancas presentes no sangue que proporcionarão uma resposta imediata.

O segundo aspecto é controlar e eliminar a infecção, tarefa realizada pelo sistema complemento, anticorpos e por células com capacidade destrutiva, tais como linfócitos e macrófagos. No entanto, esta resposta deve ser controlada, o que preenche o terceiro aspecto. O sistema imunológico deve ter a capacidade de controlar a sua resposta, evitando maiores danos ao organismo como alergias e doenças autoimunes. O quarto aspecto é proteger o indivíduo de uma reincidência de uma doença causada pelo mesmo patógeno, produzindo uma memória imunológica (MURPHY, TRAVERS e WALPORT, 2010).

2.2. MACRÓFAGOS

Macrófagos são células que pertencem ao sistema de fagócitos mononucleares e apresentam ampla distribuição nos tecidos do organismo (BURKE; LEWIS, 2002; GORDON; TAYLOR, 2005). São células derivadas da medula óssea a partir de células progenitoras mielóides (unidades formadoras de colônias de granulócitos-macrófagos). A célula progenitora dá origem, sequencialmente, a monoblastos, promonócitos e monócitos, os quais saem da medula e direcionam-se, através da circulação, para diferentes tecidos diferenciando-se em macrófago tecido-específicos (BURKE; LEWIS, 2002; GORDON; TAYLOR, 2005; TAYLOR *et al.*, 2005; TACKE; RANDOLPH, 2006). É uma importante célula do sistema imunológico que participa ativamente na imunidade inata e condiciona a adaptativa, através da fagocitose de partículas estranhas ao hospedeiro, de sua função apresentação de antígenos e ação microbicida (Elomaa *et al.*, 1998) e também pela capacidade de secretar mediadores que interferem na função imunológica (de la Torre *et al.*, 2008).

Os macrófagos são células com função crucial na resposta imune inata, mas também possuem grande papel na imunidade adquirida. Na resposta inata, estas células desempenham a fagocitose de partículas, como microrganismos, macromoléculas e, também de tecidos mortos ou danificados, como eritrócitos senescentes. Uma vez fagocitadas, estas partículas são degradadas nos lisossomos devido à ação de diversas enzimas lisossomais.

Desempenham a função de citotoxicidade, por meio da liberação de enzimas, espécies reativas de oxigênio, espécies reativas de nitrogênio e outros mediadores, como as

prostaglandinas, os quais atuam na eliminação de microrganismos invasores e controle da infecção, podendo até mesmo danificar tecidos normais do organismo.

Outra função de macrófagos na imunidade inata é a capacidade de secretar citocinas, as quais recrutam outras células inflamatórias (principalmente neutrófilos), amplificando a resposta frente ao componente invasor. Induzem também o reparo de tecidos danificados (como o endotélio e fibroblastos) através da liberação de fatores de crescimento (ABBAS, 2000; GOLDSBY *et al.*, 2000).

A participação dos macrófagos na resposta imune adquirida envolve a interação com outros componentes do sistema imune, como linfócitos T e anticorpos. A interação entre macrófagos e linfócitos representa um importante mecanismo de amplificação da resposta imune adaptativa. Possuem função como células apresentadoras de antígenos (APCs – *Antigen-Presenting Cells*), expressando em sua superfície antígenos, os quais são reconhecidos por células T. A ação dos macrófagos também é aumentada por citocinas (liberadas por células T *helper*) e também por anticorpos. Estes anticorpos ao se ligarem aos componentes invasores (opsonização) facilitam o reconhecimento e fagocitose destes componentes pelos macrófagos (ABBAS, 2000).

A ativação dos macrófagos ocorre de duas maneiras. A primeira envolve o contato direto dos antígenos com os macrófagos, ativando-os. Esses macrófagos ativados atuam não só como células apresentadoras de antígenos, como também são responsáveis pela secreção de citocinas como o fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e a interleucina 1-beta (IL1 β) responsáveis pelo recrutamento de células T efectoras. Estas citocinas induzem células epiteliais a expressarem selectinas e integrinas as quais se ligam a receptores das células T efectoras possibilitando a sua entrada no tecido atingido. As células T efectoras produzem o interferon γ (IFN γ) que é a principal citocina ativadora de macrófagos gerando a destruição do antígeno (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008; MURPHY, TRAVERS e WALPORT, 2010).

A segunda forma de ativação dos macrófagos é via sinalização das células T efectoras, processo denominado de inflamação. Esta via se inicia com o recrutamento de monócitos sanguíneos para o tecido por meio de sinais enviados pelas células T efectoras que entraram em contato com os antígenos. As células T, quando em contato com os antígenos, secretam citocinas, principalmente o IFN γ , e expressam em suas membranas CD40L. A interação física deste ligante receptor com o receptor CD40 presente na membrana dos macrófagos faz com que eles se diferenciem em macrófagos ativados, desencadeando uma via de transdução de sinal semelhante à via ativada por TNF. Macrófagos também são capazes de secretar fatores de crescimento para

fibroblastos e células endoteliais que participam da moldagem dos tecidos após a infecção e lesão (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008; MURPHY, TRAVERS e WALPORT, 2010).

Diversas funções exercidas por macrófagos podem ser aumentadas ou prolongadas para modular a resposta imune do hospedeiro contra infecções e inúmeras outras patologias. Dessas funções destacam-se a fagocitose, ativação do “*burst*” oxidativo, produção de espécies reativas de nitrogênio e a secreção de um grande espectro de citocinas (LEUNG *et al.*, 2004; ROSÁRIO *et al.*, 2008, 2011).Essas funções citadas serão descritas abaixo.

2.2.1. Capacidade fagocítica

A principal linha de defesa do organismo contra partículas estranhas é representada pela capacidade fagocítica das células designadas como fagócitos e dentre eles, encontram-se os macrófagos. (BURKE; LEWIS, 2002). O início se dá pelo reconhecimento de ligantes da partícula estranha por receptores específicos da superfície dessas células, denominados de Receptores de Reconhecimento de Padrões –RRP(JANEWAY, 1992).

Existem receptores para reconhecimento de microrganismos, componentes da matriz extracelular, diversas proteínas de transporte, hormônios e citocinas, dentre outros mais, que conferem a capacidade de reconhecer e responder a uma grande variedade de estímulos (Ezekowitz e Gordon, 2006; Geissmann *et al.*, 2010).

Os macrófagos expressam uma ampla gama de RRP que medeiam interações do tipo receptor-ligante com antígenos microbianos (Appelberg, 2005; Taylor *et al.*, 2005). Destes, muitos pertencem à família de recetores "Toll-like" (TLR).

Os receptores TLR representam uma grande família de receptores trans-membranares, apresentando cerca de onze membros, distribuídos diferencialmente pela célula e envolvidos na imunidade inata (Taylor *et al.*, 2005). São responsáveis pelo reconhecimento de agentes microbianos patogênicos e transdução de sinais moleculares. Este reconhecimento via TLR promove a iniciação de vias de transdução de sinal, que podem estar envolvidas no desenvolvimento da imunidade adquirida e resposta inflamatória (Takeda e Akira, 2005).

Na Figura 1 observamos os diferentes tipos de TLR e seus principais ligantes e ainda, a localização desses receptores nos macrófagos, sendo TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6 expressos na superfície da célula. Em contraste, os receptores TLR3, TLR7e TLR9 são expressos em compartimentos intracelulares, tais como endossomas.

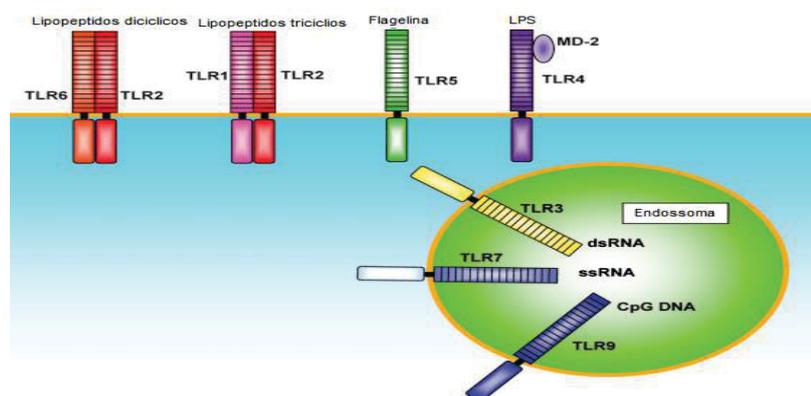


FIGURA 1. OS DIFERENTES MEMBROS DA FAMÍLIA DE RECEPTORES TOLL-LIKE. FIGURA ADAPTADA DE TAKEDA E AKIRA, (2005).

A fagocitose é um processo que ocorre seguindo uma série de etapas. Esta é iniciada por um processo não dependente de energia, quando se dá a ligação de uma determinada partícula à membrana da célula fagocítica. Após esta ligação pode-se dar ou não a transmissão de um sinal que leva (ou não) a posterior ingestão da partícula que se adere ao fagócito. Os antígenos microbianos são reconhecidos por RRP, como os TLR, e uma ampla gama de receptores não-opsônicos.

Quando se dá a ingestão resultante da interação entre receptores e a superfície da partícula, ocorre a emissão de pseudópodes (extensões provenientes do citoplasma, constituídos por filamentos de actina e miosina) que envolvem a partícula, resultando na fusão que origina um vacúolo fagocítico, no interior da célula. O vacúolo fagocítico (fagossoma) passa por um processo de maturação até, num estado final, fundir com lisossomas, onde as enzimas hidrolíticas, ROS e RNI contribuem para a degradação microbiana (Appelberg, 2005; Pacheco e Cardoso, 2012). A Figura 2 exemplifica de maneira simples esse processo.

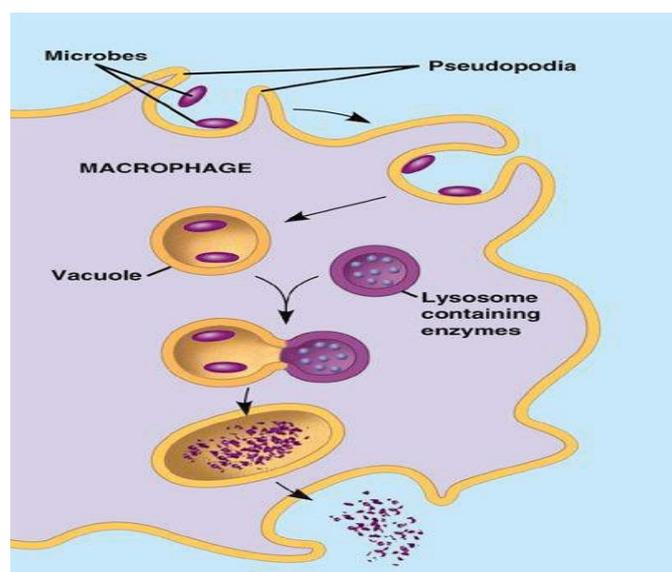


FIGURA 2. ESQUEMA REPRESENTATIVO DA FAGOCITOSE.

FONTE: <http://bio1152.nicerweb.com/Locked/media/ch43/phagocytosis.html>

NOTA: Depois de internalizado, os microorganismos ficam isolados dentro de vesículas que se fundem com lisossomos, formando o fagolisossomo. É neste local onde ocorre a digestão dos microorganismos.

2.2.2. Ativação do “burst” oxidativo

O rápido aumento do consumo de oxigênio e sua redução a ânion superóxido e, posteriormente, a outras espécies reativas de oxigênio é um processo de proteção celular definido como “burst” oxidativo ou respiratório. Nos macrófagos esse processo é catalisado por um complexo multienzimático denominado de forma geral como NADPH oxidase (TSE; MILTON; FIGANEILI, 2004; VIGNAIS, 2002; CROSS; SEGAL, 2004).

A NADPH oxida e reduz o oxigênio molecular a ânion superóxido (Figura 3). Na sequência, a enzima superóxido dismutase (SOD) converte este ânion em peróxido de hidrogênio e a mieloperoxidase (MPO) converte o peróxido de hidrogênio a ácido hipocloroso. Estes últimos são considerados mais agressivos que o ânion superóxido na ação bactericida (ROOS; WINTERBOURN, 2002; VIGNAIS, 2002; HALLIWELL, 2006).

O burst oxidativo é uma característica de neutrófilos, eosinófilos, monócitos e macrófagos que recebem genericamente a denominação de fagócitos devido a sua habilidade em englobar

material particulado. O *burst* foi descrito nos anos 30 como um aumento do consumo de oxigênio, sendo que este aumento era considerado como uma fonte de energia para fagocitose. O papel do *burst* como fonte de ERO foi reconhecido mais tarde e este processo é que confere a capacidade de “killing” a neutrófilos (Babior, 1978).

Acompanhar o *burst* pode oferecer dados importantes relativos à produção das espécies microbicidas. O comprometimento de alguns passos que levam à produção de O_2 ou à degranulação, pode levar à diminuição da eficiência microbicida de células fagocíticas.

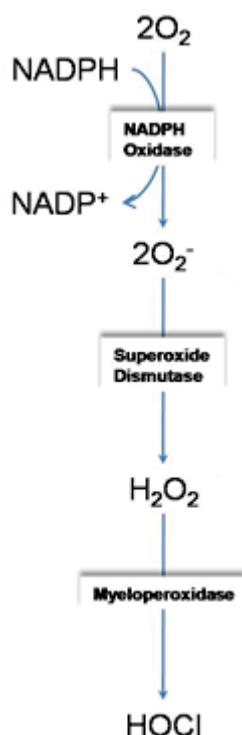


FIGURA 3 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DO *BURST* RESPIRATÓRIO.

FONTE: adaptado de <http://www.ihtc.org/medical-professionals/blood-disorders/other-hematological-disorders/white-blood-cell-disorders/>

NOTA: As enzimas NADPH oxidase, superóxido dismutase e mieloperoxidase são as responsáveis pela formação dos ERO no interior dos fagolisossomos.

Sabe-se que alguns agentes capazes de induzir a produção de espécies reativas de oxigênio em macrófagos são $IFN-\gamma$, LPS, muramil dipeptídeo e também os ésteres de forbol (PMA) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; SCHEPETKIN; QUINN, 2006).

Estudo realizado por Reeves e colaboradores (2002) sugere que a ativação do complexo NADPH oxidase está diretamente relacionada à execução da atividade microbicida através da despolarização da membrana fagossomal. A despolarização gera produção de ânion superóxido,

mediando fluxos de íons como H⁺ e K⁺ para essa região, o que culmina na ativação de proteases da matriz levando a digestão e morte de microrganismos (REEVES *et al.*, 2002).

2.2.3. Capacidade secretória de citocinas IL-10e IL-1 β

Citocinas são proteínas ou glicoproteínas solúveis de baixo peso molecular e possuem muitas funções e agem numa gama de estados fisiopatológicos como infecção, inflamação, malignidade e trauma (BELARDELLI; FERRANTINI, 2002). São secretadas por macrófagos ativados sendo dotadas de diversas funções como por exemplo, sinalização de moléculas efetoras (BURKE; LEWIS, 2002).

Podem ser divididas, dentre outras maneiras, em fatores de necrose tumoral (TNF), interleucinas (IL), fatores de transformação de crescimento (TGF), fatores estimuladores de colônia (CSF) e ainda de maneira geral em anti e pró-inflamatórias (BURKE; LEWIS, 2002).

Dentre as muitas citocinas produzidas por macrófagos destacamos neste estudo a IL-10 e IL-1 β , as quais apresentam funções centrais na ligação de resposta imune inata e adquirida e, ainda, exibem uma ampla variedade de efeitos sobre diferentes tipos de células (BELARDELLI; FERRANTINI, 2002; BURKE; LEWIS, 2002; COMMINS; BORISH; STEINKE, 2010).

2.2.3.1. Interleucina-10

A IL10 é uma citocina anti-inflamatória, atua em diversas etapas da resposta inflamatória, como por exemplo, inibindo a expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade classe II (MHCII) e receptores de TNF na superfície celular e promovendo a degradação de RNAs mensageiros para citocinas pró-inflamatórias (OPAL & DePALO, 2000). Além disso, é descrito que a IL10 atenua os efeitos inflamatórios causados pelo LPS (WANIDWORANUN & STROBER, 1993), provavelmente diminuindo o reconhecimento frente ao LPS (OPAL & DePALO, 2000).IL-10 é produzida por uma grande gama de tipos celulares, entre os quais destacam-se células dendríticas, eosinófilos, linfócitos B, linfócitos T citotóxicos, linfócitos T regulatórios, mastócitos, macrófagos, neutrófilos e células NK (OUYANG *et al.*, 2011). Os mecanismos de estímulo de produção de IL-10 em macrófagos são mediados por agonistas de TLRs, DC-SIGN e dectin-1, e entre as moléculas agonistas se destaca a molécula de LPS (OUYANG *et al.*, 2011).

Além de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, a IL10 também é capaz de induzir a secreção de interleucinas anti-inflamatórias, desenvolvendo o papel de reguladora das respostas TH1/TH2. Com base na sua função imunorreguladora, IL-10 e os seus receptores são estudados para intervenção terapêutica de doenças auto-imunes, inflamatórias agudas e crônicas, câncer, psoríase e alergias (COUPER *et al.*, 2008; KHAN, 2008; SABAT *et al.*, 2010).

Em macrófagos, a IL-10 atua também por mecanismo autócrino e influencia algumas funções importantes nestas células como a supressão da produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, CXCL8, IL-12 e TNF- α); inibição da expressão de MHC de classe II; estimulação da fagocitose através do aumento da expressão de receptores IgG-Fc e CD14. (COMMINS; BORISH; STEINKE, 2010; SABAT *et al.*, 2010).

2.2.3.2. Interleucina-1 β

A IL1- β é uma citocina pró-inflamatória e liberada principalmente por monócitos e macrófagos, sendo que sua atividade está relacionada aos aumentos de prostaglandinas e leucotrienos (DINARELLO, 2000). A ação de IL1 é muito semelhante ao TNF- α geralmente atuando de forma sinérgica com amplificação do processo inflamatório. Esta citocina é encontrada como duas formas denominadas IL1- α e IL1- β , as quais são codificadas por genes distintos e são estruturalmente diferentes (30% de semelhança), embora a função seja essencialmente idêntica (ligação aos mesmos receptores de membrana) (ABBAS, 2000).

Esta citocina desempenha suas funções tanto na imunidade inata como na adaptativa e é um importante mediador da resposta inflamatória, uma vez que induz a fagocitose em células mononucleares, como por exemplo, os macrófagos (KHAN, 2008). Quando em grandes quantidades, esta interleucina pode gerar febre em resposta à infecção por bactérias e vírus, redução do apetite e indução da proteólise muscular. A IL1 β pode gerar danos no tecido pancreático por destruir as células beta, gerando diabetes melitus do tipo I. Além destas ações, a IL1 também promove a proliferação de fibroblastos, induzindo a cura de feridas (KHAN, 2008). A IL1 também age de maneira conjunta com o TNF α gerando respostas rápidas e aprimorando a defesa do organismo (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008).

Tem sido demonstrado uma diversidade de agentes interferentes nas atividades funcionais dos macrófagos, com destaque para moléculas como polissacarídeos, os quais têm sido alvo de grande interesse na aplicação terapêutica (SASAKI *et al.*, 2001; NOLETO *et al.*, 2002; JUNG *et al.*, 2004; COSTA *et al.*, 2010; KANGUSSU MARCOLINO, 2010; AMARAL, 2011).

2.3. POLISSACARÍDEOS DE PLANTAS

Os polissacarídeos estão presentes nas paredes que envolvem as células de plantas em crescimento, as assim chamadas paredes celulares (MCNEIL *et al.*, 1984).

A composição da parede celular primária das dicotiledôneas, de fundamental importância no processo de expansão celular é, tipicamente, 25-40% celulose, 15-25% hemicelulose, 15-40% material péctico e 5-10% proteínas e proporções muito pequenas de compostos fenólicos (Figura 4). Já a parede celular secundária, que se encontra entre a primária e a membrana plasmática da célula, e confere rigidez aos tecidos vegetais, é muito mais espessa que a parede primária e consiste de 40-45% de celulose, 15-35% de hemiceluloses, 15-30% de lignina e traços de pectina (DEY, BROWNLEADER e HARBORNE, 1997).

A conversão da parede primária em secundária ocorre após o processo de lignificação, onde o crescimento celular é interrompido, ocorre a conversão da parede primária em secundária indicando, portanto, o amadurecimento celular e a diferenciação terminal da célula (ALBERSHEIM *et al.*, 1996).

Sabe-se através das primeiras análises químicas de isolados de parede celular que esta é heterogênea e provavelmente maior que a relatada, devido à dificuldade de extração desses polissacarídeos (BURTON, GIDLEY e FINCHER, 2010). Consequentemente, a extração, a caracterização da estrutura química e da conformação das cadeias dos polissacarídeos não é uma tarefa fácil, mas são importantes para o entendimento de suas atividades biológicas (YANG e ZHANG, 2009).

A estrutura química dos polissacarídeos pécticos e hemicelulósicos estudados neste trabalho será abordada a seguir.

2.3.1. Pectinas

Pectinas constituem os polissacarídeos mais complexos estruturalmente da parede celular de plantas (YAGO, 2011). Apresentam perfil polidisperso ou heterogeneo, com três principais moléculas compondo a estrutura principal: as homogalacturonanas (HG), ramnogalacturonanas tipo I (RG-I) e tipo II (RG-II) (Figura 5). Esses polímeros exibem significativa heterogeneidade com relação à massa molecular e composição química (PEREZ; MAZEAU; du PENHOAT, 2000; WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006; MOHNEN, 2008).

As pectinas podem ser compostas por até 17 diferentes monossacarídeos, dos quais o ácido D-galacturônico (D-GalA) é o mais abundante, seguido por D-galactose e L-arabinose (YAPO, 2011).

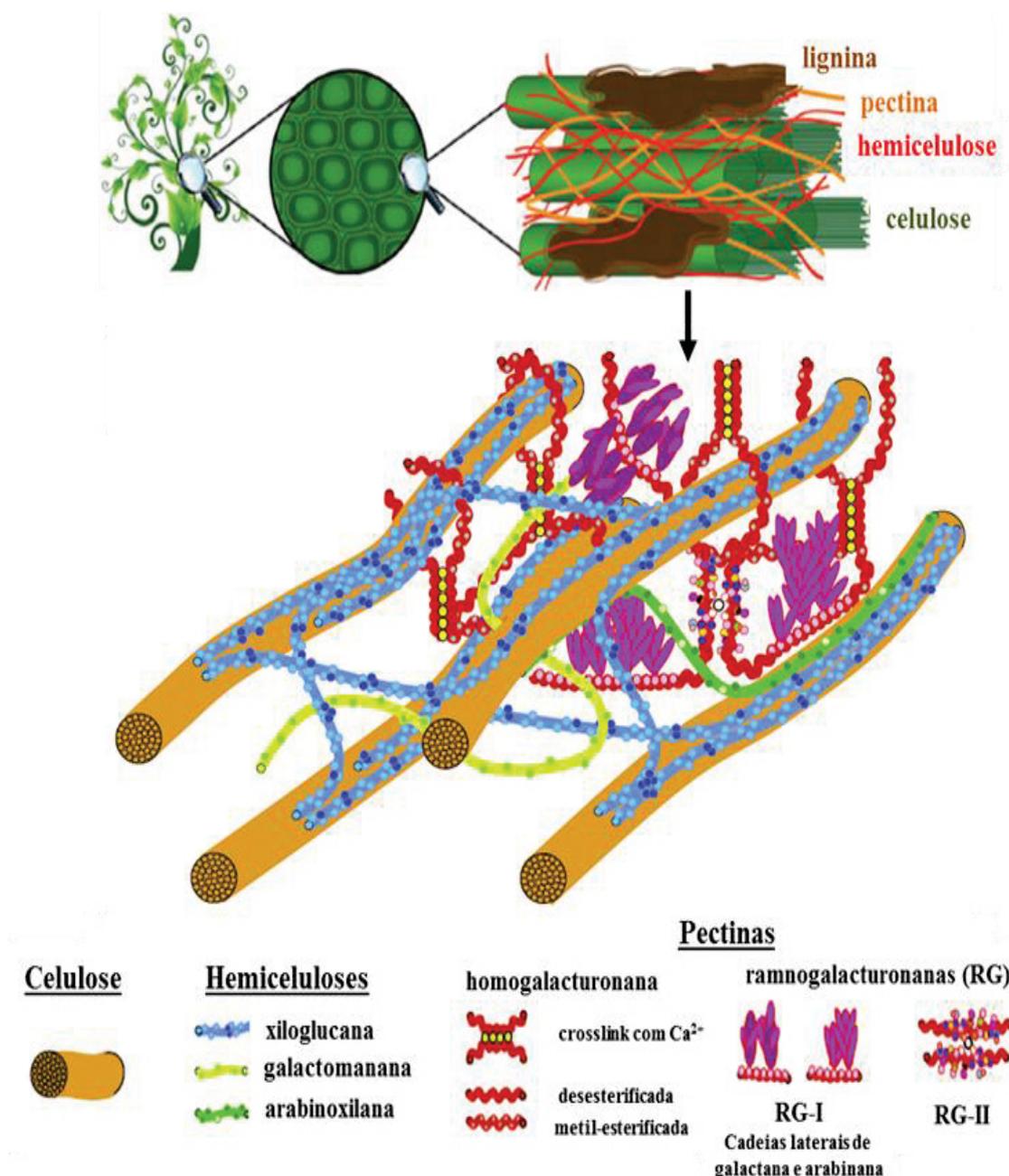


FIGURA 4. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DA PAREDE CELULAR PRIMÁRIA VEGETAL DE DICOTILEDÔNEAS. NOTA: A CELULOSE É ORGANIZADA EM MICROFIBRILAS, ENQUANTO AS HEMICELULOSES E PECTINAS RETICULAM AS MICROFIBRILAS DE CELULOSE.

FONTE: ADAPTADO DE TURUMTAY (2015) E LOQUÉ *ET AL.* (2015)

O polímero linear, denominado HG (Figura 5), é constituído de unidades de ácido D-galacturônico unidas por ligações glicosídicas do tipo α -(1→4). A cadeia principal pode estar esterificada com grupos metil em C-6 e *O*-acetilados em *O*-2 ou *O*-3 (RIDLEY; O'NEILL; MOHNEM, 2001).

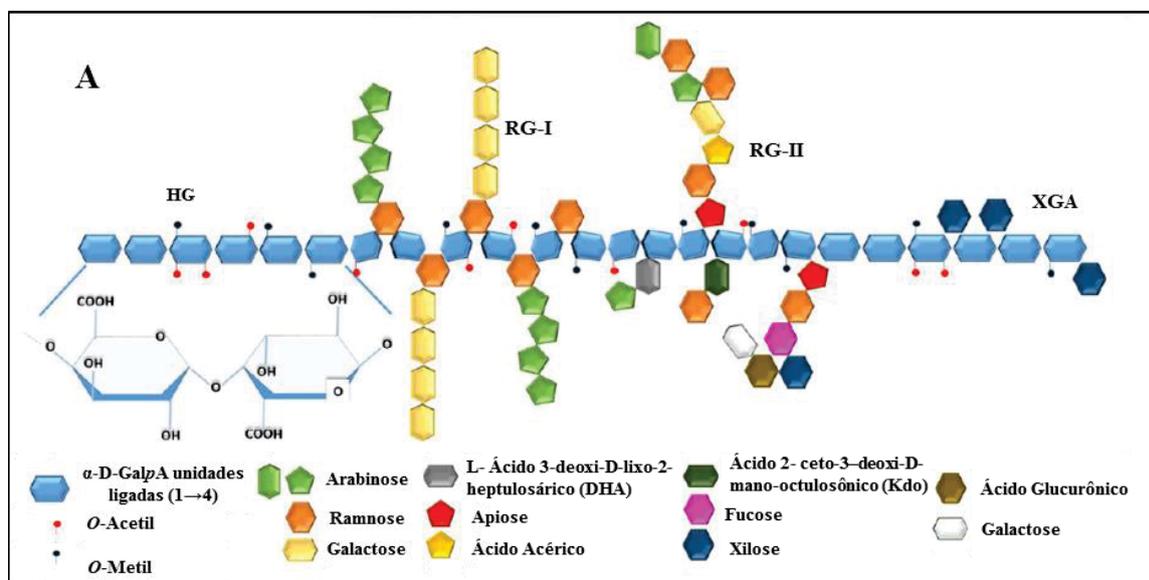


FIGURA 5 - MODELO ESQUEMÁTICO DA ESTRUTURA DE PECTINAS.

FONTE: Adaptado de ALBUQUERQUE (2016).

O polímero RG-I (Figura 5) consiste de uma cadeia principal constituída de unidades de ácido D-galacturônico ligados α -(1→4) alternando com unidades de ramnose ligadas α -(1→2), as quais podem estar parcialmente substituídas em *O*-3 ou *O*-4. As substituições podem ser por açúcares simples ou por cadeias laterais poliméricas como L-arabinanas ligadas α -(1→5), D-galactanas ligadas β -(1→4), arabinogalactanas tipo I (AG-I) e tipo II (AG-II) e possivelmente galacto-arabinanas. As RG-I podem estar também acetil-esterificadas em *O*-2 e/ ou *O*-3 (YAPO, 2011).

O polímero RG-II (Figura 5) possui a cadeia linear constituída por unidades de α -D-GalpA (1→4) ligadas e com cerca de 11-12 diferentes tipos de unidades glicosil interligados por mais de 20 diferentes ligações glicosídicas, o que resulta em macromoléculas altamente complexas. As cadeias principais de RG-II podem, ainda, estar metil-esterificadas em C-6 (YAPO, 2011).

A proporção de grupos carboxílicos metilesterificados nas pectinas é expressa como grau de esterificação (DE). As pectinas de alta metoxilação (HM – *High methoxylpectin*) apresentam

50% ou mais dos seus grupos carboxílicos esterificados, enquanto que as de baixa metoxilação (LM – *Low methoxyl pectin*) possuem menos de 50% destes grupos esterificados (ROLIN, 1993).

As arabinogalactanas (AG) compõem, em parte, as cadeias laterais das RG-I, no entanto, podem existir independentemente das pectinas na parede celular, sendo assim, podem ser considerados polissacarídeos pécticos ou hemicelulósicos. As arabinogalactanas de plantas superiores foram classificadas por Aspinall (1973) em dois grandes grupos ao constatar diferenças nas ligações químicas envolvidas na formação da cadeia principal destas macromoléculas. As que apresentavam cadeia principal de (1→4) β-D-galactanas foram denominadas arabinogalactanas tipo I (AG-I), enquanto as que tinham cadeia principal formada por (1→3) e (1→6) β-D-galactanas foram classificadas como arabinogalactanas tipo II (AG-II).

Arabinogalactanas tipo I, também chamadas de pécticas, são compostas por cadeias de (1→4) β-D-galactanas e são encontradas geralmente associadas às RG-I. Elas apresentam, na maioria das vezes, unidades de arabinose ligadas no *O*-3 das galactoses (CARPITA e GIBEAUT, 1993). Já as AG-II constituem um amplo grupo de cadeias curtas de (1→3) e (1→6) β-D-galactanas conectadas umas às outras por pontos de ramificação em *O*-3 e *O*-6 e apresentam a maior parte das posições *O*-3 e *O*-6 restantes ocupadas por unidades de arabinose (CARPITA e GIBEAUT, 1993).

Arabinogalactanas tipo II são aparentemente mais distribuídas nos tecidos das plantas em comparação com as AG-I (CLARKE, ANDERSON e STONE, 1979). Apesar de apresentarem uma estrutura geral semelhante, a estrutura fina das AG-II varia muito de espécie para espécie (CARPITA e GIBEAUT, 1993; ALBERSHEIM *et al.*, 1996). A composição monossacarídica geralmente apresenta variações, podendo o conteúdo de arabinose atingir até 80%. Também podem ser observados monossacarídeos ácidos, como o ácido glucurônico, ácido 4-*O*-metilglucurônico e ácido galacturônico (STEPHEN, 1983).

As AG-II estão presentes na parede celular vegetal, ramificando ou não as RG (STEPHEN, 1983). Elas podem também, estar ligadas a proteínas, constituindo uma classe de proteoglicanas denominadas arabinogalactanas-proteínas (AGP) (FINCHER, STONE e CLARKE, 1983; VARNER e LIN, 1989).

2.3.2. Hemiceluloses

As hemiceluloses compreendem um grupo heterogêneo de polímeros que apresentam uma cadeia principal composta por unidades de glucose (D-Glcp), manose (D-Manp) ou xilose (D-Xylp) β-(1→4)-ligada (Ochoa-Villarreal *et al.* 2012). A classificação das hemiceluloses é feita de acordo com o monossacarídeo majoritário presente na cadeia principal. Dessa forma, os principais tipos de polissacarídeos encontrados nesse grupo incluem as xilanas (homoxilanas, heteroxilanas

neutras e ácidas), glucomananas, mananas, galactomananas, glucuronomananas, xiloglucanas, calose (β -glucanas com ligações 1 \rightarrow 3), β -glucanas (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4) ligadas e arabinogalactanas tipo II (Figura 6) (ASPINALL, 1980). Este último tipo de polissacarídeo também pode estar presente em frações pécticas, associado a moléculas de RG-I (CARPITA e GIBEAUT, 1993).

As hemiceluloses estão presentes no meio extracelular, conectadas, através de interações moleculares, com as microfibrilas de celulose, formando a matriz da parede celular. Entretanto, esses polímeros, ainda podem atuar como moléculas sinalizadoras ou como precursores delas, sendo possível, também, agir na forma de substâncias de reserva (Scheller & Ulvskov, 2010).

As xilanas são os biopolímeros mais abundantes, depois da celulose, sintetizados pelas plantas (JOSELEAU, COMTAT e RUEL, 1992) e são os principais polissacarídeos não celulósicos das paredes celulares de angiospermas, gramíneas e cereais (STEPHEN, 1983).

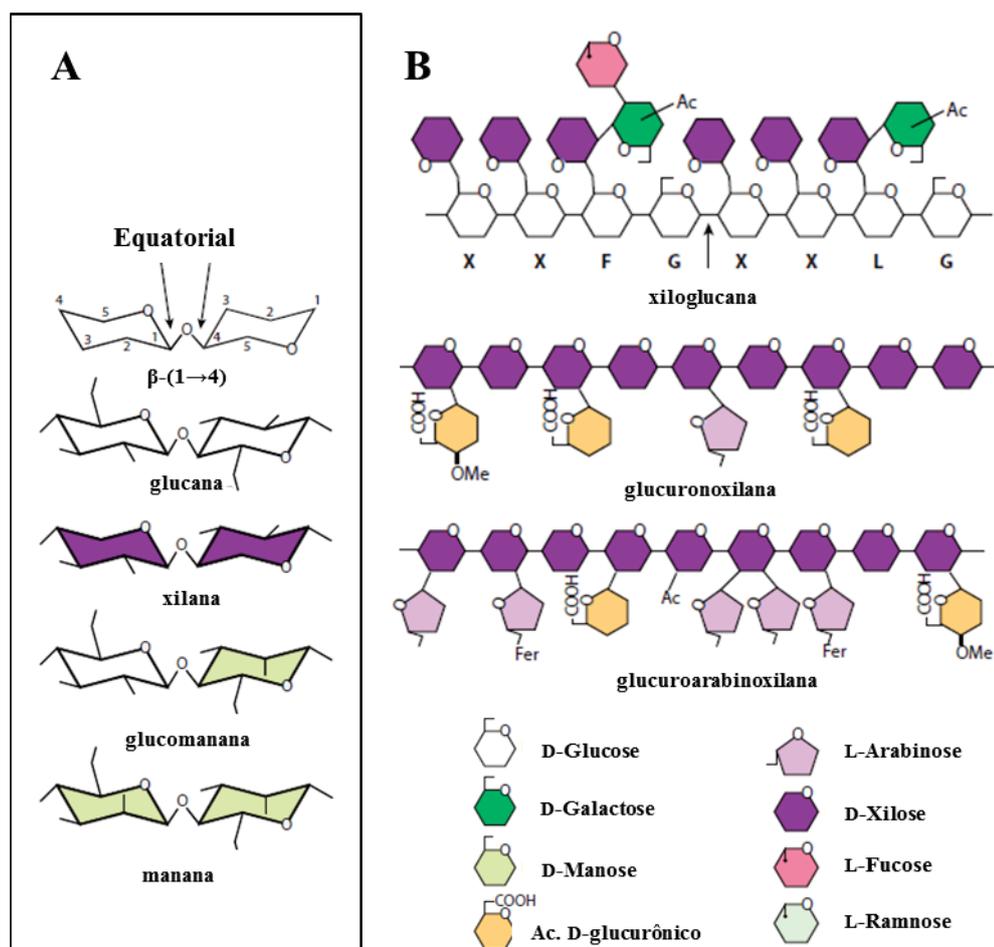


FIGURA 6 - POLISSACARÍDEOS HEMICELULÓSICOS DE PLANTAS. (A) HEMICELULOSES SÃO CARACTERIZADAS PELA LIGAÇÃO β -(1 \rightarrow 4) EM

CONFIGURAÇÃO EQUATORIAL NO C-1 E C-4. (B) REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL DE XILOGLUCANA E HETEROXILANAS.

FONTE: Adaptado de SCHELLER e ULVSKOV (2010)

As xilanas apresentam grande variedade estrutural, mas normalmente apresentam uma cadeia principal formada por unidades de β -D-Xylp(1 \rightarrow 4) ligadas, substituídas em O-2 e/ou O-3 por diferentes grupos ou cadeias laterais. Essas cadeias laterais consistem principalmente de ácido α -D-glucurônico, ácido 4-O-metil- α -glucurônico e ocasionalmente unidades de alguns açúcares neutros (α -L-Araf, α -D-Xylp ou α -D-Galp).

Entre os grupos laterais mais comuns estão os grupos acetil, os ácidos fenólicos e os ácidos ferúlico e cumárico (EBRINGEROVÁ e HROMÁDKOVÁ, 1999). A presença de grupos acetil em xilanas pode não ser determinada quando elas são extraídas com álcali, o qual remove estes grupamentos (VIERHUIS *et al.*, 2001).

Heteroxilanas neutras ou arabinoxilanas foram extensivamente estudadas na parede celular de endosperma de cereais. Elas contêm somente unidades de L-Araf, geralmente (1 \rightarrow 3) ligadas, ou (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 2) ligadas nas unidades de xiloses em arabinoxilanas mais substituídas ou com maiores extensões de cadeias laterais de L-Araf ligadas a outros substituintes (MCNEIL *et al.*, 1984). O grau de substituição da cadeia principal por unidades de Araf determina o nível de solubilidade da xilana e a habilidade de se ligar à celulose (IZYDORCZYK, MACRI e MACGREGOR, 1998; HAN, 2000).

2.4. POLISSACARÍDEOS MODIFICADORES DA RESPOSTA BIOLÓGICA

Podem ser representados tanto pelos que constituem a reserva de energia no citoplasma ou por polissacarídeos estruturais presentes na membrana ou parede celular dos organismos (LEUNG *et al.*, 2006). Muitos trabalhos descrevem e correlacionam os parâmetros estruturais de polissacarídeos, tais como, por exemplo, grau de ramificação, tipo da ligação glicosídica, massa molecular e presença de grupos substituintes com atividade biológica (BLEICHER; MACKIN; BETAFECTIN, 1995; POUTSIAKA *et al.*, 1993; LEUNG *et al.*, 2004; SCHEPETKIN *et al.*, 2005).

Na capacidade dessas moléculas em biomodular a resposta de células do sistema imune está a grande parte das propriedades terapêuticas dos polissacarídeos (LEUNG *et al.*, 2006; SCHEPETKIN; QUINN, 2006). Polissacarídeos e tantas outras moléculas MRB, que exercem efeitos sobre células do sistema imunológico, especialmente em macrófagos, são também

classificados como imunomoduladores (TZIANABOS, 2000; LEUNG *et al.*, 2006; SCHEPETKIN; QUINN, 2006; ROSÁRIO *et al.*, 2008, 2011).

A Figura 7 demonstra como esses polímeros podem biomodular a resposta das células do sistema imune através da associação direta à membrana plasmática ou interagindo com receptores específicos na superfície dessas células. Esta ação desencadeará a ativação de vias de sinalização intracelulares, as quais, resultarão ou não, na ativação ou repressão da transcrição de diferentes genes (SCHEPETKIN; QUINN, 2006). Como vemos na figura, há o reconhecimento de ligantes através da membrana plasmática ou receptores (receptor para complemento 3, receptor “scavenger”, receptor de manose, dectina-1; e receptores “toll-like”) podendo desencadear ativação, fosforilação ou desfosforilação de enzimas em cascata, as quais resultam na ativação ou repressão da transcrição de diferentes genes.

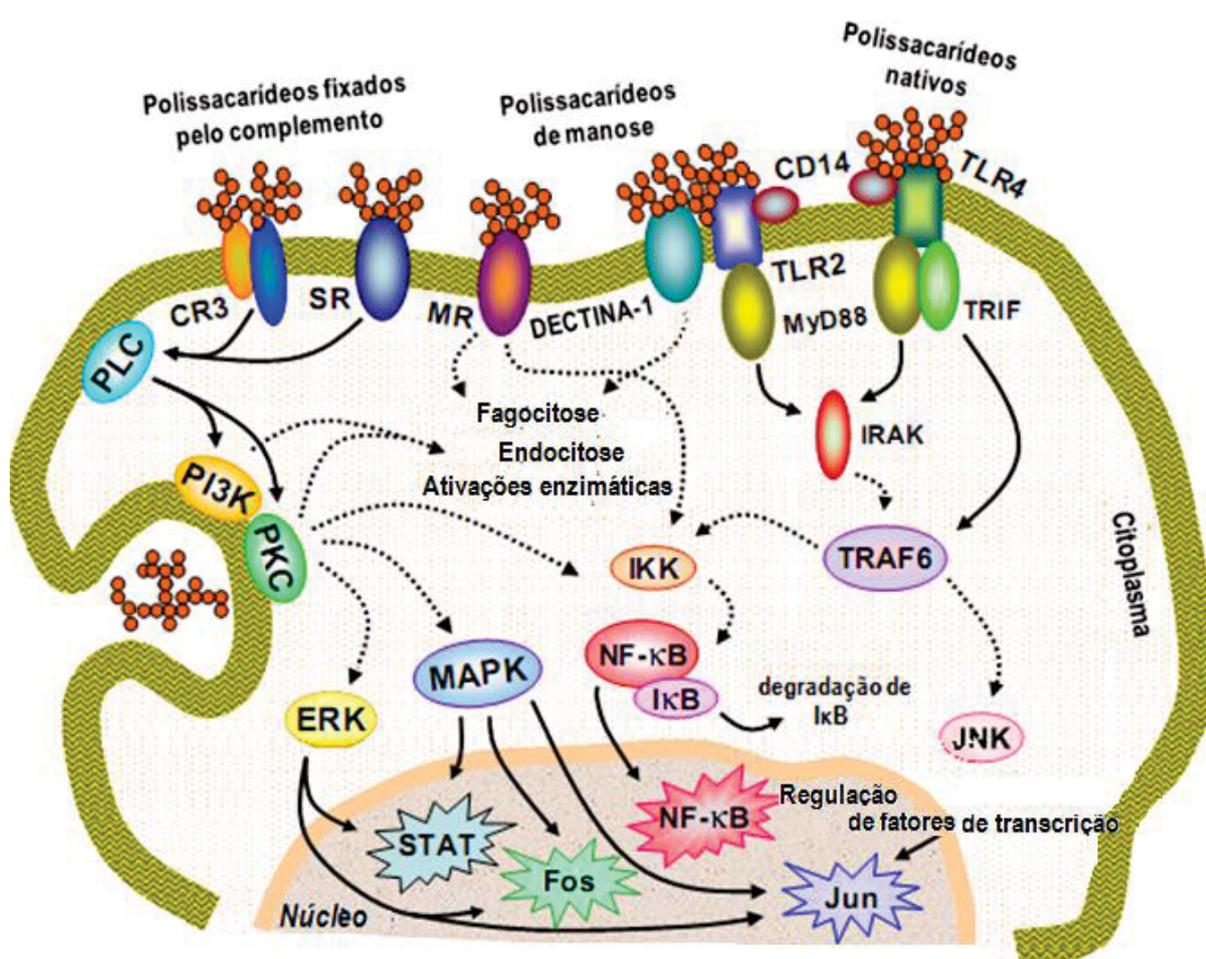


FIGURA 7. MECANISMOS DE RECONHECIMENTO DE POLISSACARÍDEOS POR MACRÓFAGOS.

FONTE: adaptada (SCHEPETKIN; QUINN, 2006)

Para algumas classes de polissacarídeos MRB uma correlação entre a atividade biológica e a estrutura de polímeros com a atividade biológica têm sido descrita em estudos. É sabido que polissacarídeos extraídos de *Panaxginseng*, *Echinacea purpúrea*, *Glycine max*, *Juniperusscopolorum*, entre outros, são capazes de se ligar a receptores presentes em macrófagos, como receptores dectina-1, Toll-like, entre outros (SCHEPETKIN; QUINN, 2006) e para os quais é possível evidenciar atividades biológicas e correlacioná-las com os tipos de ligações glicosídicas, o grau de ramificação do polímero, a massa molecular e presença de grupamentos substituintes na estrutura.

2.5. IMUNOMODULAÇÃO POR PECTINAS E HEMICELULOSES RESISTENTES (FIBRAS DIETÉTICAS) INGERIDOS POR VIA ORAL

Os benefícios das fibras dietéticas para a saúde são classicamente conhecidas como sendo consequência dos seus efeitos indiretos no lúmen intestinal, como por exemplo, ação prebiótica (aumentando a produção de ácidos graxos de cadeia curta pela microbiota intestinal) e pelo aumento da viscosidade do bolo fecal (diminuindo os níveis de LDL e glucose sanguínea) (ANDOH *et al.*, 1999; MEIJER *et al.*, 2010; BROWNLEE, 2011; LANDBERG, 2012; MUDGIL e BARAK, 2013).

Estudos vêm demonstrando alternativamente que oligossacarídeos e polissacarídeos podem atravessar a barreira epitelial intestinal e assim interagir diretamente com os componentes do sistema imune presentes na lâmina própria intestinal e da circulação sistêmica especificamente no caso de oligossacarídeos (WISMAR *et al.*, 2010; MCDOLE *et al.*, 2012; COURTS, 2013; SUH *et al.*, 2013). Por exemplo, HONG e colaboradores (2004) observaram que glucanas (1→3)- ligadas, isoladas da cevada e de leveduras marcadas com fluorescência, foram englobadas por macrófagos e transportadas para o baço, linfonodos e medula óssea.

Analisando por esse contexto, além dos efeitos dependentes da microbiota, as células do epitélio intestinal poderiam estabelecer interações bidirecionais com os polissacarídeos e as células do sistema imune subjacente (macrófagos e células dendríticas), e dessa maneira, participar na resposta inflamatória da mucosa de duas formas: modulando seletivamente a permeabilidade da monocamada epitelial e, assim, a exposição de células imunes a antígenos; sintetizando e liberando, elas mesmas, mediadores inflamatórios. Os macrófagos e células dendríticas poderiam projetar extensões dendríticatrans-epiteliais (TEDs) em direção ao lúmen com o objetivo de detectar e potencialmente absorver material luminal. Assim também, as células

M (*microfoldcells*), localizadas nas placas de Peyer, poderiam captar os polissacarídeos do lúmen, afetando a resposta imunológica de células como os macrófagos intestinais (FIGURA 8).

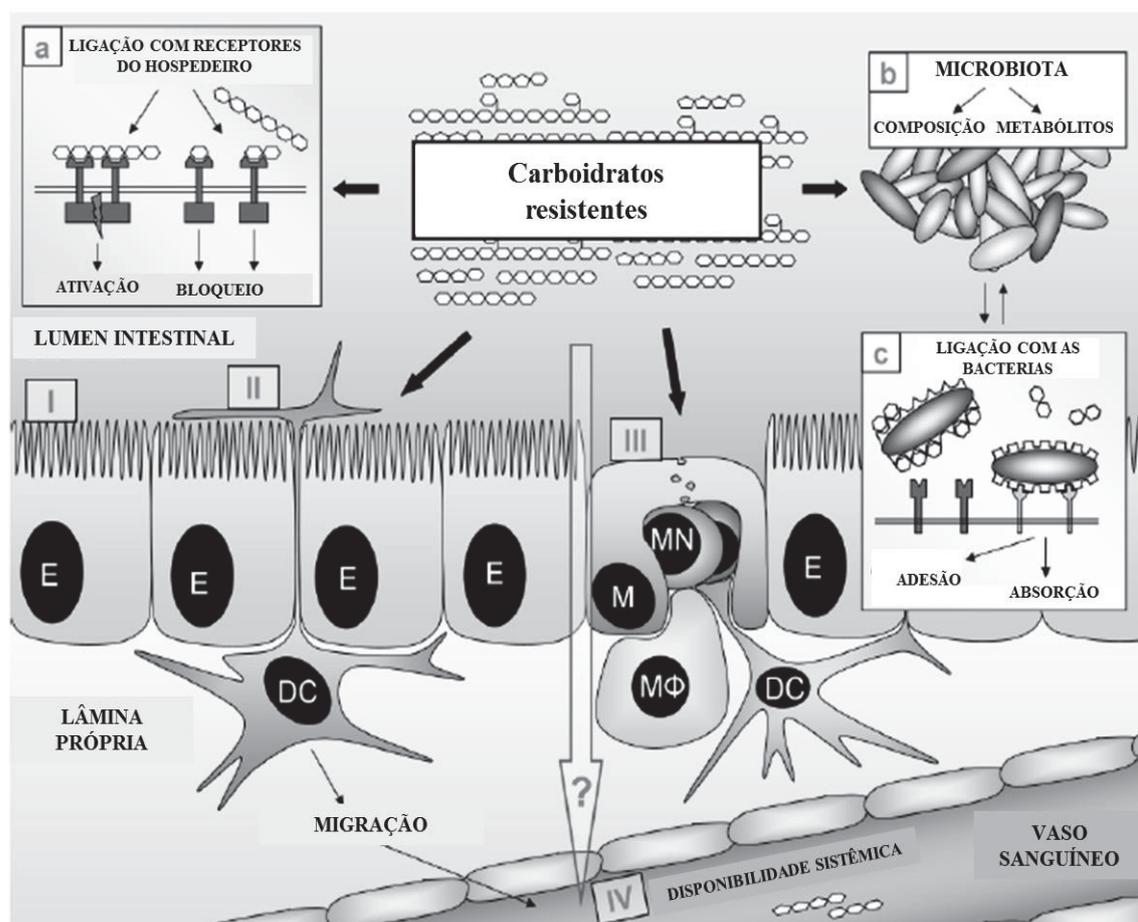


FIGURA 8 - ESQUEMA COM OS POTENCIAIS MECANISMOS DA IMUNOMODULAÇÃO POR POLISSACARÍDEOS RESISTENTES QUANDO INGERIDOS POR VIA ORAL.

Nota: (A) os polissacarídeos se ligariam diretamente com receptores do hospedeiro ativando ou bloqueando a resposta imunológica; (B) os polissacarídeos modulariam a composição da microbiota e a produção de metabólitos bacterianos; (C) os polissacarídeos se ligariam às bactérias alterando a adesão dessas à mucosa e absorção; (I) As células epiteliais intestinais (E) poderiam interagir com os polissacarídeos através de receptores e com a adesão bacteriana modulada pelos polissacarídeos; (II) células dendríticas (DC) presentes na lâmina própria poderiam absorver amostra dos polissacarídeos do lúmen intestinal e migrar para linfonodos mesentéricos, resultando em efeitos imunomodulatórios localmente na mucosa e sistemicamente; (III) os polissacarídeos podem modular absorção de bactérias e antígenos solúveis pelas células M ou serem absorvidos por essas células, afetando outras células subjacentes, incluindo células mononucleares (MN), macrófagos (MΦ), e DC; (IV) tem sido descrito que oligossacarídeos da dieta são secretados pela urina em crianças e adultos. Fonte: Adaptado de VOSet al(2007).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Realizar um estudo da atividade imunomodulatória em macrófagos humanos THP-1 de diferentes estruturas polissacarídicas já quimicamente caracterizadas pelo grupo de pesquisa de Química dos Carboidratos - UFPR.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para a realização do objetivo acima, o trabalho possui os seguintes objetivos específicos:

- a) Avaliar o efeito dos polissacarídeos em diferentes concentrações na viabilidade celular de macrófagos THP-1, através do ensaio de atividade das desidrogenases celulares (MTT), da retenção lisossomal (Vermelho Neutro) e da quantificação de células aderidas (Cristal Violeta).
- b) Avaliar o efeito do tratamento com os polissacarídeos individualmente e simultaneamente ao LPS na produção das citocinas IL-1 β e IL-10 em macrófagos THP-1.
- c) Avaliar o efeito do tratamento com os polissacarídeos na indução de espécies reativas de oxigênio (ROS) em macrófagos THP-1.
- d) Avaliar o efeito do tratamento com os polissacarídeos na capacidade fagocítica em macrófagos THP-1.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. AMOSTRAS

As amostras utilizadas neste trabalho contêm as seguintes estruturas polissacarídicas:

- a) Homogalacturonana com ramnogalacturonana ramificada com arabinogalactana do tipo I extraída da polpa do tamarillo (*Solanumbetaceum*) (DO NASCIMENTO *et al.*, 2015), denominada neste trabalho como HG + AG-I Tamarilho
- b) Arabinogalactana do tipo I extraída da ameixa seca (*Prunus domestica*) (CANTU-JUNGLES *et al.*, 2014), denominada neste trabalho como AG-I Ameixa.

- c) Homogalacturonana metilesterificada e ramificada com arabinana extraída da polpa da acerola (*Malpighiae marginata*) (KLOSTERHOFF *et al.*, 2018), denominada neste trabalho como HG + Ara Acerola.
- d) Arabinoxilana extraída do fruto de tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) (CANTU-JUNGLES *et al.*, 2017), denominada neste trabalho como AX Tucumã.
- e) Homogalacturonana com arabinana do fruto de carambola (*Averrhoa carambola* L.) (LEIVAS, IACOMINI e CORDEIRO, 2015), denominada neste trabalho como HG + Ara Carambola.
- f) Arabinogalactana do tipo I com arabinogalactana do tipo II do fruto de carambola (*Averrhoa carambola* L.) (LEIVAS *et al.*, 2016), denominada neste trabalho como AG-I + AG-II Carambola.

4.2. PREPARO DAS AMOSTRAS

As amostras foram preparadas nas concentrações 10 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL e 200 µg/mL. Para isso, as amostras foram diluídas em PBS (*Phosphate Buffered Saline*) e filtradas em filtro 0,22 µm.

4.3. ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS POLISSACARÍDEOS *IN VITRO*

4.3.1. Cultivo celular e diferenciação de macrófagos

Foi utilizada a linhagem imortalizada de células monocíticas derivadas de leucemia humana aguda THP-1 (*Humana cute monocytic leucemia cell line*). Estas células foram escolhidas por serem amplamente utilizadas como modelo de estudo para a avaliação da capacidade de resposta imune de monócitos e macrófagos, devido a sua similaridade com células mononucleares de sangue periférico (PBMCs), e capacidade de se diferenciar em macrófagos maduros com diferentes propriedades funcionais através de diferentes tratamentos (SHARIF *et al.*, 2007; CHANPUT, MES e WICHERS, 2014).

As células THP-1 foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, cat. R8758) suplementado com 10% de soro fetal bovino estéril inativado pelo calor (Gibco, cat.

161010-159), 100 µg/mL de estreptomicina e 100 U/mL de penicilina (Sigma-Aldrich), em incubadora umidificada a 37 °C em 5% de CO₂. O meio foi renovado duas vezes por semana. As células foram cultivadas até uma densidade de 1-8x10⁵ células/mL e utilizadas nas experiências na passagem máxima de 3 repiques.

O estado semelhante a macrófago maduro foi induzido por tratamento de monócitos THP-1 (2 x 10⁵ células/mL) durante 48 h com 5ng/ml de PMA (~ 8nM) para os ensaios de viabilidade celular, quantificação de ânion superóxido e fagocitose e com 62,5ng/mL de PMA (~ 100nM) para a quantificação das citocinas IL-10 e IL-1β de *phorbol12-myristate 13-acetate* (PMA; Sigma-Aldrich). As células foram cultivadas em placas de cultura de 96 poços com 200 µL de suspensão celular/poço na densidade de 2 x 10⁵ células/mL para avaliação de citotoxicidade ou em placas de cultura de 24 poços com 1 mL de suspensão celular/poço na densidade de 2 x 10⁵ células/mL para avaliação da produção de citocinas.

Após diferenciação, as células são aderidas à superfície permitindo a remoção do meio de cultura com PMA, em seguida os poços foram lavados duas vezes com PBS estéril e meio fresco livre de PMA, foi acrescentado para uma incubação de repouso por 24 horas a 37 ° C em 5% de CO₂ e os tratamentos foram realizados após esse tempo.

4.3.2. Tratamentos utilizados

Para avaliar o efeito isolado dos polissacarídeos nos diferentes ensaios em macrófagos THP-1, as células foram tratadas com os polissacarídeos em diferentes concentrações (10, 25, 50 e 200µg/mL), controle negativo (PBS) e controle positivo (LPS 500 ng/ml) para a avaliação do efeito dos polissacarídeos na imunomodulação conforme descrito abaixo:

Tratamento como os polissacarídeos isolados - os polissacarídeos foram adicionados às células, em seguida foram incubadas em estufa umidificada com 5% de CO₂, a 37°C por 1h para quantificação dos níveis de ânion superóxido, por 18h para a quantificação das citocinas IL-10 e IL1-β e por 24h para determinação da viabilidade celular e capacidade fagocítica.

Tratamento simultâneo com os polissacarídeos e LPS - os polissacarídeos foram adicionados às células juntamente com o LPS, seguido pela incubação em estufa umidificada com 5% de CO₂, a 37°C por 18h para a quantificação das citocinas IL-10 e IL1-β.

4.3.3. Viabilidade celular (método de MTT)

O ensaio de MTT (brometo de 3,4,5,-dimetil-2-tiazolil-2,5-difenil-2H-tetrazolium) foi usado para medir a atividade citotóxica das frações. O ensaio baseia-se na redução do sal MTT pela desidrogenases celulares para o produto roxo formazan, assim, pode-se avaliar a atividade metabólica celular e a viabilidade das células (REILLY *et al.*, 1998). Para o teste do MTT, as células THP-1 foram plaqueadas em placas de 96 poços na densidade de 2×10^5 células/mL para diferenciação celular. Após diferenciação da célula THP-1 em macrófagos, o meio foi removido e substituído por meio fresco contendo as frações a 10, 25, 50 e 200 $\mu\text{g/mL}$, lipopolissacarídeo (LPS; a 500ng/mL, controle pró-inflamatório) ou PBS estéril (10 μL , controle negativo) em quadruplicatas e então, incubado por 24 h em atmosfera de 5% de CO_2 humidificado a 37 °C. Após o período de incubação, 20 μL de solução de MTT (5 mg/mL) foram adicionados a cada poço. Após 3 h de incubação, os meios foram removidos e os cristais de formazan foram solubilizados em solução DMSO/Etanol (1:1). A absorbância foi medida a um comprimento de onda de 595 nm em leitor de microplacas (TECAN – Infinite M200).

4.3.4. Retenção lisossomal (Vermelho neutro)

A absorção do vermelho neutro (VN) depende da capacidade da célula para manter gradientes de pH, através da produção de ATP. Em pH fisiológico, o corante apresenta uma carga líquida próxima a zero, o que permite que ele penetre nas membranas da célula. Dentro de lisossomos, há um gradiente de prótons para manter um pH menor do que o do citoplasma. Assim, o corante é carregado e retido dentro dos lisossomos (Repetto, del Peso & Zurita, 2008). Dessa forma, o método mostra a “viabilidade/integridade das endomembranas”. Após a solução de extração, o corante eluído pode ser quantificado por medida de absorbância em 540 nm.

Para o teste do VN as células de THP-1 foram plaqueadas em placas de 96 poços na densidade de 2×10^5 células/mL para diferenciação celular e receberam os tratamentos por 24h. No dia do ensaio, ao término das 24h de tratamento, o meio foi retirado e 100 μL /poço da solução de VN 0,04 mg/mL (preparada no dia anterior, deixada na incubadora e filtrada antes do uso em membrana estéril de 0,22 μm) foi acrescentada. Nos poços utilizados como branco, adicionou-se 100 μL /poço de meio de cultura sem SFB (Soro fetal bovino). A placa foi deixada por 2 horas na incubadora, em seguida a solução de VN foi retirada e os poços foram eluídos com 100 μL de solução de extração (EtOH/Ac.COOH/ H_2O , 50%/1%/49%), incubados a temperatura ambiente por

20 minutos e a leitura da absorbância realizada em 540 nm em leitor de microplacas (TECAN – Infinite M200).

4.3.5. Números de células aderidas (Cristal violeta)

O ensaio colorimétrico de cristal violeta é bastante usado para determinar o número de células aderidas e baseia-se na coloração do DNA. Portanto, a intensidade da coloração da monocamada é proporcional à quantidade de células (BONNEKOH *et al.*, 1989; VEGA-AVILA; PUGSLEY, 2011). Para este ensaio, a coloração com CV foi realizada na mesma placa após a leitura do ensaio com o VN. A solução de extração do VN foi descartada, os poços foram lavados uma vez com água destilada (200 µL/poço) e a solução de Cristal violeta 0,25 mg/mL foi acrescentada na proporção 100 µL/poço. A placa foi incubada por 20 minutos a temperatura ambiente, lavada duas vezes com água destilada (200 µL/poço), deixada secar em temperatura ambiente e os poços foram eluídos com 100 µL de uma solução de ácido acético 33% em água destilada e a leitura da absorbância realizada em 570 nm em leitor de microplacas (TECAN – Infinite M200).

4.3.6. Quantificação dos níveis de ânion superóxido

Para o ensaio da secreção de ânion superóxido, as células THP-1 foram plaqueadas em placas pretas de 96 poços na densidade de 2×10^5 células/mL e acrescidas de 5ng/mL de PMA para diferenciação celular. Após diferenciação receberam os tratamentos com os polissacarídeos, PBS estéril (controle negativo) e PMA (400 nM, controle positivo). Em seguida, as células foram incubadas por 1h a 37°C, 5% de CO₂.

A quantificação dos níveis de ânion superóxido foi estimada através da redução do NBT (*nitro blue tetrazolium*), um composto amarelo lipossolúvel que se torna insolúvel e de cor azul no seu estado reduzido (MADHAVI *et al.*, 1994). Macrófagos THP-1 foram incubados, na ausência de luz, por 1 hora na presença de NBT 0,2% a 37°C. Após o sobrenadante foi desprezado. Uma lavagem dos poços foi realizada com PBS. Os macrófagos THP-1 foram fixados com metanol 50% durante 10 minutos e em seguida foram adicionados 120 µL de KOH 2 M e 140 µL de dimetilsulfóxido. Decorrido 30 minutos a reação foi determinada espectrofotometricamente utilizando um leitor de microplacas a 550 nm (TECAN – Infinite M200) e os resultados foram

normalizados por um ensaio de adesão celular conforme descrito no item 4.3.9 (Capacidade de Adesão). Os dados foram expressos em porcentagem em relação ao grupo controle.

4.3.7. Capacidade fagocítica

Para o ensaio da capacidade fagocítica as células THP-1 foram plaqueadas em placas de 96 poços na densidade de 2×10^5 células/mL e acrescidas de 5ng/mL de PMA para diferenciação celular. Após diferenciação e repouso receberam os tratamentos com os polissacarídeos e PBS estéril (controle negativo). Em seguida, as células foram incubadas por 24h a 37°C, 5% de CO₂.

A capacidade fagocítica dos macrófagos THP-1 foi estimada pela incorporação de zimosan não opsonizado, corado com vermelho neutro como descrito por Pipe e colaboradores (1995). Para tanto, os macrófagos THP-1 foram incubados na presença de zimosan (1×10^8 partículas/mL) por 30 minutos. A fagocitose foi então paralisada pela adição de 200 µL de fixador Baker (formaldeído 4%, cloreto de sódio 2% e acetato de cálcio 1%), e após 30 minutos os poços foram lavados por duas vezes com PBS.

Os macrófagos THP-1 foram incubados por mais 30 minutos com 200 µL de solução de extração (ácido acético 10% e etanol 40% em água destilada) e a absorbância medida a 550 nm (TECAN – Infinite M200). A atividade fagocítica foi expressa em porcentagem em relação ao grupo controle após normalização realizada por um ensaio de adesão celular conforme descrito no item 4.3.9 (Capacidade de Adesão).

4.3.8. Quantificação dos níveis de citocinas

As amostras foram testadas quanto à capacidade de ativar macrófagos THP-1 a secretarem a citocina pró-inflamatória IL-1 β e a anti-inflamatória IL-10, no tempo de 18 horas. As células foram plaqueadas em placas de cultura de 24 poços com 1 mL de suspensão celular/poço na densidade de 2×10^5 células/mL para diferenciação celular por 48 horas e após diferenciação e repouso de 24 horas, os macrófagos THP-1 foram expostos aos tratamentos com os polissacarídeos, PBS estéril (controle negativo, 50 µL), lipopolissacarídeo (LPS; a 500ng/mL, controle pró-inflamatório) ou meio fresco contendo os polissacarídeos acrescidos de LPS (500 ng/mL). As células foram então incubadas em atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C por 18 h. Este tempo de exposição foi escolhido devido a CHANPUT et al. (2010) terem observado que a secreção máxima de citocinas na inflamação induzida por LPS ocorreu neste momento. No final

do período de incubação, os sobrenadantes livres de células foram recolhidos e armazenados a -80°C para a quantificação da secreção das citocinas. A concentração de citocinas foi quantificada por Kit Elisa *Ready-Set-Go* específico para citocina humana (*Invitrogen*, cat. n. 88-7261-88 e 88-7106-88, respectivamente). Os resultados foram demonstrados em picogramas por mL para o número de células ($\text{pg/mL} - 2 \times 10^6$).

4.3.9. Capacidade de adesão

Para o ensaio da capacidade de adesão as células THP-1 foram plaqueadas em placas de 96 poços na densidade de 2×10^5 células/mL e acrescidas de 5ng/mL de PMA para diferenciação celular. Após diferenciação e repouso receberam os tratamentos com os polissacarídeos, PBS estéril (controle negativo) e PMA (400 nM, controle positivo). Em seguida, as células foram incubadas por 24h a 37°C , 5% de CO_2 .

A capacidade de adesão foi realizada segundo ROSEN e GORDON (1987), onde após o período de tratamento os poços foram lavados com PBS e as células aderentes, então fixadas com metanol 50% durante 10 minutos. Solução de *Giemsa* 0,1% foi adicionada e após 40 minutos os poços foram novamente lavados com PBS e o corante eluído com metanol 50%. A absorbância foi medida a 550 nm (TECAN – Infinite M200) e os resultados foram expressos em porcentagem em relação ao grupo controle.

Este ensaio foi realizado com a finalidade de normalização dos cálculos para os ensaios de capacidade fagocítica e quantificação dos níveis de ânion superóxido, através do seguinte cálculo: primeiramente no ensaio de adesão, dividiu-se a média das absorbâncias do controle negativo (PBS) pela média das absorbâncias de cada concentração das amostras testadas, gerando assim um fator de correção (FC). Para se normalizar os resultados obtidos nos ensaios de capacidade fagocítica e quantificação de ânion superóxido, cada leitura de absorbância de cada concentração testada para cada amostra foi multiplicada pelo seu FC correspondente.

4.4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados obtidos foram expressos como a média \pm erro padrão da média (SEM) e analisados por análise de variância unidirecional (ANOVA). Utilizamos o teste de comparação múltipla de Newman-Keuls ou Bonferroni. O limiar de significância estatística foi $p < 0,05$. Os

gráficos foram desenhados e as análises estatísticas realizadas usando *GraphPad Prism* versão 5.01 para Windows (*GraphPad Software*, San Diego, CA, EUA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. VIABILIDADE CELULAR

O experimento de viabilidade celular foi utilizado nesse trabalho com o objetivo de determinar as concentrações limítrofes em que os polissacarídeos não afetariam a viabilidade das células. Para isso foram utilizados três métodos diferentes: MTT, Vermelho neutro (VN) e Cristal violeta (CV).

5.1.1. MTT

O ensaio de redução do sal MTT a cristais de formazan pelo complexo succinato desidrogenase de células metabolicamente viáveis é um dos testes mais difundidos para determinação da ação citotóxica de drogas em cultura de células (CHIBA; KAWAKAMI; TOHYAMA, 1998). Este método avalia a capacidade das células metabolicamente ativas em reduzirem, por ação da enzima succinato desidrogenase celular, o brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazolio (MTT), gerando como produto cristais de formazan que são solúveis em DMSO (MOSMANN, 1983).

O tratamento foi realizado com diferentes concentrações dos polissacarídeos para estabelecer as concentrações nas quais se mantivesse um mínimo de 80% de viabilidade em relação ao controle, constituído apenas de meio de cultivo sem os polissacarídeos (GARCIA *et al.*, 2014)

Quando incubada com macrófagos THP-1 por 24h, a fração HG+AG-I TAMARILHO apresentou efeitos citotóxicos (Fig. 9A) a partir da dose de 100 µg/mL devido a viabilidade cair abaixo de 80% (GARCIA *et al.*, 2014). Entretanto houve um aumento de 11,2% no metabolismo celular em relação ao controle na dosagem de 2 µg/mL.

Para a fração AG-I AMEIXA (Fig. 9B) somente na dosagem de 400 µg/mL a viabilidade apresentou-se abaixo dos 80% e também como na fração anterior, nas dosagens de 2 e 5 µg/mL houve aumento na viabilidade de 14,3% e 11,3% respectivamente em relação ao controle.

Diferentemente, para a fração HG + Ara CARAMBOLA (Fig. 9C) nenhuma das concentrações testadas apresentou efeitos citotóxicos para os macrófagos THP-1, muito pelo contrário, demonstrou aumento na viabilidade já a partir da concentração de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (com aumentos de 13,0 a 26,8% em relação ao controle), com exceção das concentrações de 200 e 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

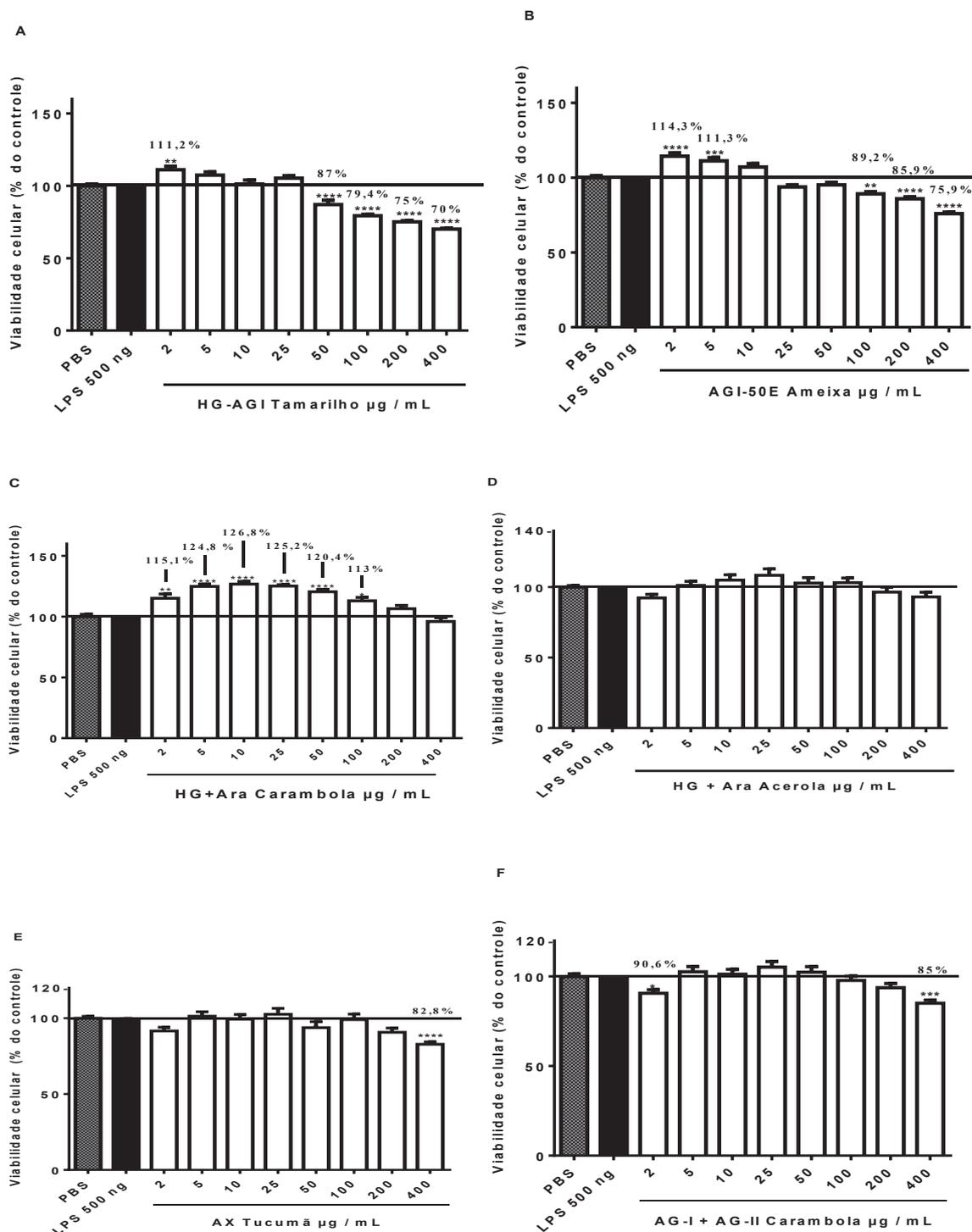


FIGURA 9 - EFEITO DOS POLISSACARÍDEOS SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE MACRÓFAGOS THP-1 PELO MÉTODO DO MTT. (A) HG + AG-I TAMARILHO, (B) AG-I

AMEIXA, (C) HG + Ara CARAMBOLA, (D) HG + Ara ACEROLA, (E) AX TUCUMÃ, (F) AG-I + AG-II CARAMBOLA.

As células THP-1 foram expostas aos polissacarídeos e incubadas na concentração de 2, 5, 10, 25, 50, 100, 200 e 400 µg/mL, LPS 500 ng/mL e PBS (controle) por 24h. Estes ensaios foram realizados em quadruplicata, três experimentos independentes. Os resultados foram expressos como a média ± erro padrão da média (SEM) em relação ao PBS (controle) e analisados por análise de variância unidirecional (ANOVA), utilizando o teste de comparação múltipla de Newman-Keuls. O limiar de significância estatística foi *p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001 e ****p <0,0001.

Para as demais frações (Fig. 9D, 9E e 9F), houve uma redução significativa na viabilidade quando comparada ao controle PBS apenas na concentração de 400 µg/mL para AX-tucumã e AG-I + AG-II-carambola, entretanto, a viabilidade ficou superior a 80%.

O LPS a 500 ng/mL não alterou a viabilidade celular pelo método do MTT (Fig. 9).

Estudos prévios demonstraram que a viabilidade celular de macrófagos THP-1 pode ser influenciada por diferentes pectinas. Tamiello e colaboradores (2017) observaram para uma arabinogalactana do tipo II isolada do jambo que concentrações de até 100 µg/mL não diminuíram a viabilidade celular quando comparadas ao controle. No entanto, foi observada uma redução de 30% na viabilidade celular na maior concentração testada 200 µg/mL. Do Nascimento e colaboradores (2017) observaram que a pectina do pimentão (HG com AG-I), nas concentrações de 10, 30, 100 e 300 µg/mL não apresentaram efeitos citotóxicos.

Apresentar baixa toxicidade é uma característica também observada para pectinas de outras fontes como da flor de *Tanacetum vulgare* (catinga-de-mulata), onde a concentração de até 1,6 mg/mL de diferentes frações do polissacarídeo não se apresentaram tóxicas para a linhagem de macrófagos J774.A1 em 24 horas de tratamento (XIE; SCHEPETKIN; QUINN, 2007). E ainda quatro frações de pectinas extraídas do caule do cacto *Opuntia polyacantha* não comprometeram a viabilidade dessa mesma linhagem de macrófagos, descrita acima, em concentrações de 800 µg/mL dos polímeros, em condições experimentais semelhantes ao trabalho anterior (SCHEPETKIN *et al.*, 2008).

5.1.2. Vermelho neutro

O método do Vermelho neutro consiste em avaliar a capacidade das células endocitarem o corante (vermelho neutro) e, para tanto, há uma correlação direta da integridade física e funcional

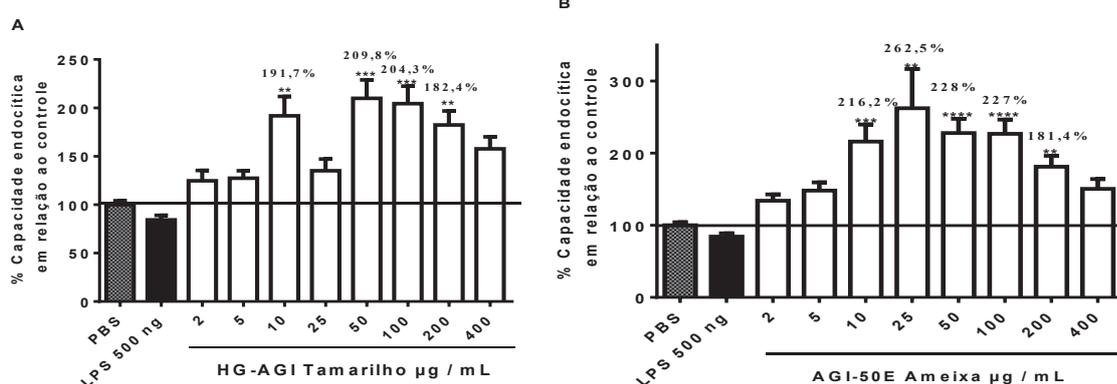
da membrana plasmática, somente presente em células viáveis, com a capacidade de captação deste corante (endocitose). Após a endocitose o corante fica acumulado no interior das células, e com uma solução de eluição, o corante eluído pode ser quantificado por medida de absorbância.

Neste ensaio, os maiores aumentos de valores da capacidade endocítica quando comparados ao controle PBS foram observados para as frações HG + AG-I TAMARILHO (FIGURA 10A) e AG-I AMEIXA (FIGURA 10B), as quais demonstraram aumentos que variaram de 82,4% a 109,8% para a fração HG + AG-I TAMARILHO e de 81,4% a 162,5% para AG-I AMEIXA, nas concentrações de 10 µg/mL até 200 µg/mL. Somente a concentração de 25 µg/mL da fração da HG + AG-I TAMARILHO (FIGURA 10A) não causou aumento na capacidade endocítica das células THP-1.

Analisando a fração HG + Ara CARAMBOLA (FIGURA 10C) observa-se que a fração aumentou a capacidade endocítica do corante já a partir da menor concentração de 2 µg/mL até a de 200 µg/mL, porém esse aumento variou de 36,2 a 54,7% na comparação ao controle.

Já a fração HG + Ara ACEROLA (FIGURA 10D) apesar de apresentar um leve aumento da capacidade endocítica, esse aumento não foi significativo em nenhuma das concentrações testadas quando comparadas com o controle PBS.

Para AX TUCUMÃ (FIGURA 10E) o aumento iniciou a partir da concentração de 5µg/mL até a de 200 µg/mL, variando de 32 a 46,9% e aumentos bem pontuais ocorreram com a fração AG-I + AG-II CARAMBOLA (FIGURA 10F), que apresentou 50% para a concentração de 5 µg/mL e 46% para 25 µg/mL.



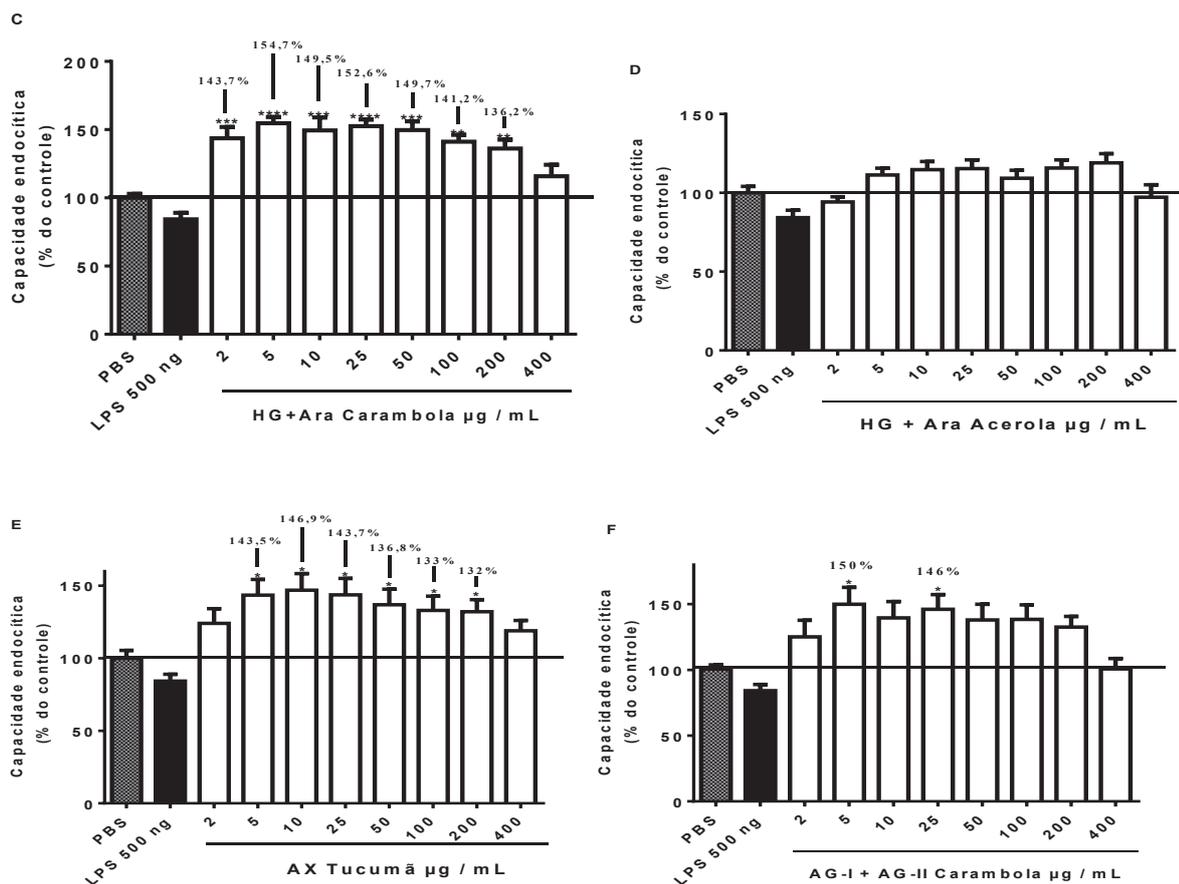


FIGURA 10 - EFEITO DOS POLISSACARÍDEOS SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE MACRÓFAGOS THP-1 PELO MÉTODO DO VERMELHO NEUTRO (A) HG + AG-I TAMARILHO, (B) AG-I AMEIXA, (C) HG + Ara CARAMBOLA, (D) HG + Ara ACEROLA, (E) AX TUCUMÃ, (F) AG-I + AG-II.

As células THP-1 foram expostas aos polissacarídeos e incubadas na concentração de 2, 5, 10, 25, 50, 100, 200 e 400 µg/mL, LPS500 ng/mL e PBS (controle) por 24h. Estes ensaios foram realizados em quadruplicata, três experimentos independentes. Os resultados foram expressos como a média ± erro padrão da média (SEM) em relação ao PBS (controle) e analisados por análise de variância unidirecional (ANOVA), utilizando o teste de comparação múltipla de Newman-Keuls. O limiar de significância estatística foi * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

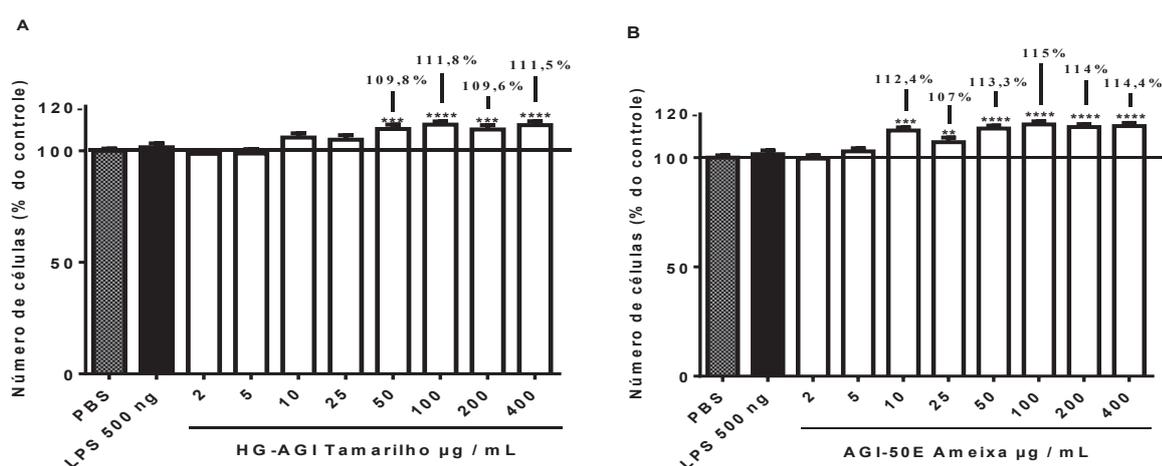
O LPS a 500 ng/mL não apresentou efeito sobre a capacidade endocítica do vermelho neutro pela linhagem THP-1, ficando seu valor muito próximo do controle negativo (Fig. 10)

Fábio T. Yamassaki, em seu trabalho de dissertação de mestrado em 2013, observou que uma arabinogalactana-proteína (denominada CNTG-AGP) obtida da goma de exudato do cajueiro, nas concentrações de 80 e 160 µg/mL foi capaz de aumentar a atividade de retenção de lisossomos significativamente, com média de 52,7 e 52,5% maior em relação ao controle negativo.

5.1.3. Cristal violeta

As células aderentes se desprendem das placas de cultura de células durante a morte celular. Esta característica pode ser utilizada para a quantificação indireta da morte celular e para determinar diferenças na proliferação por estímulo com agentes indutores de morte. Um método simples para detectar a aderência mantida das células é a coloração das células anexadas com corante cristal violeta, que se liga às proteínas e ao DNA. As células que sofrem morte celular perdem sua aderência e são subsequentemente perdidas da população de células, reduzindo a quantidade de coloração por cristal violeta em uma cultura. Este protocolo descreve um método de rastreamento rápido e confiável, adequado para o exame do impacto de compostos na sobrevivência celular e inibição de crescimento.

Analisando os resultados deste método observa-se para a fração HG + Ara ACEROLA (FIGURA 11D) ocorrência de diminuição significativa na aderência celular apenas na concentração de 2 µg/mL, ficando em 89,4% em relação ao controle negativo. Para a maioria das concentrações das frações os resultados ficaram muito próximo ao controle negativo, com exceção para as concentrações de 50 a 400 µg/mL da fração + AG-I TAMARILHO (FIGURA 11A) cujos aumentos da aderência celular variaram de 9,6% a 11,8%, também para as concentrações de 10 a 400 µg/mL da fração AG-I AMEIXA (FIGURA 11B) cujos aumentos variaram de 7% a 15% e finalmente pra as concentrações de 2 a 400 µg/mL da fração HG + Ara – CARAMBOLA que tiveram variação de 16,7% a 24,7%.



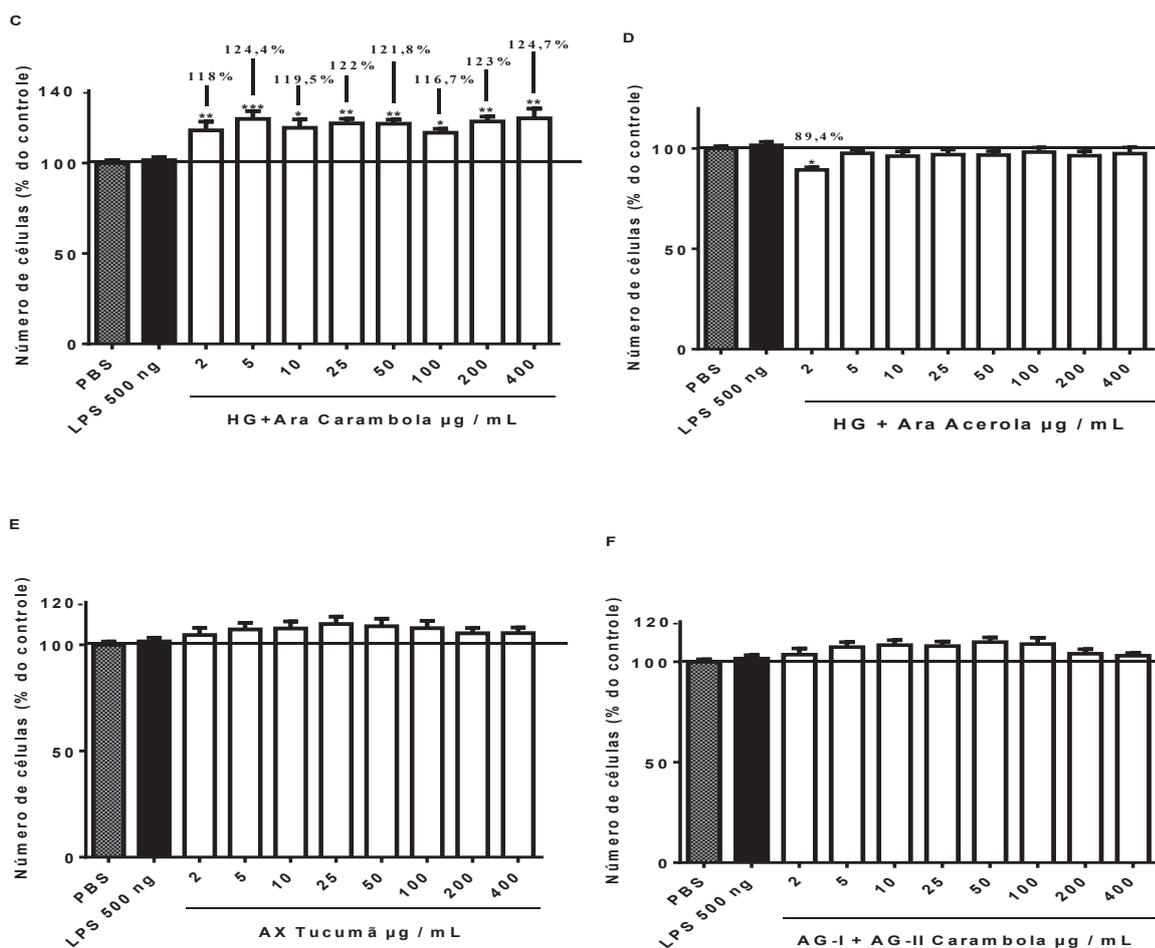


FIGURA 11 - EFEITO DOS POLISSACARÍDEOS SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE MACRÓFAGOS THP-1 PELO MÉTODO DO CRISTAL VIOLETA (A) HG + AG-I TAMARILHO, (B) AG-I AMEIXA, (C) HG + Ara CARAMBOLA, (D) HG + Ara ACEROLA, (E) AX TUCUMÃ, (F) AG-I + AG-II CARAMBOLA.

As células THP-1 foram expostas aos polissacarídeos e incubadas na concentração de 2, 5, 10, 25, 50, 100, 200 e 400 µg/mL, LPS a 500 ng/mL e PBS (controle) por 24h. Estes ensaios foram realizados em quadruplicata, três experimentos independentes. Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (SEM) em relação ao PBS (controle) e analisados por análise de variância unidirecional (ANOVA), utilizando o teste de comparação múltipla de Newman-Keuls. O limiar de significância estatística foi * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

Como já mencionado polissacarídeos de plantas são alvos de estudos como biomoduladores por apresentarem baixa toxicidade quando comparados com outros compostos (TZIANABOS, 2000; PAULSEN, 2001; LEUNG *et al.*, 2004; SCHEPETKIN; QUINN, 2006). Neste sentido, as frações polissacarídicas utilizadas no presente estudo podem ser consideradas de baixa toxicidade para macrófagos THP-1, pois foi observado que as mesmas apenas interferiram

na viabilidade destas células em concentrações consideradas altas para testes de citotoxicidade *in vitro* e isso ocorreu para apenas duas das frações testadas: HG + AG-I TAMARILHO (FIGURA 9A) e AG-I AMEIXA (FIGURA 9B). Sendo assim, foram escolhidas as concentrações de 10, 25 e 50 µg/mL para a fração HG + AG-I TAMARILHO e 10, 50 e 200 µg/mL para as demais frações para serem utilizadas nos demais ensaios para a avaliação do efeito dos polissacarídeos na imunomodulação sobre macrófagos THP-1, tais como: produção de ânion superóxido, capacidade fagocítica e avaliação da produção de citocinas.

5.2. QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE ÂNION SUPERÓXIDO

Alguns agentes capazes de induzir a produção de espécies reativas de oxigênio em macrófagos são IFN- γ , LPS, muramil dipeptídeo e também os ésteres de forbol (PMA) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; SCHEPETKIN; QUINN, 2006). Neste trabalho o éster de forbol (PMA) foi utilizado como controle positivo, e pode-se observar na Figura 12 que, como esperado, provocou o aumento dos níveis de ânion superóxido em comparação ao controle negativo PBS.

Com relação à indução de aumento dos níveis de ânion superóxido pelas amostras polissacarídicas, pode-se observar que as frações provocaram um expressivo aumento nos níveis deste radical livre. Com exceção das frações HG+Ara Acerola e AX Tucumã, para todas as demais frações a relação foi inversamente proporcional, ou seja, quanto maior a concentração das amostras menor foi a produção do ânion superóxido observada. Isso demonstra que as frações testadas apresentam um grande potencial em estimular os macrófagos THP-1 a liberarem ânion superóxido, incrementando o *burst* oxidativo ou respiratório, sugerindo uma ativação do complexo NADPH oxidase e esta, por sua vez está diretamente relacionada a execução da atividade microbicida através da despolarização da membrana.

Amorim et al. (2016) também compararam a produção de ânion superóxido por macrófagos peritoneais de camundongos estimulados por três diferentes pectinas e observaram que apenas a homogalacturonana (fração PG), na concentração de 200 µg/mL, promoveu aumento (de 60%) nos níveis deste radical em relação ao controle negativo. As demais pectinas testadas e obtidas da casca do cacau não se apresentaram capazes de estimular a produção de ânion superóxido em níveis superiores aos observados no grupo controle.

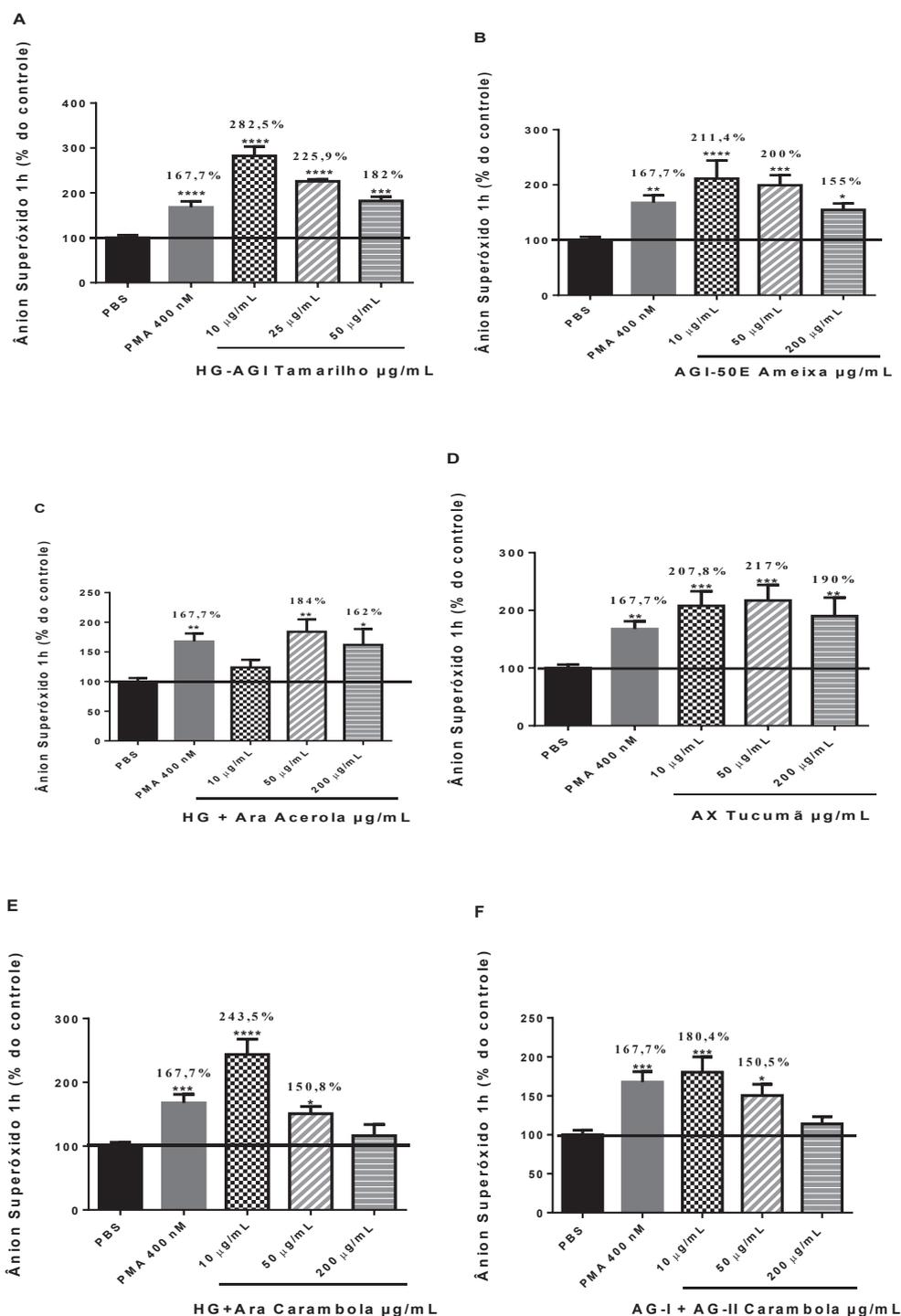


FIGURA 12 - EFEITO DOS POLISSACARÍDEOS (A) HG + AG-I TAMARILHO, (B) AG-I50E AMEIXA, (C) HG + Ara ACEROLA, (D) AX TUCUMÃ, (E) HG + Ara CARAMBOLA E (F) AG-I + AG-II CARAMBOLA NA QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE ÂNION SUPERÓXIDO DE MACRÓFAGOS THP-1.

As células THP-1 foram expostas aos polissacarídeos e incubadas na concentração de 10, 25, 50 µg/mL para a fração HG+ AG-I TAMARILHO e 10, 50 e 200 µg/mL para as demais frações, PMA 400 nM (controle positivo) e PBS (controle negativo) por 1h. Estes ensaios foram realizados

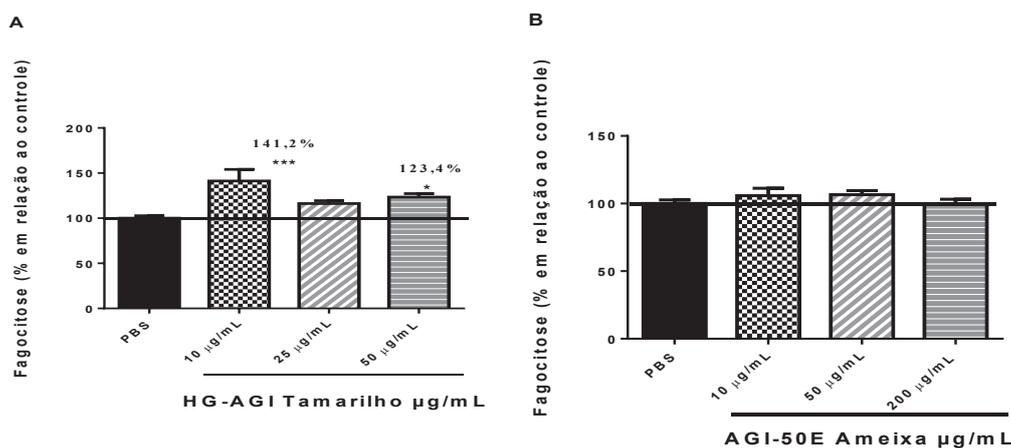
em quadruplicata, três experimentos independentes. Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (SEM) em relação ao PBS (controle) e analisados por análise de variância unidirecional (ANOVA), utilizando o teste de comparação múltipla de Newman-Keuls. O limiar de significância estatística foi * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

5.3. CAPACIDADE FAGOCÍTICA

A fagocitose é um dos principais mecanismos de suporte da imunidade inata e um processo onde células mortas e partículas estranhas são captadas e posteriormente ingeridos por células fagocíticas, sendo também um processo importante para a eliminação de células tumorais (Pacheco, 2012).

A modulação da capacidade fagocítica dos macrófagos THP-1 pelas frações estudadas foi avaliada pela incorporação de zimosan não opsonizado, corado com vermelho neutro como descrito por Pipe e colaboradores (1995). Pode-se observar na Figura 13, que apenas as frações HG+AG-I Tamarilho (Figura 13A, nas concentrações de 10 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e HG+Ara Carambola (Figura 13E, na concentração de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) provocaram um aumento estatisticamente significativo na capacidade fagocítica dos macrófagos quando comparado ao controle negativo PBS.

Amorim *et al.* (2016) avaliaram o efeito de três pectinas diferentes sobre o processo de fagocitose em macrófagos peritoneais de camundongos utilizando o método de incubação com leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*). Os macrófagos foram tratados durante 48 horas com os polissacarídeos nas concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e observaram que nenhum dos polímeros foi capaz de estimular a atividade fagocítica de maneira significativa em relação às células tratadas apenas com meio de cultura.



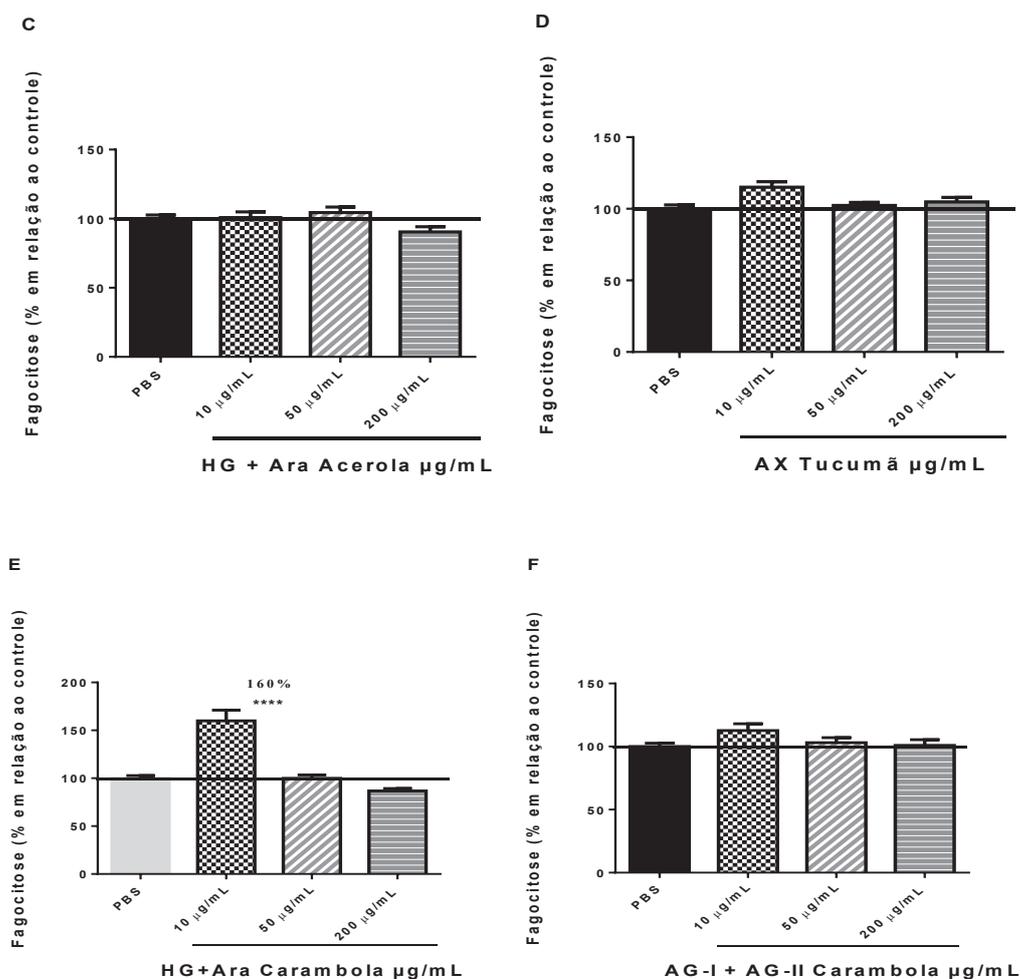


FIGURA 13 - EFEITO DOS POLISSACARÍDEOS (A) HG + AG-I TAMARILHO, (B) AG-I50E AMEIXA, (C) HG + Ara ACEROLA, (D) AX TUCUMÃ, (E) HG + Ara CARAMBOLA E (F) AG-I + AG-II CARAMBOLA SOBRE A CAPACIDADE FAGOCÍTICA DE MACRÓFAGOS THP-1.

As células THP-1 foram expostas aos polissacarídeos e incubadas na concentração de 10, 25, 50 µg/mL para a fração HG+ AG-I TAMARILHO e 10, 50 e 200 µg/mL para as demais frações e PBS (controle negativo) por 24h. Estes ensaios foram realizados em quadruplicata, três experimentos independentes. Os resultados foram expressos como a média ± erro padrão da média (SEM) em relação ao PBS (controle) e analisados por análise de variância unidirecional (ANOVA), utilizando o teste de comparação múltipla de Newman-Keuls. O limiar de significância estatística foi * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

Uma fração polissacarídica ácida extraída das raízes de *Panax ginseng* (ginseng), constituída por 43% de ácido galacturônico e 47% dos monossacarídeos glucose e galactose, na concentração de 10 µg/mL, foi capaz de estimular a fagocitose de partículas de zimosan em

aproximadamente 60% em relação ao grupo controle, quando testada em macrófagos peritoneais de camundongos por 24 horas. Os autores atribuem esse efeito ao aumento da expressão do receptor CD14, o qual está envolvido com o reconhecimento de partículas de zimosan (SHIN *et al.*, 2002).

Outro estudo avaliou a atividade fagocítica de macrófagos RAW 264.7 tratados com uma galactoglucomanana isolada de sementes de *Leucaena leucocephala* (leucena), e suas formas quimicamente glicosilada e sulfatada. Os autores observaram um aumento da fagocitose de partículas de FITC-zimosana ordem de 20, 30 e 40% após tratamento com os polímeros nativo, glicosilado e sulfatado, respectivamente em concentração de 10 µg/mL após uma hora de tratamento (GAMAL-ELDEEN *et al.*, 2007).

Pode-se sugerir que a atuação de diferentes polissacarídeos na atividade fagocítica de macrófagos é dependente de características químicas peculiares de cada polímero, que o permite interagir com determinados receptores de maneira complementar. Além disso, a natureza da partícula fagocitada também pode influenciar na atividade fagocítica.

5.4. QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS

As interleucinas possuem tempos de meia-vida variando de horas até dias (BURKE; LEWIS, 2002). Desta forma, por vezes não é possível quantificar várias destas moléculas em um mesmo tempo de tratamento. Além disso, é possível que as condições experimentais das avaliações também possam interferir na integridade destes mediadores e, conseqüentemente, nas quantificações.

Neste trabalho os níveis das citocinas avaliadas foram determinados no sobrenadante de macrófagos THP-1 após tratamento com os polissacarídeos no tempo de 18 horas para a IL-10 e IL-1 β . Este tempo de exposição foi escolhido devido a CHANPUT *et al.* (2010) terem observado que a secreção máxima de citocinas na inflamação induzida por LPS ocorreu neste momento.

O ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*), é um dos métodos mais bem estabelecidos para quantificação de produtos em sobrenadantes de cultura de células, mostrando-se, ainda, o mais adequado quando necessária alta sensibilidade na técnica. Este ensaio emprega um anticorpo específico, para captura de determinada citocina, ligado a placa. Após a ligação da citocina de interesse ao anticorpo de captura é utilizado anticorpo de detecção, o qual reconhece o complexo citocina-anticorpo de captura. Seguido a esse evento a reação é ampliada pela conjugação do anticorpo secundário estreptavidina-HRP, que na presença do substrato da enzima peroxidase, tetrametilbenzidina (TMB), revela a reação (RAYBIOTECH, 2011).

A quantificação das citocinas IL-10 e IL1- β está representada em pg/mL de produto por 2×10^6 células. A concentração de cada citocina foi determinada através de uma curva padrão específica, LPS 500 ng/mL foi utilizado como controle positivo e PBS como controle negativo.

5.4.1. Interleucina IL-10

Atualmente sabe-se que a habilidade de secretar interleucina-10 não está limitada aos subtipos de linfócitos T, mas também a uma gama de outras células, entre as quais se encontram monócitos e macrófagos, células que podem ser ativadas para produção desta citocina tanto por mediadores endógenos quanto exógenos (WOLK *et al.*, 2002; SABAT *et al.*, 2010).

Avaliamos por uma triagem inicial que as frações HG + AG-I TAMARILHO e AX TUCUMÃ não apresentaram nenhuma atividade na liberação de ambas as citocinas e, então, optamos por excluí-las destes ensaios.

Para verificar se as demais frações polissacarídicas poderiam atuar como mediadores de estímulo para a liberação de IL-10, macrófagos THP-1 foram tratados com as mesmas nas concentrações de 10, 50 e 200 $\mu\text{g/mL}$ pelo período de 18 horas.

Com exceção da fração HG + Ara – CARAMBOLA, a exposição das células THP-1 às frações (Figura 14A, C, D) nas concentrações de 50 $\mu\text{g/mL}$ e 200 $\mu\text{g/mL}$ resultou em um aumento significativo na quantificação de IL-10 quando comparado ao controle negativo. Quando as frações foram incubadas na presença do LPS, com exceção da fração AG-I + AG-II – CARAMBOLA na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$, não houve diferenças significativas na quantificação de IL-10 quando comparado com o LPS sozinho.

Do Nascimento e colaboradores (2017) também observaram que uma pectina do pimentão (fração denominada ANWS) a 300 $\mu\text{g/mL}$ foi capaz de aumentar a secreção de IL-10 quando comparado ao controle negativo.

Tamiello e colaboradores (2017) observaram para uma arabinogalactana isolada do jambo que a secreção de citocinas por macrófagos THP-1 estimulados pela pectina nas concentrações de 10, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ causou aumento estatisticamente significativo da secreção da IL-10 em todas as concentrações testadas (2,3, 2,7 e 3,6 vezes, respectivamente). Quando a maior concentração da fração foi testada simultaneamente ao LPS 100 ng/mL, nenhuma alteração foi observada.

Esse perfil de Tamiello e colaboradores (2017) foi o encontrado para a maioria das frações testadas neste trabalho para a secreção de IL-10 com apenas uma exceção para a maior

concentração da fração AG-I + AG-II CARAMBOLA (FIGURA 14D) 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ associada ao LPS 500 ng/mL , onde a secreção de IL-10 aumentou em comparação ao LPS isolado.

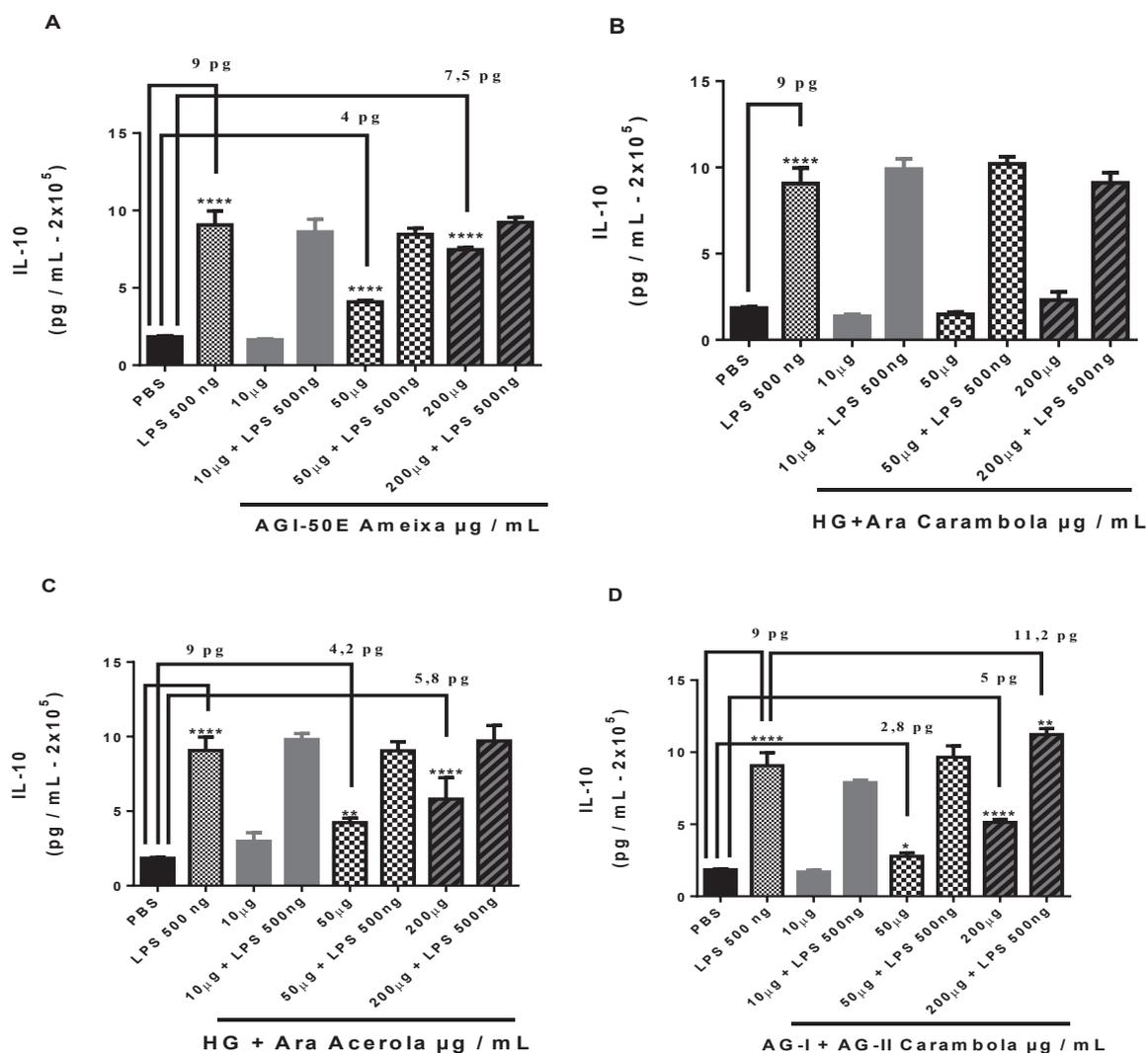


FIGURA 14 - EFEITO DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS SOBRE A SECREÇÃO DE CITOCINA IL-10 EM MACRÓFAGOS THP-1. (A) AG-I AMEIXA, (B) HG + Ara CARAMBOLA, (C) HG + Ara ACEROLA, (D) AG-I + AG-II CARAMBOLA.

As células THP-1 foram expostas aos polissacarídeos e incubadas na concentração de 10, 50 e 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, LPS 500 ng/mL e PBS (controle) por 18 horas. Estes ensaios foram realizados em duplicata, dois experimentos independentes. A concentração de IL-10 foi quantificada por Kit Elisa *Ready-Set-Go* específico para citocina humana - kit *Invitrogen*, cat. n. 88-7106-88. Os resultados foram demonstrados em pg/mL para o número de células ($\text{pg}/\text{mL} - 2 \times 10^6$ células) e expressos estatisticamente como a média \pm erro padrão da média (SEM) analisados por análise de

variância unidirecional (ANOVA), utilizando o teste de comparação múltipla de Bonferroni. O limiar de significância estatística foi * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

5.4.2. Interleucina IL1- β

Para verificar se as frações polissacarídicas poderiam atuar como mediadores de estímulo para a secreção de IL-1 β , macrófagos THP-1 foram tratados com as frações nas mesmas concentrações acima (10, 50 e 200 $\mu\text{g/mL}$) pelo período de 18 horas.

O controle positivo, LPS 500 ng/mL , induziu a um aumento significativo na secreção de IL1- β quando comparado com controle negativo, PBS (Figura 15). Quando macrófagos THP-1 foram expostos às frações polissacarídicas, pode-se observar que apenas as frações AG-I AMEIXA e AG-I + AG-II Carambola (ambas na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$) e HG + Ara Acerola (na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$), foram capazes de provocar aumento na secreção de IL1- β quando comparadas ao controle negativo – PBS. A fração HG + Ara Carambola diminuiu a secreção de IL1- β quando comparada ao controle negativo – PBS, sendo esta redução estatisticamente significativa apenas na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$.

Quando as frações foram incubadas na presença do LPS, com exceção da fração AG-I 50E Ameixa (na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$), que apresentou um aumento na secreção da IL-1 β , não houve diferenças significativas na secreção desta citocina quando comparado com o LPS sozinho. Apesar da fração HG + Ara Carambola na presença do LPS (na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$) apresentar um aumento significativo nos níveis de IL1- β em relação ao controle positivo LPS sozinho, acreditamos que esse sinergismo não deva ocorrer e possa ter sido resultado de algum problema experimental, uma vez que a fração sozinha, na mesma concentração, foi capaz de diminuir a produção desta citocina. Desta maneira, este experimento deve ser repetido para confirmar esta hipótese. A fração HG + Ara Acerola na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$ na presença do LPS apresentou uma secreção de 29 pg de IL-1 β , valor superior ao encontrado para o LPS isoladamente que foi de 21,7 pg.

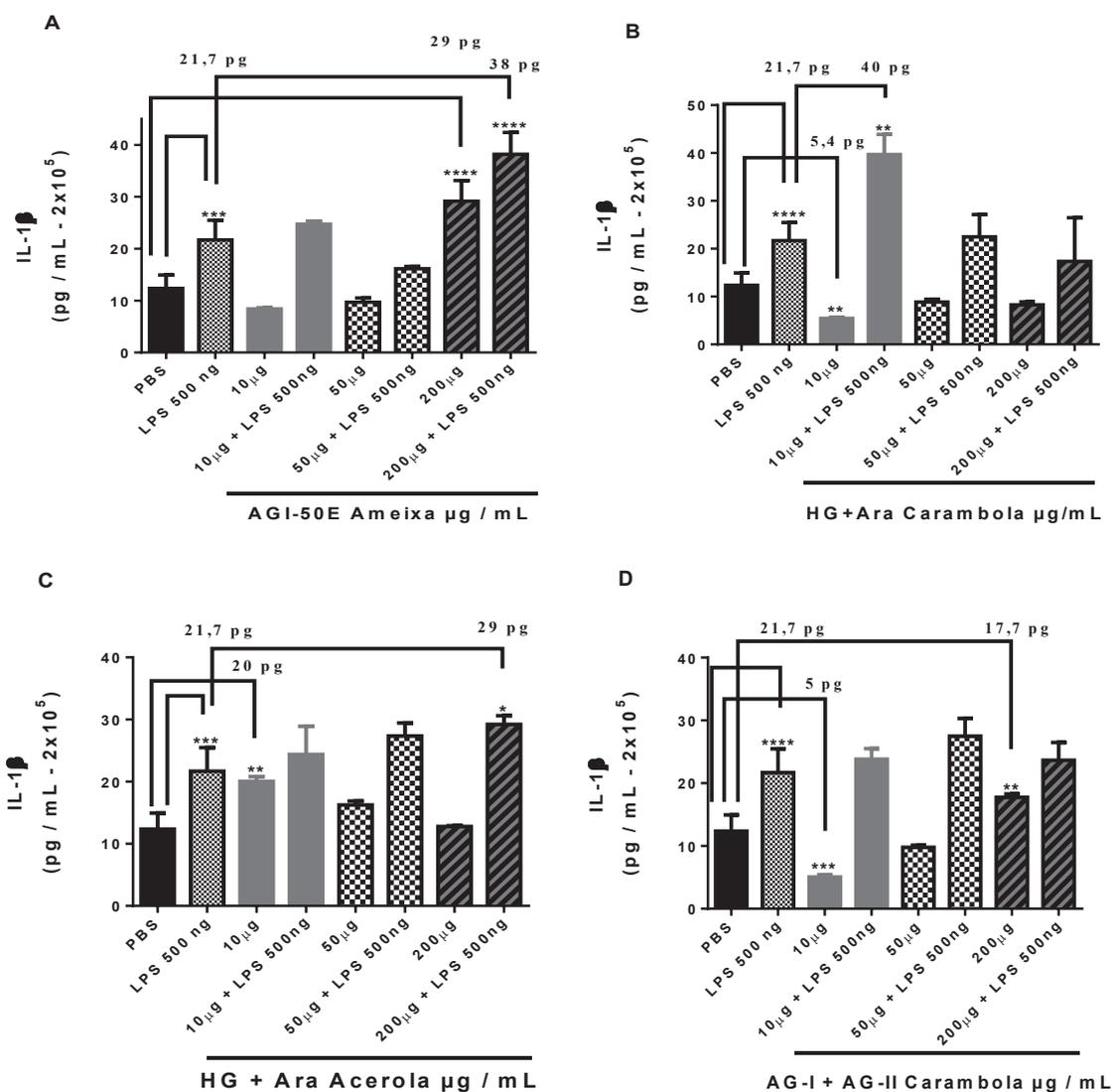


FIGURA 15 - EFEITO DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS SOBRE A SECREÇÃO DE CITOCINA IL1- β EM MACRÓFAGOS THP-1. (A) AG-I AMEIXA, (B) HG + Ara CARAMBOLA, (C) HG + Ara ACEROLA, (D) AG-I + AG-II CARAMBOLA.

As células THP-1 foram expostas aos polissacarídeos e incubadas na concentração de 10, 50 e 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, LPS 500 ng/mL e PBS (controle negativo) por 18 horas. Estes ensaios foram realizados em duplicata, dois experimentos independentes. A concentração de IL1- β foi quantificada por Kit Elisa *Ready-Set-Go* específico para citocina humana - kit *Invitrogen*, cat. n. 88-7261-88. Os resultados foram demonstrados em pg/mL para o número de células ($\text{pg} / \text{mL} - 2 \times 10^6$ células) e expressos estatisticamente como a média \pm erro padrão da média (SEM) e analisados por análise de variância unidirecional (ANOVA), utilizando o teste de comparação múltipla de Bonferroni. O limiar de significância estatística foi * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

Tamiello e colaboradores (2017) verificaram que houve um aumento na concentração desta citocina pró-inflamatória, com liberação significativa a 100 µg/mL e, quando esta concentração estava associada ao LPS 100 ng/mL, contrariamente houve uma diminuição na secreção desta citocina em comparação ao LPS 100 ng/mL isoladamente, indicando um efeito anti-inflamatório da arabinogalactana isolada do jambo (SF-WSP) nesta concentração.

Para Do Nascimento e colaboradores (2017) a exposição de macrófagos THP-1 a uma pectina do pimentão (ANWS) nas concentrações de 10, 30 e 100 µg/mL apresentaram níveis semelhantes da citocina IL1-β quando comparadas ao PBS (controle negativo). Por outro lado, quando os macrófagos foram tratados com ANWS a 300 µg/mL, o aumento da secreção de IL-1β pelos macrófagos THP-1 tornou-se evidente (quase 4 vezes) em relação ao PBS. Porém quando os macrófagos THP-1 foram cultivados com adição simultânea de ANWS a 300 µg/mL e LPS (100 ng/mL), curiosamente, a secreção de IL-1β diminuiu quando comparada ao LPS sozinho, também indicando um efeito antinflamatório da ANWS isolada do pimentão nesta concentração. Este comportamento não foi possível de ser observado com as frações polissacarídicas testadas neste trabalho.

Como era esperado o LPS (500 ng/mL) foi um potente estimulador da secreção nas duas citocinas testadas o que corrobora com trabalhos anteriores. Assim também, diferenças estruturais entre as frações polissacarídicas testadas puderam induzir efeitos diferentes nas células imunes.

Com relação às diferenças estruturais entre as seis frações estudadas neste trabalho trazemos um gráfico comparativo (Figura 16) entre a composição monossacarídica de cada uma delas com uma visualização facilitada.

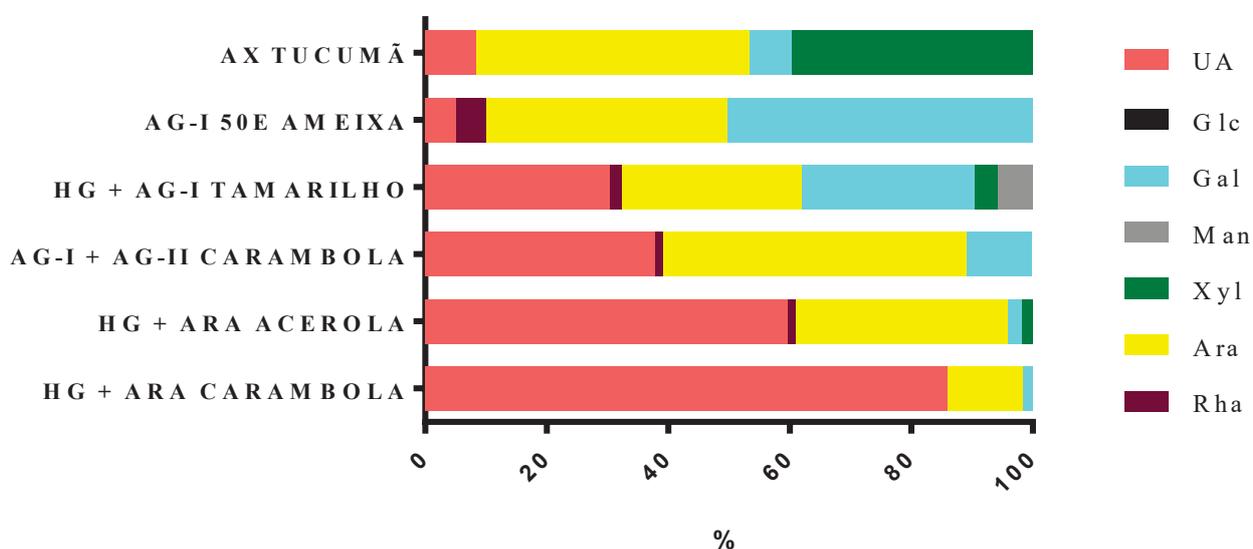


FIGURA 16 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES AX TUCUMÃ, AG-I

50E AMEIXA, HG + AG-I TAMARILHO, AG-I + AG-II CARAMBOLA, HG + Ara ACEROLA, HG + Ara CARAMBOLA e AG-I + AG-II CARAMBOLA. UA: URONIC ACIDS, GLC: GLUCOSE, GAL: GALACTOSE, MAN: MANNOSE, XYL: XYLOSE, ARA: ARABINOSE, RHA: RHAMNOSE.

A primeira fração representada, AX TUCUMÃ, é uma Arabinoxilana composta por 45,1% de arabinose, 39,7% de xilose, 8,3% de ácidos urônicos (D-Ácido glucurônico) e 6,9% de Galactose (CANTU-JUNGLES *et al.*, 2017).

A fração AG-I 50E AMEIXA é uma Arabinogalactana do tipo I que apresenta em sua composição 50,3% de galactose, 39,6% de arabinose, 5,1% de rhamnose e 5% de ácidos urônicos (D-Ácido galacturônico) (CANTU-JUNGLES *et al.*, 2014).

A fração HG + AG-I TAMARILHO contém uma Homogalacturonana metilesterificada (DE= 71%) com ramnogalacturonana ramificada com arabinogalactana do tipo I é composta pelas seguintes monossacarídeos: 30,4% de ácidos urônicos (D-Ácido galacturônico), 29,6% de arabinose, 28,5% de galactose, 5,8% de manose e 3,8% de xilose (DO NASCIMENTO *et al.*, 2015).

A fração AG-I + AG-II CARAMBOLA é uma Arabinogalactana do tipo I com arabinogalactana do tipo II e apresenta em sua composição 49,8% de arabinose, 37,8% de ácidos urônicos (D-Ácido galacturônico) e 10,9% de galactose (LEIVAS *et al.*, 2016).

A fração HG + ARA ACEROLA é uma Homogalacturonana metilesterificada (DE = 86%) e ramificada com arabinana composta por 59,6% de ácidos urônicos (D-Ácido galacturônico), 35% de arabinose, 2,2% de galactose, 1,9% e xilose e 1,3% de ramnose (KLOSTERHOFF *et al.*, 2018).

E finalmente a fração HG + ARA CARAMBOLA é uma Homogalacturonana desesterificada com arabinana composta por 86% de ácidos urônicos (D-Ácido galacturônico), 12,3% de arabinose e 1,7% de galactose (LEIVAS, IACOMINI e CORDEIRO, 2015).

A presença acentuada de cargas negativas (86% de D-Ácido galacturônico) na fração HG + ARA CARAMBOLA ou a ausência de alto teor de metilesterificação em comparação com a fração HG + ARA ACEROLA pode ser responsável pela diferença dos resultados entre as duas estruturas com relação à secreção de IL1- β na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$, onde a primeira causou inibição e a segunda um estímulo na secreção desta citocina. Esse perfil também foi observado para a quantificação da IL-10, onde a primeira fração não causou incremento em nenhuma das

concentrações, e contrariamente a segunda fração estimulou a secreção de IL-10 de maneira dose dependente nas concentrações de 50 e 200 µg/mL.

Do Nascimento e colaboradores (2017) observaram que a pectina do pimentão composta principalmente por homogalacturonana altamente metilesterificada contendo porções de ramnogalacturonana com cadeias laterais de arabinogalactanas induziu o aumento da secreção de TNF- α , IL-1 β e IL-10 por macrófagos THP-1, mas apenas na concentração mais alta empregada (300 µg/mL). Porém, a remoção das cadeias laterais da pectina através de uma hidrólise ácida parcial induziu apenas o aumento da secreção de IL-1 β .

A presença de uma estrutura de AG-II (arabinogalactana do tipo II) associada a uma AG-I (tipo I) na fração AG-I + AG-II CARAMBOLA demonstrou um padrão de atividade reduzido em quase todos os ensaios, com exceção do MTT, quando comparado a uma estrutura isolada de AG-I 50E AMEIXA e este perfil pode estar relacionado à massa molecular, composição monossacarídica, configuração, posição das ligações glicosídicas e até da conformação.

Contrariamente, Wang, Luo e Zha (2010) verificaram que a presença de cadeias laterais na pectina do caule de *Dendrobium nobile* foi importante para a indução da proliferação de linfócitos T e B. Além disso, Zhang e colaboradores (2012) relataram que as cadeias laterais de arabinogalactana do tipo II são essenciais para estimular a secreção de óxido nítrico e a proliferação de linfócitos, enquanto a região ramificada da pectina de *Bupleurum falcatum* poderia ser responsável pelo aumento da secreção de citocinas por células B (GUO *et al.*, 2000) e atividade mitogênica (SAKURAI *et al.*, 1999).

Modificações estruturais podem também induzir diferentes interações do polissacarídeo com receptores da superfície celular e, conseqüentemente, diferenças na ativação das cascatas de sinalização como demonstrado em uma revisão recente (ZHANG *et al.*, 2016). A interação entre polissacarídeos e receptor de *Toll-like* (TLR)-4/MD-2 pode ocorrer através de formação de complexos receptores-polissacarídeos, onde o polissacarídeo deve estar presente em uma concentração adequada, e os polissacarídeos ramificados poderiam induzir a dimerização de poli-TLR4/MD-2 mais facilmente do que polissacarídeos lineares.

Vogt e colaboradores (2016) demonstraram que a ativação de receptores de TLR é influenciada pelo grau de metilesterificação (DM) de pectinas. Eles constataram que quanto maior o DM, maior a ativação de NF- κ B/AP-1 mediada por TLR em células THP-1 e isso foi importante principalmente para a ativação de TLR2. Além disso, Chen e colaboradores (2006) verificaram que o DM de pectinas é importante para um aumento da expressão das enzimas óxido nítrico sintase e ciclooxygenase-2 em macrófagos ativados por LPS, onde as pectinas altamente metilesterificadas foram as mais ativas.

O grau de metilesterificação também pode estar relacionado com as diferenças observadas para a secreção de citocinas por macrófagos THP-1 induzida pelas pectinas do pimentão após hidrólise ácida parcial mencionada acima (DO NASCIMENTO *et al.*, 2017). Em contraste, a desesterificação e deacetilação da pectina da casca de cacau (*T. cacao*) levaram a uma maior capacidade intrínseca para estimular a secreção de TNF- α , IL-12 e IL-10 por macrófagos peritoneais de camundongos do que o polímero nativo (AMORIM *et al.*, 2016).

Freysdottir *et al.* (2016) observaram que um polissacarídeo péctico de *Achillea millefolium* não estimulou a secreção de citocinas pelos monócitos THP-1 (exceto IL-1ra), mas a concentração mais alta avaliada foi de 100 $\mu\text{g/mL}$. Entretanto, a 200 $\mu\text{g/mL}$, uma pectina parcialmente desacetilada e desesterificada de cascas de vagem de cacau (*Theobroma cacao*) aumentou substancialmente os níveis de citocinas TNF- α , IL-12 e IL-10 em relação aos macrófagos peritoneais de camundongos não tratados (Amorim *et al.*, 2016). Isso pode demonstrar que a concentração é um fator importante que deve ser avaliado em estudos celulares.

Para os ensaios de quantificação dos níveis de citocina utilizamos tratamento simultâneo dos polissacarídeos e LPS, os polissacarídeos foram adicionados às células juntamente com o LPS porque, recentemente, Nascimento e colaboradores (2017) demonstraram um efeito duplo para a pectina do pimentão. Esta pectina a 300 $\mu\text{g/mL}$ pode atenuar a resposta inflamatória induzida por LPS, reduzindo a produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β , aumentando a citocina antiinflamatória IL-10 indicando um efeito antiinflamatório da pectina nesta concentração. Além disso, esse comportamento duplo na produção de citocinas por uma fração contendo uma arabinogalactana de tipo II extraída de frutos de jambo igualmente foi observada (TAMIELLO *et al.*, 2017). Mas para as frações estudadas neste trabalho esse efeito atenuante encontrado nos trabalhos citados acima não ocorreu para nenhuma das amostras testadas, inclusive, houve um efeito somatório de algumas frações polissacarídicas e LPS simultâneos para a maior concentração testada como é possível verificar nas figuras 14 e 15.

6. CONCLUSÃO

Os efeitos das diferentes estruturas polissacarídicas observados sobre os macrófagos THP-1 permitem elaborar as seguintes conclusões:

Os tratamentos com as frações HG+AG-I Tamarilho e AG-I Ameixa, em altas concentrações a partir de 200 $\mu\text{g/mL}$ e de 400 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, diminuíram significativamente a viabilidade celular de macrófagos em relação ao controle pelo método do MTT e assim sendo, as concentrações definidas para os demais ensaios foram 10, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$

para HG+AG-I Tamarilho e 10, 50 e 200 µg/mL para as demais, mesmo que nos outros ensaios de viabilidade como o Vermelho neutro e o Cristal violeta essa condição não ter sido observada.

Com relação à indução de aumento dos níveis de ânion superóxido pelas amostras polissacarídicas, observamos de forma geral, que todas as frações provocaram um expressivo aumento nos níveis deste radical livre. Com exceção das frações HG+Ara Acerola e AX Tucumã, para todas as demais frações a relação foi inversamente proporcional, ou seja, quanto maior a concentração das amostras menor foi o nível do ânion superóxido observado. Concluímos que as frações testadas apresentaram um grande potencial estimulador da liberação de ânion superóxido, incrementando o *burst* oxidativo, sugerindo uma ativação do complexo NADPH oxidase e esta, por sua vez está diretamente relacionada a execução da atividade microbicida através da despolarização da membrana.

Em contraste ao descrito acima, observamos um baixo potencial de estímulo na fagocitose pelos macrófagos THP-1, pois somente encontramos esse efeito de ativação para as concentrações de 10 e 50 µg/mL para a fração HG+AGI Tamarilho com um incremento de 41,2% e 23,4% respectivamente, talvez pela presença de manose em sua composição. A segunda fração com um incremento expressivo de 60% na menor dosagem de 10 µg/mL foi HG+Ara Carambola.

Quando comparamos os perfis de secreção das citocinas IL-10 e IL1-β das quatro frações testadas observamos que, com exceção da fração HG+Ara Carambola, nas outras três frações o incremento para IL-10 apareceu nas dosagens de 50 e 200 µg/mL e que para IL1-β, com exceção da fração HG+Ara Acerola que apresentou resultado inverso, ou seja, o efeito de indução foi observado na menor concentração (10 µg/mL), as outras somente na maior concentração (200 µg/mL) apresentaram um incremento de IL1-β.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. Immunologia celular e molecular. 3 ed. Rio de Janeiro: **Revinter**, 2000. 468p.

ABBAS, A. K; LICHTMAN, A. H. PILLAI S. **Imunologia básica: funções e distúrbios do sistema imunológico**. 2. ed. Rio de Janeiro: Saunders Elsevier, 2008.

ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A. G.; O'NEILL, M. A.; SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A. G. J. An hypothesis: the same six polysaccharides are components of the primary cell walls of all higher plants. **Progress in biotechnology**, v. 14, p. 47-55, 1996.

ALBUQUERQUE, P.; COELHO, L. C.; TEIXEIRA, J. A.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G. Approaches in biotechnological applications of natural polymers. **AIMS Molecular Science**, v. 3, n. 3, p. 386-425, 2016.

AMARAL, A. E. Avaliação dos efeitos de complexos polissacarídeos oxovanádio (IV/V) sobre macrófagos peritoneais de camundongos e *Leishmania in vitro*. Trabalho de Dissertação de Mestrado em Ciências (Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

AMORIM, J. C.; VRIESMANN, L. C.; PETKOWICZ, C. L. O.; MARTINEZ, G. R.; NOLETO, G. R. Modified pectin from *Theobroma cacao* induces potent pro-inflammatory activity in murine peritoneal macrophage. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, n. Supplement C, p. 1040-1048, 2016.

ANDO, I.; TSUKUMO, Y.; WAKABAYASHI, T.; AKASHI, S.; MIYAKE, K.; KATAOKA, T.; NAGAI, K. Safflower polysaccharides activate the transcription factor NF- κ B via toll-like receptor 4 and induce cytokine production by macrophages. **Int. Immunopharm.**, v.211, p. 55–62, 2002.

ANDOH, A.; BAMBA, T.; SASAKI, M. Physiological and anti-inflammatory roles of dietary fiber and butyrate in intestinal functions. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 23, n. 5 suppl, p. S70-S73, 1999.

APPELBERG, R. (2005). As células Fagocíticas. In C. Avevedo. **Biologia Celular e molecular**. Lisboa, LIDEL:pp. 491-502.

ASPINALL, G. O. Carbohydrate polymers of plant cell walls. In: LOEWUS, F. (Ed.). **Biogenesis of Plant Cell Wall Polysaccharides**. New York: Academic Press, 1973. p.95-115.

ASPINALL, G. O. Chemistry of cell wall polysaccharides. In: STUMPF, P. K. e CONN, E. E. (Ed.). **The Biochemistry of Plants**. New York: Academic Press, v.3, 1980. p.473-500.

BABIOR, B. M. Oxygen-dependent microbial Killing by phagocytes. **N Engl J Med**.298, 659-68.

B, B., WEVERS, A., JUGERT, F., MERK, H., & MAHRLE, G..**Colorimetric growth assay for epidermal cell cultures by their crystal violet binding capacity ***, (1989)487–488.

BELARDELLI, F.; FERRANTINI, M. Cytokines as a link between innate and adaptive antitumor immunity. **TRENDS in Immunol.**, v.23, p.201-208, 2002.

BLEICHER, P.; MACKIN, W.; BETAFECTIN, P. G. G. β -glucan: a novel carbohydrate immunomodulator with anti-infective properties. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v.37, p.143–166, 1995.

BROWNLEE, I. A. The physiological roles of dietary fibre. **Food Hydrocolloids**, v. 25 p. 238-250, 2011.

BURKE, B.; LEWIS, C. E. **The Macrophage**. 2 ed. New York: Oxford University Press, 2002.

BURTON, R. A.; GIDLEY, M. J.; FINCHER, G. B. Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls. **Nature Chemical Biology**, v. 6, n. 10, p. 724-732, 2010.

CANTU-JUNGLES, T. M.; IACOMINI, M.; CIPRIANI, T. R.; CORDEIRO, L. M. C. Structural diversity of alkali-soluble polysaccharides from the fruit cell walls of tucumã (*Astrocaryum aculeatum*), a commelinid monocotyledon from the family Areaceae. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 118, n. Supplement C, p. 356-361, 2017.

CANTU-JUNGLES, T. M.; MARIA-FERREIRA, D.; DA SILVA, L. M.; BAGGIO, C. H.; WERNER, M. F. D. P.; IACOMINI, M.; CIPRIANI, T. R.; CORDEIRO, L. M. C. Polysaccharides from prunes: Gastroprotective activity and structural elucidation of bioactive pectins. **Food Chemistry**, v. 146, n. Supplement C, p. 492-499, 2014.

CARPITA, N. C.; GIBEAUT, D. M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **The Plant Journal**, v. 3, n. 1, p. 1-30, 1993.

CARPITA, N.; McCANN, M. The cell wall. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (Ed.). *Biochemistry and Molecular Biology of plants*. American Society of Plant Physiologists, p. 52-108, 2000.

CHANPUT, W.; MES, J. J.; WICHERS, H. J. THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. **International Immunopharmacology**, v. 23, n. 1, p. 37-45, 2014.

CHANPUT, W.; MES, J.; VREEBURG, R. A. M.; SAVELKOUL, H. F. J.; WICHERS, H. J. Transcription profiles of LPS-stimulated THP-1 monocytes and macrophages: a tool to study inflammation modulating effects of food-derived compounds. **Food & Function**, v. 1, n. 3, p. 254-261, 2010.

CHEN, C.-H.; SHEU, M.-T.; CHEN, T.-F.; WANG, Y.-C.; HOU, W.-C.; LIU, D.-Z.; CHUNG, T.-C.; LIANG, Y.-C. Suppression of endotoxin-induced proinflammatory responses by citrus

pectin through blocking LPS signaling pathways. **Biochemical Pharmacology**, v. 72, n. 8, p. 1001-1009, 2006.

CHIBA, K.; KAWAKAMI, K.; TOHYAMA, K. Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. **Toxicology in Vitro**, v.12, p.251- 258,1998.

CLARKE, A. E.; ANDERSON, R. L.; STONE, B. A. Form and function of arabinogalactans and arabinogalactan-proteins. **Phytochemistry**, v. 18, n. 4, p. 521-540, 1979.

COMMINS, P.; BORISH, L.; STEINKE, J. W. Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines. **J. Immunol.**, v. 125, p. 53-72, 2010.

COSTA, L. S.; FIDELIS, G. P.; CORDEIRO, S. L.; OLIVEIRA, R. M.; SABRY, D. A.; CÂMARA, R. B. G.; NOBRE, L. T. D. B.; COSTA, M. S. S. P.; ALMEIDA-LIMA, J.; FARIAS, E. H. C; LEITE, E. L.; ROCHA, H. A. O. Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. **Biom. & Pharmac.**, v. 64, p. 21-28, 2010.

COUPER, K. N.; BOUNT, D. G.; RULEY, E. M. IL10: the master regulator of immunity to infection. **The Journal Immunology**. V. 180, p. 5771-5777, 2008.

COURTS, F. L. Profiling of modified citrus pectin oligosaccharide transport across Caco-2 cell monolayers. **Pharma Nutrition**, v. 1, n. 1, p. 22-31, 2013.

CROSS, A. R.; SEGAL, A. W. The NADPH oxidase of professional phagocytes-prototype of the NOX electron transport chain systems. **Bioch. Bioph. Acta.**, v. 1657, p. 1-22, 2004.

D. B., DE, C., REPETTO, G., PESO, A., ZURITA, J. L. SEVILLA, E.-. **Toxicology, A., Molecular**, (2014). **Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity**, (June 2008), 1125–1131.

DE LA TORRE, E.; GENARO, A. M.; RIBEIRO, M. L., *et al.*(2008). Proliferative actions of muscarinic receptors expressed in macrophages derived from normal and tumor bearing mice. **Biochimica et Biophysica**, pp. 82-89.

DEY, P. M.; BROWNLEADER, M. D.; HARBORNE, J.B. The plant, the cell and its molecular components. In: DEY, P.M.; HARBORNE, J. B. (Eds.). *Plant Biochemistry*. Bristol: Academic Press, p. 6-9, 1997.

DO NASCIMENTO, G. E.; CORSO, C. R.; DE PAULA WERNER, M. F.; BAGGIO, C. H.; IACOMINI, M.; CORDEIRO, L. M. C. Structure of an arabinogalactan from the edible tropical

fruit tamarillo (*Solanum betaceum*) and its antinociceptive activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 116, n. Supplement C, p. 300-306, 2015.

DO NASCIMENTO, G. E.; WINNISCHOFER, S. M. B.; RAMIREZ, M. I.; IACOMINI, M.; CORDEIRO, L. M. C. The influence of sweet pepper pectin structural characteristics on cytokine secretion by THP-1 macrophages. **Food Research International**, v. 102, n. Supplement C, p. 588-594, 2017.

EBRINGEROVÁ, A.; HROMÁDKOVÁ, Z. Xylans of industrial and biomedical importance. **Biotechnology and genetic engineering reviews**, v. 16, n. 1, p. 325-346, 1999.

ELOMAA, O.; SANKALA, M.; PIKKARAINEN, T., *et al.* (1998). Structure of the Human Macrophage MARCO Receptor and Characterization of Its Bacteria-binding Region. **The journal of biological chemistry** 273, pp. 4530-4538.

EZEKOWITZ, R. E GORDON, S. (2006). Interaction and regulation of macrophage receptors. In D. Evered e Nugent, J. Biochemistry of macrophages. London:pp. 127-136.

FINCHER, G.B; BRUCE, A.S. Arabinogalact an-proteins: Structure, Biosynthesis, and Function. **Ann. Rev. Plant Physiol.** V.34, p. 47-70, 1983.

FREYSDOTTIR, J.; LOGADOTTIR O.T.; OMARSDOTTIR, S.S.; VIKINGSSON, A.; HARDARDOTTIR, I. A polysaccharide fraction from *Achillea millefolium* increases cytokine secretion and reduces activation of AKt, ERK and NF-kB in THP-1 monocytes. **Carbohydrate Polymers**, v. 143, p. 131-138, 2016.

GAMAL-ELDEEN, A. M.; AMER, H.; HELMY, W. A.; TALAAT, R. M.; RAGAB H. Chemically-modified polysaccharide extract derived from *Leucaena leucocephala* alters Raw 264.7 murine macrophage functions. **Int. Immunopharm.**, v.7, p.871–878, 2007.

GARCIA, J. L.; LEHOCKY, M.; HUMPOLICEK, P.; SAHA, P. HaCaT Keratinocytes Response on Antimicrobial Atelocollagen Substrates : Extent of Cytotoxicity , Cell Viability and Proliferation. **J. Funct. Biomater**, v., 5, p.43-57,2014.

GEISSMANN, F.; MANZ, M. G.; JUNG, S., *et al.* (2010). Development of monocytes, macrophages and dendritic cells. **Science**, 327 (5966), pp. 656-661.

GORDON, S.; TAYLOR, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nat. Rev. Immun.**, v. 5, p. 953-964, 2005.

GUO, Y.; MATSUMOTO, T.; KIKUCHI, Y.; IKEJIMA, T.; WANG, B.; YAMADA, H. Effects of a pectic polysaccharide from a medicinal herb, the roots of *Bupleurum falcatum* L. on interleukin 6 production of murine B cells and B cell lines. **Immunopharmacology**, v. 49, n. 3, p. 307-316, 2000.

HALLIWELL, B. Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide? **Trends Biochem. Sci.**, v. 3, p.509-515, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals Biol. & Med.**, 4 ed. New York: Oxford, 2007.

HAMILTON, J.A.; ANDERSON, G. P. GM-CSF biology. **Growth Factors**, v.22, p.225–31, 2004.

HAN, J.-Y. Structural characteristics of arabinoxylan in barley, malt, and beer. **Food Chemistry**, v. 70, n. 2, p. 131-138, 2000.

HAN, S.B.; YOON, Y.D.; AHN, H.J.; LEE, H.S.; LEE, C.W.; YOON, W.K. PARKA, S.K.; KIM, H. M. Toll-like receptor-mediated activation of B cells and macrophages by polysaccharide isolated from cell culture of *Acanthopanaxsenticosus*. **Int. Immunopharm.**, v. 3, p.1301– 12, 2003.

HONG, F.; YAN, J.; BARAN, J. T.; ALLENDORF, D. J.; HANSEN, R. D.; OSTROFF, G. R.; XING, P. X.; CHEUNG, N.-K. V.; ROSS, G. D. Mechanism by which orally administered β -1,3-glucans enhance the tumoricidal activity of antitumor monoclonal antibodies in murine tumor models. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 2, p. 797-806, 2004.

HSU, H.Y.; HUA, K.F.; LIN, C.C.; LIN, C.H.; HSU, J.; WONG, C.H. Extract of reishi polysaccharides induces cytokine expression via TLR4-modulated protein kinase signaling pathways. **J. Immunol.**, v.173, p.5989 –5999, 2004.

IZYDORCZYK, M. S.; MACRI, L. J.; MACGREGOR, A. W. Structure and physicochemical properties of barley non-starch polysaccharides - I. Water-extractable β -glucans and arabinoxylans. **Carbohydrate Polymers**, v. 35, n. 3, p. 249-258, 1998.

JANEWAY, C. A. J. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. **Immunol. Today.**, v.13, p. 11–16, 1992.

JUNG, K.; HA, Y.; HA, S. K.; HAN, D.U.; KIM, D. W.; MOON, W. K.; CHAE, C. Antiviral effect of *Saccharomyces cerevisiae* β -glucan to swine influenza virus by increased production of

interferon-gamma and nitric oxide. **J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public. Health.**, v. 51, p. 72-76, 2004.

KANGUSSU MARCOLINO, M. M. Avaliação de atividade leishmanicida IN VITRO de heteropolissacarídeos ácidos: não sulfatados e naturalmente sulfatados. Trabalho de Dissertação de Mestrado em Ciências (Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

KHAN, M. M. Role of cytokines. In: **Immunopharmacology**. Editora Springer Science, p. 33-59, 2008.

KLOSTERHOFF, R. R.; BARK, J. M.; GLÄNZEL, N. M.; IACOMINI, M.; MARTINEZ, G. R.; WINNISCHOFER, S. M. B.; CORDEIRO, L. M. C. Structure and intracellular antioxidant activity of pectic polysaccharide from acerola (*Malpighia emarginata*). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, n. Supplement C, p. 473-480, 2018.

LANDBERG, R. Dietary fiber and mortality: convincing observations that call for mechanistic investigations. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 96, n. 1, p. 3-4, 2012.

LEE, K.Y.; YOU, H.J.; JEONG, H.G.; KANG, J.S.; KIM, H.M.; RHEE, S.D. Polysaccharide isolated from *Poriacocossclerotium* induces NF- κ B/Rel activation and iNOS expression through the activation of p38 kinase in murine macrophages. **Int. Immunopharm.**, v. 4, p. 1029–1038, 2004.

LEIVAS, C. L.; IACOMINI, M.; CORDEIRO, L. M. C. Structural characterization of a rhamnogalacturonan I-arabinan-type I arabinogalactan macromolecule from starfruit (*Averrhoa carambola* L.). **Carbohydrate Polymers**, v. 121, n. Supplement C, p. 224-230, 2015.

LEIVAS, C. L.; NASCIMENTO, L. F.; BARROS, W. M.; SANTOS, A. R. S.; IACOMINI, M.; CORDEIRO, L. M. C. Substituted galacturonan from starfruit: Chemical structure and antinociceptive and anti-inflammatory effects. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 84, n. Supplement C, p. 295-300, 2016.

LEUNG, M.Y.K.; LIU, C.; KOON, J.C.M.; FUNG, K.P. Polysaccharide biological response modifiers. **Immunol. Letters**, v. 105, p. 101-114, 2006.

LEUNG, M.Y.K.; LIU, C.; ZHU, L.F.; HUI, Y.Z.; YU, B.; FUNG, K.P. Chemical and biological characterization of a polysaccharide biological response modifier from *Aloe vera* L. var. *chinensis* (Haw.) Berg. **Glycobiology**, v. 14, p. 501-510, 2004.

LOQUÉ, D.; SCHELLER, H. V.; PAULY, M. Engineering of plant cell walls for enhanced biofuel production. **Current opinion in plant biology**, v. 25, p. 151-161, 2015.

LV, X.; CHEN, D.; YANG, L.; ZHU, N.; LI, J.; ZHAO, J.; HU, Z.; WANG, F.-J.; ZHANG, L. W. Comparative studies on the immunoregulatory effects of three polysaccharides using high content imaging system. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, p. 28-42, 2016.

MADHAVI, N.; DAS, U. N.; PRABHA, P. S.; KUMAR, G. S.; KORATKAR, R.; SAGAR, P. S. Suppression of human T-cell growth in vitro by cis-unsaturated fatty acids: relationship to free radicals and lipid peroxidation. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 51, n. 1, p. 33-40 1994.

MCDOLE, J. R.; WHEELER, L. W.; MCDONALD, K. G.; WANG, B.; KONJUFCA, V.; KNOOP, K. A.; NEWBERRY, R. D.; MILLER, M. J. Goblet cells deliver luminal antigen to CD103⁺ dendritic cells in the small intestine. **Nature**, v. 483, n. 7389, p. 345-349, 2012.

MCNEIL, M.; DARVILL, A. G.; FRY, S. C.; ALBERSHEIM, P. Structure and Function of the Primary Cell Walls of Plants. **Annual Review of Biochemistry**, v. 53, n. 1, p. 625-663, 1984.

MEIJER, K.; DE VOS, P.; PRIEBE, M. G. Butyrate and other short-chain fatty acids as modulators of immunity: what relevance for health?. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 13, n. 6, p. 715-721, 2010.

MOHNEN, D. Pectin structure and biosynthesis. **Current opinion in plant biology**, v. 11, n. 3, p. 266-277, 2008.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay of cellular growth and survival: application to proliferate and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 65, p. 55-63, 1983.

MUDGIL, D.; BARAK, S. Composition, properties and health benefits of indigestible carbohydrate polymers as dietary fiber: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 61, p. 1-6, 2013.

MURPHY, K.; TRAVERS, P; WALPORT, M. **Imunobiologia de Janeway**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

NOLETO, G. R.; MERCÊ, A. L. R.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J.; THOMAZSOCCOL, V.; OLIVEIRA, M. B. M. Effects of a lichen galactomannan and its vanadyl (IV) complex on peritoneal macrophages and leishmanicidal activity. **Mol. and Cel. Bioch.**, v. 233, p. 73-83, 2002.

OCHOA-VILLARREAL, M.; ARISPURO-HERNÁNDEZ, E.; VARGAS-ARISPURO, I.; MARTÍNEZ-TÉLLEZ, M. Á. **Plant cell wall polymers: function, structure and biological activity of their derivatives**, 2012.

OUYANG, W.; RUTZ, S.; CRELLIN, N. K.; VALDEZ, P. A.; HYMOWITZ, S. G. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. **Annu. Rev. Immunol.**, v.29, p.71–109, 2011.

PACHECO, F. C. E CARDOSO, E. M. (2012). Imunidade inata e inflamação. In F. A. Arosa; Cardoso, E. M. e Pacheco, F. C. **Fundamentos de imunologia**. Lisboa, LIDEL:pp. 57-102.

PAULSEN, B. S. Plant polysaccharides with immunostimulatory activities. **Curr. Org. Chem.**, v. 5, p. 939–50, 2001.

PÉREZ, S; MAZEAU, K.; du PENHOAT, C. H. The three-dimensional structures of the pectic polysaccharides. **Plant. Physiol. and Bioch.**, v. 38, p. 37-55, 2000.

PETERS, C.; AEBISCHER, T.; STIERHOF, Y., *et al.* (2005). The role of macrophage receptors in adhesion and uptake of *Leishmania mexicana* amastigotes. **Journal of Cell Science** 108, pp. 3715-3724.

PIPE, R. K.; COLES, J. A.; FARLEY, S. R. Assays for measuring immune response in the mussel *Mytilus edulis*. . In: J. S. STOLEN; T. C. FLETCHER, *et al* (Ed.). **Techniques in Fish Immunology - 4. Immunology and Pathology of Aquatic Invertebrates**. Fair Haven: SOS Publications, 1995. p.93-100.

PONCE, N. M.; PUJOL, C. A.; DAMONTE, E. B.; FLORES, M. L.; STORTZ, C. A. Fucoidans from the brown seaweed *Adenocystisutricularis*: extraction methods, antiviral activity and structural studies. **Carbohydr. Res.**, v. 338, p. 153-165, 2003.

POUTSIAKA, D. D.; MENGOZZI, M.; VANNIER, E.; SINHA, B.; DINARELLO, C. A. Cross-linking of the beta-glucan receptor on human monocytes results in interleukin-1 receptor antagonist but not interleukin-1 production. **Blood**, v.82, p.3695–36700, 1993.

PUGH, N.; ROSS S.A.; ELSOHLY, H. N.; ELSOHLY, M. A.; PASCO, D.S. Isolation of three high molecular weight polysaccharide preparations with potent immunostimulatory activity from *Spirulina platensis*, *Aphanizomenonflos-aquae* and *Chlorella pyrenoidosa*. **Planta Med.**, v. 67, p.737– 742, 2001.

RAYBIOTECH. Disponível em <<http://www.raybiotech.com/index.asp?m=1>>.

REEVES, E. P.; LU, H.; JACOBS, H. L.; MESSINA, C. G. M.; BOLSOVER, S.; GABELLAK, G.; POTMA, E. O.; WARLEY, A.; ROES, J.; SEGAL, A. W. Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux. **Nature**, v.416, p. 291-297, 2002.

REILLY, T. P.; BELLEVUE III, F. H.; WOSTER, P. M.; SVENSSON, C. K. Comparison of the in vitro cytotoxicity of hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone. **Biochemical Pharmacology**, v. 55, n. 6, p. 803-810, 1998.

RIDLEY, B. L.; O'NEILL, M. A.; MOHNEN, D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. **Phytochemistry**, v. 57, n. 6, p. 929-967, 2001.

ROLIN, C. Pectin. In: WHISTLER, R. L. B., J. N. (Ed.). **Industrial Gums**. San Diego: Academic Press, 1993. cap. 10, p.257-293.

ROOS, D.; WINTERBOURN, C. C. Lethal weapons. **Science**, v.296, p.669–671, 2002.

ROSÁRIO, M. M. T.; NOLETO, G. R.; BENTO, J. F.; REICHER, F.; OLIVEIRA, M. B. M.; PETKOWICZ, C. L. O. Effect of storage xyloglucans on peritoneal macrophages. **Phytochemistry**, v. 69, p. 464–472, 2008.

ROSÁRIO, M. M. T.; KANGUSSU MARCOLINO, M. M.; AMARAL, A. E.; NOLETO, G. R.; PETKOWICZ C. L. O. Storage xyloglucans: potent macrophages activators. **Chemico-Biol. Interact.**, v.189, p.127–133, 2011.

SABAT, R.; GRÜTZ, G.; WARSZAWSKA, K.; KIRSCH, S.; WITTE, E.; WOLK, K.; GEGINAT J. Biology of interleukin-10. **Cytokine & Growth Fac. Rev.**, v.21, p.331–344, 2010.

SAKURAI, M. H.; MATSUMOTO, T.; KIYOHARA, H.; YAMADA, H. B-cell proliferation activity of pectic polysaccharide from a medicinal herb, the roots of *Bupleurum fal-catum L.* and its structural requirement. **Immunology**, v. 97, n. 3, p. 540–547, 1999.

SASAKI, H.; KOBAYASHI, M.; POLLARD, R. B.; SUZUKI, F. Effects of Z-100, a *Mycobacterium-tuberculosis*-derived arabinomanan on the LP-BM5 murine leukemia virus infection in mice. **Pathobiology**, v. 69, p. 96-103, 2001.

SHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Plant Biology**, v. 61, n. 1, p. 263, 2010.

SCHEPETKIN I. A.; FAULKNER C.L.; NELSON-OVERTON L.K.; WILEY J.A.; QUINN M. T. Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Juniperusscopolorum*. **Int. Immunopharm.**, v. 5, p.1783–1799, 2005.

SCHEPETKIN, A. I.; QUINN, M. T. Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. **Int. Immunopharm.**, v.6, p.317-333, 2006.

SCHEPETKIN, I.A.; XIE, G.; KIRPOTINA, L.N.; KLEIN, R.A.; JUTILA, M.A.; QUINN, M.T. Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Opuntia polyacantha*. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 8, p. 1455 – 1466, 2008.

SCHILLER, M.; METZE, D.; LUGER, T.A.; GRABBE, S.; GUNZER, M. Immune response modifiers – mode of action. **Exp. Dermatology**, v.15, p. 331–341, 2006.

SHARIF, O.; BOLSHAKOV, V. N.; RAINES, S.; NEWHAM, P.; PERKINS, N. D. Transcriptional profiling of the LPS induced NF- κ B response in macrophages. **BMC Immunology**, v. 8, n. 1, p. 1, 2007.

SUH, H.-J.; YANG, H.-S.; RA, K.-S.; NOH, D.-O.; KWON, K.-H.; HWANG, J.-H.; YU, K.-W. Peyer's patch-mediated intestinal immune system modulating activity of pectic-type polysaccharide from peel of *Citrus unshiu*. **Food Chemistry**, v. 138, n. 2, p. 1079-1086, 2013.

SHAO, B. M.; XU, W.; DAÍ, H.; TU, P.; LI, Z.; GAO, X. M. A study on the immune receptors for polysaccharides from the roots of *Astragalus membranaceus*, a chinese medicinal herb. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.320, p.1103–1111, 2004.

SHIN, J. Y.; SONG, J. Y.; YUN, Y. S.; YANG, H. O.; RHEE, D. K.; PYO, S. Immunostimulating effects of acidic polysaccharides extract of *Panax ginseng* on macrophage function. **Immunophar. Immunotox.**, v.24, p. 469–482, 2002.

STAHEL, P.F.; SMITH, W.R.; MOORE, E.E. Role of biological modifiers regulating the immune response after trauma. **Injury: Inter. J. Care Injured**, v. 38, p. 1409-1422, 2007.

STEPHEN, A. M. Other plant polysaccharides. In: ASPINALL, G. O. (Ed.). **The Polysaccharides**. Orlando: Academic Press, 1983. p.97-193.

SUH, H.-J.; YANG, H.-S.; RA, K.-S.; NOH, D.-O.; KWON, K.-H.; HWANG, J.-H.; YU, K.-W. Peyer's patch-mediated intestinal immune system modulating activity of pectic-type polysaccharide from peel of *Citrus unshiu*. **Food Chemistry**, v. 138, n. 2–3, p. 1079-1086, 2013.

TACKE, F.; RANDOLPH, G. J. Migratory fate differentiation of blood monocyte subsets. **Immunobiology**, v. 211, p 609 – 618, 2006.

TAKEDA, K. E AKIRA, S. (2005). Toll-like receptors in innate immunity. **International Immunology**, 17, pp. 1-14.

TAMIELLO, C. S.; DO NASCIMENTO, G. E.; IACOMINI, M.; CORDEIRO, L. M. C. Arabinogalactan from edible jambo fruit induces different responses on cytokine secretion by THP-1 macrophages in the absence and presence of proinflammatory stimulus. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2017.

TAYLOR, P. R.; MARTINEZ-POMAREZ, L.; STACEY, M.; LIN, H. H.; BROWN, G.D.; GORDON, S. Macrophage receptors and immune recognition. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 23, p. 901-944, 2005.

TSE, H. M.; MILTON, M. J.; PIGANELLI, J. D. Mechanistic analysis of the immunomodulatory effects of a catalytic antioxidant on antigen – presenting cells: implication for their use in targeting oxidation – reduction reactions in innate immunity. **Free Radical Biol. & Med.**, v. 36, p. 233 – 247, 2004.

TURUMTAY, H. Cell wall engineering by heterologous expression of cell wall-degrading enzymes for better conversion of lignocellulosic biomass into biofuels. **BioEnergy Research**, v. 8, n. 4, p. 1574-1588, 2015.

TZIANABOS, A. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function. **Clinical Microb. Rev.**, v.13, p. 523–533, 2000.

TZIANABOS, A.; WANG, J. Y.; KASPER, D. L. Biological chemistry of immunomodulation by zwitterionic polysaccharides. **Carbohydr. Res.**, v. 338, p.2531-2538,2003.

VEGA-AVILA, E.; & PUGSLEY, M. K. **An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells An Overview of Colorimetric Assay Methods Used to Assess Survival or Proliferation of Mammalian Cells**, (January). (2011).

VIERHUIS, E.; SCHOLS, H. A.; BELDMAN, G.; VORAGEN, A. G. J. Structural characterisation of xyloglucan and xylans present in olive fruit (*Olea europaea* cv koroneiki). **Carbohydrate polymers**, v. 44, n. 1, p. 51-62, 2001.

VIGNAIS, P. V. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. **Cel. Mol. Life Sci.**, v. 59, p. 1428–59, 2002.

VOGT, L. M.; SAHASRABUDHE, N. M.; RAMASAMY, U.; MEYER, D.; PULLENS, G.; FAAS, M. M.; VENEMA, K.; SCHOLS, H. A.; DE VOS, P. The impact of lemon pectin characteristics on TLR activation and T84 intestinal epithelial cell barrier function. **Journal of Functional Foods**, v. 22, n. Supplement C, p. 398-407, 2016.

VOS, A. P.; M'RABET, L.; STAHL, B.; BOEHM, G.; GARSSSEN, J. Immune-modulatory effects and potential working mechanisms of orally applied nondigestible carbohydrates. **Critical Review in Immunology**, v. 27, n. 2, p. 97-140, 2007.

WANG, J.-H.; LUO, J.-P.; ZHA, X.-Q. Structural features of a pectic polysaccharide from the stems of *Dendrobium nobile Lindl.* **Carbohydrate Polymers**, v. 81, n. 1, p. 1-7, 2010.

WILLATS, W. G. T.; KNOX, J. P.; MIKKELSEN, J. D. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 3, p. 97-104, 2006.

WISMAR, R.; BRIX, S.; FRØKLÆR, H.; LÆRKE, H. N. Dietary fibers as immunoregulatory compounds in health and disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1190, n. 1, p. 70-85, 2010.

WOLK, K.; KUNZ, S.; ASADULLAH, K.; SABAT, R. Cutting edge: immune cells as sources and targets of the IL-10 family members? **J. Immunol.**, v.168, p.5397-5402, 2002.

WU, G.-H.; LU, C.-L.; JIANG, J.-G.; LI, Z.-Y.; HUANG, Z.-L. Regulation effect of polysaccharides from *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) on the immune activity of mice macrophages. **Food & Function**, v. 5, n. 2, p. 337-344, 2014a.

XIE, G.; SCHEPETKIN, I. A.; QUINN, M. T. Immunomodulatory activity of acidic polysaccharides isolated from *Tanacetum vulgare* L. **Int. Immunopharm.**, v. 7, p. 1639–1650, 2007.

YANG, L.; ZHANG, L.-M. Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, n. 3, p. 349-361, 2009.

YAPO, B. M. Pectic substances: from simple pectic polysaccharides to complex pectins - A new hypothetical model. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 2, p. 373-385, 2011.

ZHANG, X.; LI, S.; SUN, L.; JI, L.; ZHU, J.; FAN, Y.; TAI, G.; ZHOU, Y. Further analysis of the structure and immunological activity of an RG-I type pectin from *Panax ginseng*. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 2, p. 519-525, 2012.

ZHANG, X.; QI, C.; GUO, Y.; ZHOU, W.; ZHANG, Y. Toll-like receptor 4-related immunostimulatory polysaccharides: Primary structure, activity relationships, and possible interaction models. **Carbohydrate Polymers**, v. 149, n. Supplement C, p. 186-206, 2016.