

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BIANCA BUSATO



RELAÇÃO ENTRE O GRAU DE ESTERIFICAÇÃO DE PREPARAÇÕES DE PECTINA DE
Brassica oleracea var. *italica* E SEU POTENCIAL IMUNOMODULADOR

CURITIBA

2023

BIANCA BUSATO

RELAÇÃO ENTRE O GRAU DE ESTERIFICAÇÃO DE PREPARAÇÕES DE PECTINA DE
Brassica oleracea var. *italica* E SEU POTENCIAL IMUNOMODULADOR

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, no Setor de Ciências Biológicas, na Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências-Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Guilhermina Rodrigues Noleto

Co-orientadora: Profa. Dra. Carmen Lucia de Oliveira Petkowicz

CURITIBA

2023

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Busato, Bianca, 1990-.

Relação entre o grau de esterilização de preparações de pectina de *Brassica oleracea* var. itálica e seu potencial imunomodulador. / Bianca Busato. – Curitiba, 2023.

1 recurso on-line : PDF.

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

Orientador: Prof.^a Dra. Guilhermina Rodrigues Noletto.

Coorientadora: Prof.^a Dra. Carmen Lucia de Oliveira Petkowicz.

1. Brassica. 2. Pectina. 3. Imunomodulação. 4. Macrófagos. I. Noletto, Guilhermina Rodrigues, 1966-. II. Petkowicz, Carmen Lúcia de Oliveira, 1963-. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica. IV. Título.

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **BIANCA BUSATO** intitulada: **RELAÇÃO ENTRE O GRAU DE ESTERIFICAÇÃO DE PREPARAÇÕES DE PECTINA DE *Brassica oleracea* var. *itálica* E SEU POTENCIAL IMUNOMODULADOR**, sob orientação da Profa. Dra. GUILHERMINA RODRIGUES NOLETO, 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 doutora 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 Março de 2023.

Assinatura Eletrônica

30/03/2023 10:27:47.0

GUILHERMINA RODRIGUES NOLETO

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

30/03/2023 10:29:42.0

FHERNANDA RIBEIRO SMIDERLE

Avaliador Externo (INSTITUTO PELÉ PEQUENO PRINCEPE)

Assinatura Eletrônica

30/03/2023 19:12:54.0

SELENE ELIFIO ESPOSITO

Avaliador Externo (PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO
PARANÁ - PUC/PR)

Assinatura Eletrônica

04/05/2023 11:03:23.0

GLAUCIA REGINA MARTINEZ

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

A meus sobrinhos,
que tornam minha caminhada muito mais leve

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me deu esta oportunidade e a saúde para chegar até o fim.

À minha orientadora, Profa. Dra. Guilhermina Rodrigues Noletto, por tantos anos de ensinamentos, pela confiança e por me auxiliar a concluir esse trabalho.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Carmen Lucia de Oliveira Petkowicz, pelas sugestões sempre assertivas, pela ajuda com os experimentos e com a escrita.

Aos membros da banca examinadora, Profa. Dra. Glaucia Regina Martinez, Prof. Dr. Rilton Alves de Freitas e Profa. Dra. Fhernanda Ribeiro Smiderle, pela disponibilidade e contribuição.

Às professoras Dra. Silvia Maria Suter Correia Cadena e Dra. Glaucia Regina Martinez pela correção do projeto, da pré-tese e dos relatórios, sempre com sugestões muito preciosas.

À professora Dra. Karin Braun Prado, pelo auxílio com o experimento no citômetro de fluxo, pelo carinho e por ter aceitado ficar algumas horas discutindo ideias e resultados até chegarmos a uma conclusão.

À professora Dra. Silvia Maria Suter Correia Cadena, pelo auxílio com a análise estatística.

Ao técnico Dr. Arquimedes Paixão de Santana Filho, por ter realizado o teste de contaminação por LPS da pectina alvo deste estudo.

À Beth e à Jainy, por serem as técnicas de laboratório mais sensacionais que poderíamos ter no grupo de Oxidações Biológicas.

Aos professores e técnicos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná, especialmente aos professores do grupo de Oxidações Biológicas, que me fizeram crescer e poder olhar para trás com orgulho do que construí.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, pelo apoio nos dias de experimento, mesmo em pequenas coisas, mas principalmente pelo apoio emocional, com ênfase nas últimas semanas de trabalho, quando me senti física e emocionalmente esgotada e obtive de imediato uma chuva de amor e compreensão. Gostaria de agradecer especialmente a: Elaine, que mesmo à distância esteve sempre presente, Lis, Ju Carvalho, Day, Ju Kulik, Viktor, André, Giulia e a todos que me ajudaram de forma direta ou indireta.

Aos meus pais, por terem tanto orgulho de mim e por vibrarem por minhas conquistas com entusiasmo. Vocês me ensinam diariamente o que é o amor.

Ao meu esposo, William, por ter me incentivado a adentrar o mestrado e seguir com o doutorado, abdicando de minha presença em diversos momentos e me dando auxílio com questões práticas do dia a dia para que eu pudesse concluir esse trabalho.

A toda a minha família pelo incentivo. Em especial à minha vovó Tereza, que hoje está saudável e pode compartilhar comigo deste e de outros momentos felizes. Que seja assim por muito tempo.

À UFPR, por me acolher desde a graduação e por ter feito parte da minha história. Minha vida foi transformada pela educação que aqui recebi.

Ao programa de pós-graduação em Ciências-Bioquímica da UFPR.

À agência financiadora Capes, por propiciar a realização deste trabalho.

Life is not easy for any of us. But what of that?
We must have perseverance and above all confidence in ourselves.
We must believe that we are gifted for something
and that this thing must be attained.

Marie Curie

RESUMO

A relação entre a atividade imunomoduladora de polissacarídeos e suas características estruturais é inequívoca, porém, ainda há muito que se compreender a esse respeito, a fim de ampliar a utilização desses biopolímeros em diversas áreas da medicina. O presente estudo teve como objetivo investigar o perfil imunomodulador de pectinas considerando o seu grau de metil-esterificação (DM). Uma pectina extraída de talos de brócolis (*Brassica oleracea* var. *italica*) (FB) previamente caracterizada por apresentar alto grau de metil-esterificação (56%) foi submetida a um procedimento de desesterificação. A pectina desesterificada (FB-LM) apresentou baixo grau de metil-esterificação (20,8%). FB-LM promoveu a ativação de macrófagos evidenciada por alterações na morfologia e aumento da atividade fagocítica. FB-LM aumentou a produção de óxido nítrico (NO) e IL-12 por macrófagos peritoneais de camundongos após tratamento *in vivo* (200 mg/kg por 5 dias), e de IL-1 β após tratamento *in vitro* com 100 e 200 μ g/mL por 48h. Por outro lado, FB-LM diminuiu a produção da interleucina anti-inflamatória IL-10 por macrófagos peritoneais após o tratamento *in vivo*. Análise por citometria de fluxo indicou que os macrófagos de camundongos tratados oralmente com FB e FB-LM possuem uma razão fenotípica M1/M2 (CD80⁺/CD206⁺) maior em comparação com o grupo controle. FB-LM estimulou a proliferação de linfócitos e a produção de IFN- γ por essas células, enquanto FB não aumentou os níveis da mesma citocina após o tratamento *in vivo*. O sobrenadante contendo IFN- γ de linfócitos de camundongos tratados oralmente com FB-LM aumentou a proliferação de células da medula óssea. De acordo com os resultados, FB-LM desencadeia uma resposta pró-inflamatória nas células imunes. Esses achados corroboram a hipótese de que pectinas com baixo DM exercem atividade pró-inflamatória, enquanto o efeito oposto é observado para pectinas com alto DM.

Palavras-chave: *Brassica oleracea* var. *italica*; pectina; desesterificação; efeitos imunomoduladores; macrófagos.

ABSTRACT

The relationship between the immunological action of polysaccharides and their structural features is unequivocal, however, there is still much to be understood in order to expand the use of these bipolymers in different medicine areas. The present study focused on the immunological modulation profile of pectins and their degree of methyl-esterification. A pectin extracted from broccoli stalks (*Brassica oleracea* var. *italica*) (FB) previously characterized to have a high degree of methyl-esterification (56%) was subjected to a de-esterification procedure. The de-esterified pectin (FB-LM) had a low degree of methyl-esterification (20.8%). FB-LM had improved ability of activation of macrophages by morphology alteration and phagocytic capacity. FB-LM increased the levels of nitric oxide (NO) and IL-12 by peritoneal macrophages of mice after in vivo treatment (200 mg/kg for 5 days), and of IL-1 β after in vitro treatment at 100 and 200 μ g/mL for 48h. FB-LM decreased levels of the anti-inflammatory interleukin IL-10 in peritoneal macrophages after in vivo treatment. Flow cytometry analysis indicated that macrophages from mice orally treated with native FB and FB-LM had a higher M1/M2 phenotypic CD80⁺/CD206⁺ ratio compared to the control group. FB-LM stimulated lymphocyte proliferation and its IFN- γ production, while FB did not increase levels of the same cytokine after the in vivo treatment. The IFN γ -containing supernatant of lymphocytes from oral treated mice with FB-LM increased bone marrow cells proliferation. According to the results, FB-LM triggers pro-inflammatory response in the immune cells. These findings corroborate the hypothesis that pectins with low degree of esterification exert pro-inflammatory activity while the opposite effect is observed for high methoxyl pectins.

Keywords: *Brassica oleracea* var. *italica*; pectin; de-esterification; immunomodulatory effects; macrophages.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS PRINCIPAIS COMPONENTES DE PECTINA NA CONFORMAÇÃO EM CADEIRA.....	24
FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS PRINCIPAIS COMPONENTES DA PECTINA.....	24
FIGURA 3 – CAPTAÇÃO DE β -GLUCANAS/PECTINAS MODIFICADAS POR CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE E AÇÕES SUBSEQUENTES.....	27
FIGURA 4 – COMPOSIÇÃO DA PLACA DE PEYER COMO EXEMPLO DE GALT HUMANO.....	29
FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO DE INFLORESCÊNCIA DO BRÓCOLIS INTEIRA E SECCIONADA.....	31
FIGURA 6 – DESENVOLVIMENTO DE MACRÓFAGOS RESIDENTES EM TECIDOS.....	35
FIGURA 7 – VIA DE TRANSDUÇÃO DE SINAL RELACIONADA COM A IMUNOREGULAÇÃO DE POLISACARÍDEOS VEGETAIS NA ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS.....	37
FIGURA 8 – METABOLISMO DA ARGININA VIA NOS OU ARGINASE E POLARIZAÇÃO M1/M2 DE MACRÓFAGOS.....	38

ARTIGO CIENTÍFICO

FIGURA 1 – FT-IR SPECTRA SHOWING THE BANDS OF METHYL-ESTERIFIED AND UNESTERIFIED CARBOXYL GROUPS OF GALA UNITS FOR THE DE-ESTERIFIED PECTIN FB-LM	52
FIGURA 2 – EFFECT OF FB-LM ON VIABILITY OF PERITONEAL MACROPHAGES	53
FIGURA 3 – MORPHOLOGY OF PERITONEAL MACROPHAGES AFTER INCUBATION WITH FB-LM OR TREATMENT OF MICE WITH THE POLYMER	55
FIGURA 4 – EFFECT OF INTRAPERITONEAL ADMINISTRATION OF FB-LM ON RECRUITMENT OF CELLS TO PERITONEAL CAVITY AND ELICITING ACTIVITY	57
FIGURA 5 – EFFECT OF FB-LM ON PHAGOCYTIC ACTIVITY OF PERITONEAL MACROPHAGES	58

FIGURA 6 – EFFECT OF FB-LM ON PRODUCTION OF PRO AND ANTI-INFLAMMATORY MEDIATORS BY PERITONEAL MACROPHAGES	60
FIGURA 7 – EFFECT OF FB-LM ON EXPRESSION OF PRO OR ANTI-INFLAMMATORY MARKERS (CD80, CD206 AND ARG-1) BY PERITONEAL MACROPHAGES AFTER ORAL TREATMENT OF MICE AND IN VITRO TREATMENT WITH FB AND FB-LM	62
FIGURA 8 – EFFECT OF FB-LM ON LYMPHOCYTE PROLIFERATION AND LYMPHOCYTE-MEDIATED BONE MARROW CELL-PROLIFERATION. LEVELS OF CYTOKINES FROM LYMPHOCYTES SUPERNATANT AFTER NATIVE FB AND FB-LM TREATMENT OF MICE	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AE-AG – arabinogalactana isolada da polpa de pêssego

Ag – Antígeno

AG – Apiogalacturonana

AKT – Proteína quinase B

Arg-1 – Arginase-1

ASL – Argininosuccinato liase

ASS – Argininosuccinato sintase

Bax – *BCL2 Associated X, apoptosis regulator*

Bcl-2 – *B-cell lymphoma 2*

BID – *BH3 interacting domain death agonist*

CCL17 – *C-C motif chemokine ligand 17*

CCL22 – *C-C motif chemokine ligand 22*

CD14 – *Cluster of differentiation 14*

CD16 – *Fc gamma III Receptor*

CD32 – *Fc gamma II Receptor*

CD206 – *Manose receptor*

CD4 – *Cluster of differentiation 4*

CD8 – *Cluster of differentiation 8*

CD80 – *Cluster of differentiation 80*

CD86 – *Cluster of differentiation 86*

CR3 – *Complement receptor 3*

CSF – *Colony-stimulating factor* (fator estimulador de colônias)

DE – Grau de esterificação

DM – Grau de metil-esterificação

DMSO – *Dimethyl Sulfoxide* (dimetilsulfóxido)

DNA – *Deoxyribonucleic Acid* (ácido desoxirribonucleico)

ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ensaio de enzima ligada ao imunoabsorvente)

ERK – Quinase regulada por sinal extracelular

ERO – Espécie reativa de oxigênio

FAE – *Follicle-associated epithelium*

FB – “Fração β ” de pectina obtida dos talos de brócolis (*Brassica oleracea* var. *italica*) por extração com ácido nítrico fervente por 30 minutos

FB-LM – “Fração β ” de pectina obtida dos talos de brócolis (*Brassica oleracea* var. *italica*) com menor grau de metil-esterificação

FBS – *Fetal bovine serum* (soro fetal bovino)

FDA – Food and Drug Administration

FT-IR – *Fourier-transform infrared spectroscopy*
Gal-3 – *Galectin-3* (galectina-3)
GalpA – Ácido 1-4- α -D-galactopirranurônico
GALT – *Gut Associated Lymphoid Tissue* (tecido linfoide associado ao intestino).
GC – *Germinal center* (centro germinativo)
GC-MS – *Gas chromatography–mass spectrometry*
GP-2 – Glicoproteína-2
GPN – Glucorafanina
HBSS – *Hanks' Balanced Salt Solution*
HG – Homogalacturonana
HSC – *Hematopoietic stem cells* (células-tronco hematopoiéticas)
iC3b – *Inactivated complement 3b*
IFN – *Interferon*
IFN- γ – *Interferon- γ*
IgA – Imunoglobulina A
IKK – *enzyme complex I κ B Kinase*
IL – Interleucina
IL-1 – Interleucina-1
IL-10 – Interleucina-10
IL-12 – Interleucina-12
IL-1R – Receptor de interleucina 1
IL-1 β – Interleucina-1 β
IL-2 – Interleucina-2
IL-4 – Interleucina-4
IL-6 – Interleucina-6
iNOS – *Inducible nitric oxide synthase* (óxido nítrico sintase induzível)
IRAK – quinase associada a IL-1R
JNK – *c-Jun N-terminal kinase*
LPS – Lipopolissacarídeo
MAPK – *Mitogen activated protein kinase* (proteína quinase ativada por mitógeno)
MCP – *Modified Citrus Pectin* (pectina modificada de *Citrus*)
MHC – *Major histocompatibility complex* (complexo principal de histocompatibilidade)
MP – *Modified pectin* (pectina modificada)
MR – Receptor de manose
MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
MyD88 – *Myeloid differentiation primary response 88 protein* (proteína de diferenciação mieloide adaptadora 88)
NF- κ B – Nuclear factor- κ B (fator nuclear- κ B)

NO – *Nitric Oxide* (óxido nítrico)
NOS – óxido nítrico sintase
OAT – Ornitina aminotransferase
ODC – Ornitina descarboxilase
PBS – *Phosphate Buffered Saline* (tampão fosfato-salino)
PI3K – Phosphoinositide-3-kinase
PKC – Protein kinase C (proteína quinase C)
PLC – *Phospholipase C* (fosfolipase C)
PP – Placas de *Peyer*
RG-I – Ramnogalacturonana I
RG-II – Ramnogalacturonana II
Rha – Ramnose
Rhap – α -L-ramnopiranos
ROS – *Reactive Oxygen Species* (espécies reativas de oxigênio)
RPMI 1640 – Meio Roswell Park Memorial Institute 1640
RRP – Receptores de reconhecimento de padrões
SED – Cúpula subepitelial
SEM – *Standard error of the mean*
SFN – Sulforafanos
SIgA – IgA secretora
SR – Receptor scavenger
TGF- β – *Transforming Growth Factor- β* (fator de transformação do crescimento- β)
TGI – Trato gastrointestinal
Th1 – Célula T *helper* 1
Th2 – Célula T *helper* 2
MD2 – *Myeloid Differentiation 2*
TLR – *Toll-Like Receptor* (receptor do tipo “*toll-like*”)
TLR2 – *Toll-Like Receptor 2*
TLR6 – *Toll Like Receptor 6*
TLR1 – *Toll-Like Receptor 1*
TLR4 – *Toll-Like Receptor 4*
TNF – *Tumor Necrosis Factor* (fator de necrose tumoral)
TNF- α – *Tumor Necrosis Factor- α* (fator de necrose tumoral- α)
TRAF-6 – *Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6*
XG – Xilogalacturonana

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	JUSTIFICATIVA.....	19
1.2	OBJETIVOS.....	20
1.2.1	Objetivo geral.....	20
1.2.2	Objetivos específicos.....	20
2	ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL.....	21
2.1	RESUMO DA ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL.....	22
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	23
3.1	PECTINAS – ESTRUTURA E ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	23
3.1.1	Estrutura química das pectinas.....	23
3.1.2	Atividade biológica de pectinas.....	25
3.1.3	Proposição do mecanismo de absorção de pectinas pelo trato gastrointestinal.....	26
3.1.3.1	<i>Tecido linfoide associado ao intestino (GALT).....</i>	<i>27</i>
3.1.4	Grau de esterificação e a atividade biológica de pectinas	30
3.1.5	Pectina de <i>Brassica oleracea</i> var. <i>itálica</i>	31
3.2	ASPECTOS GERAIS DO SISTEMA IMUNOLÓGICO – MACRÓFAGOS E LINFÓCITOS COMO ALVOS DE MODULAÇÃO POR POLISSACARÍDEOS ...	33
3.2.1	Macrófagos.....	34
3.2.2	Linfócitos.....	39
4	ARTIGO CIENTÍFICO.....	41
	Abstract.....	42
1.	Introduction.....	43
2.	Experimental	45
2.1.	Material.....	45
2.2.	FB pectin de-esterification and FT-IR analysis.....	45
2.3.	Animals.....	46
2.4.	Peritoneal macrophage isolation.....	46
2.5.	Cell viability.....	47
2.6.	Morphological analysis of peritoneal macrophages from mice treated with FB-LM	47
2.7.	Recruitment of cells to peritoneal cavity	48
2.8.	Phagocytic activity	48

2.9.	Nitric oxide production	48
2.10.	Flow cytometry	49
2.11.	Lymphocyte isolation	49
2.12.	Lymphocyte proliferation.....	50
2.13.	Bone marrow cells isolation and proliferation	50
2.14.	Quantification of cytokines	50
2.15.	Statistical analysis	51
3.	Results and discussion.....	52
3.1.	De-esterification of FB	52
3.2.	Effects of FB-LM on viability, morphology, eliciting and phagocytic activity of peritoneal macrophages	53
3.3.	Effect of FB-LM on nitric oxide and interleukins IL-1 β , IL-12 and IL-10 production by macrophages	59
3.4.	Effect of FB-LM on expression of the macrophage surface markers CD80 and CD206	61
3.5.	Effect of FB-LM on lymphocyte proliferation, lymphocyte-mediated bone marrow cell-proliferation and cytokines IL-2 and IFN- γ IFN- γ levels	63
4.	Conclusion	65
	Acknowledgements	65
	References	66
5	CONCLUSÃO	73
	REFERÊNCIAS	74

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, os polissacarídeos naturais ganharam crescente interesse, considerando suas propriedades biológicas e a possibilidade de aplicação em farmacologia, já que esses polímeros são conhecidos por sua baixa toxicidade (MINZANOVA et al., 2018; CHEN et al., 2021, WU et al., 2021). Dentre os polissacarídeos mais estudados para estes fins, encontram-se os de fontes vegetais, os quais demonstraram em inúmeros trabalhos significativo potencial imunomodulador, antioxidante, hipoglicêmico, antitumoral, dentre outros. Dentre os polissacarídeos mais estudados, encontram-se as β -glucanas, as galactanas e as pectinas (GRØNHAUG et al., 2011; MAXWELL et al., 2012; ZHANG; XU; ZHANG, 2015; GEORGIEV et al., 2017; CHAI et al., 2018; YAO et al., 2018; WU et al., 2021).

As pectinas são heteropolissacarídeos complexos que compõem a estrutura da parede celular vegetal (MAXWELL et al., 2012). Estudos demonstram que as diferentes atividades biológicas das pectinas estão relacionadas com suas características estruturais (POPOV; OVODOV, 2013). Nesse sentido, a modificação química estrutural de pectinas é uma estratégia extensamente utilizada para o estudo dos diversos efeitos de tais biopolímeros. As pectinas modificadas mais estudadas são as de fonte cítrica, conhecidas como MCPs (LECLERE et al., 2016; RAMACHANDRAN et al., 2017; OGUTU et al., 2018). Para obter tais moléculas, a pectina passa por processo de desesterificação e remoção de arabinose, resultando em frações do polímero com menor massa molecular e alto conteúdo de galactose. Por conta dessas características, acredita-se que as pectinas modificadas possam ser absorvidas pelo organismo por meio do sistema de internalização de antígenos das células do tecido linfóide associado ao intestino (GALT), o que explicaria os efeitos encontrados para pectinas administradas por via oral em modelos animais (SUH et al., 2013; KIM et al., 2017) e até mesmo em humanos (GUESS et al., 2003; SEELY et al., 2018). As células do GALT, ao atingirem a corrente sanguínea, podem liberar os fragmentos de polissacarídeos, onde então poderiam executar ações imunomoduladoras e antitumorais (BI et al., 2018). Já está bem descrito que os efeitos imunomoduladores de polissacarídeos são dependentes da interação destes polímeros com receptores de membrana, como dectina-1 ou os receptores do tipo *toll-like* (TLRs) presentes em macrófagos, culminando na ativação ou inibição de uma resposta imune (AGRAWAL; GUPTA; AGRAWAL, 2010; MANTOVANI; SICA, 2010); ou então, podem exercer efeito tóxico para células tumorais ao ligarem-se com proteínas pró-metastáticas, como a galectina-3 (gal-3), presente em diversos tipos tumorais, podendo ser detectada nos espaços intra e extracelular (GAO et al., 2013, EMRAN et al., 2022).

A pectina utilizada no presente estudo foi isolada e caracterizada por Petkowicz e Williams (2020) dos talos de brócolis, um recurso abundante, renovável, de baixo custo e que normalmente é descartado, sem utilização específica. Essa pectina, que foi denominada FB, apresenta naturalmente baixa massa molar (72.218 g/mol) e grau de esterificação de 56,2%, além de 68,4% de ácido galacturônico e galactose como principal açúcar neutro (17%). Tais características evidenciam que, mesmo sem qualquer modificação adicional ao processo de isolamento, a pectina FB é estruturalmente muito similar a pectinas modificadas – as quais possuem cadeias curtas e ricas em galactose (CHEN et al., 2014).

Durante o mestrado (BUSATO et al., 2020), verificou-se que FB estimulou a produção da interleucina IL-10 por macrófagos de camundongos tratados com o polímero, mas não alterou a produção das interleucinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-12 por essas células. Além desses efeitos, FB induziu estas células a assumirem características morfológicas compatíveis com as de macrófagos ativados e potencializou a atividade fagocítica. Estes resultados indicam que FB exerce efeito imunomodulador direcionado para uma possível ação anti-inflamatória.

Alguns estudos têm evidenciado uma estreita correlação entre o potencial anti-inflamatório de pectinas com características estruturais similares às encontradas em FB. Sugere-se que pectinas com grau de esterificação superior a 50% ativem células do sistema imunológico para exercerem atividade anti-inflamatória, e que pectinas com grau de esterificação inferior a 50% exerçam atividade pró-inflamatória (SALMAN et al., 2008; AMORIM et al., 2016; HO et al., 2016a; HO et al., 2016b).

Apesar das evidências no envolvimento do grau de esterificação das pectinas e a modulação do sistema imune, ainda é necessário aprofundar este entendimento. Assim, no presente trabalho, foram utilizadas duas preparações de pectina: a pectina FB, extraída de brócolis, com grau de esterificação de 56,2%, e uma forma modificada de FB com menor grau de esterificação (FB-LM) (20,8%), a fim de ampliar seu potencial de aplicação em relação à imunomodulação.

1.1 JUSTIFICATIVA

Nas últimas décadas, a imunomodulação tem sido uma estratégia intensamente explorada no tratamento e prevenção de várias doenças, incluindo o câncer (RAMBERG; NELSON; SINNOTT, 2010; PAN et al., 2019; DONG et al., 2022). Muitas moléculas de origem natural são alvo de estudos com essa finalidade, por serem obtidas de fontes renováveis, como os vegetais e as plantas medicinais (PATHAK; FIALHO; NANDI, 2022; YUE et al., 2022), como é o caso dos polissacarídeos (YU et al., 2018), os quais são considerados de baixa toxicidade para administração em indivíduos.

A pectina FB extraída por Petkowicz e Williams (2020) possui naturalmente características semelhantes às de pectinas modificadas, conferindo a esse biopolímero a possibilidade de absorção no trato gastrointestinal, e, por consequência, ser um modificador da resposta biológica, agindo como potencializador do sistema imunológico (CHEN et al., 2014; ELIAZ; RAZ, 2019). Resultados prévios demonstraram que a pectina FB nativa possui um potencial imunomodulador (BUSATO et al., 2020), promovendo efeitos em consonância com dados da literatura, os quais sugerem uma possível relação com o grau de esterificação das pectinas (AMORIM et al., 2016; SALMAN et al., 2008).

Considerando que os talos de brócolis não possuem valor comercial significativo, a extração das pectinas dessa parte da planta é uma estratégia válida para agregar valor a um recurso abundante, renovável e de baixo custo. Além disto, a fácil obtenção da pectina sem a necessidade de purificação posterior confere uma vantagem para a escolha desse polissacarídeo.

Diante do descrito, o objetivo geral do presente trabalho foi avaliar a relação entre o grau de esterificação da pectina de *Brassica oleracea* var. *italica* e sua atividade imunomoduladora.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

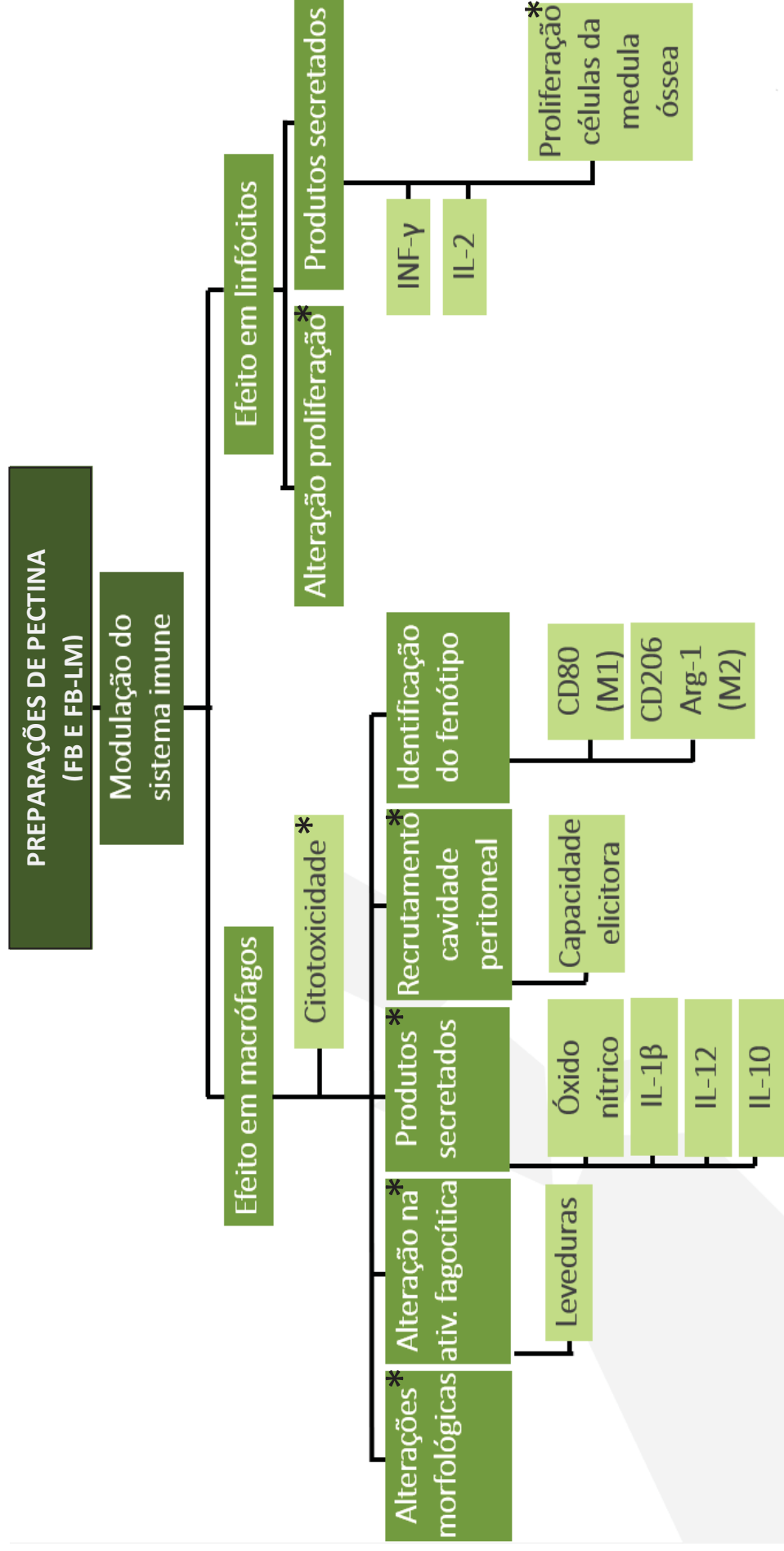
O objetivo geral desse trabalho foi avaliar a relação entre o grau de esterificação da pectina de *Brassica oleracea* var. *italica* e sua atividade imunomoduladora.

1.2.2 Objetivos específicos

Para verificar o potencial imunomodulador das preparações da pectina em estudo foram estabelecidas as seguintes avaliações:

- Para a pectina desesterificada (FB-LM):
 - Avaliar a modulação de macrófagos por meio da análise de morfologia, atividade fagocítica e produção de óxido nítrico e interleucinas (*in vitro* e *in vivo*);
 - Investigar a capacidade de FB-LM em recrutar macrófagos para a cavidade peritoneal de camundongos tratados com a pectina por via intraperitoneal e de pré-ativar essas células;
 - Avaliar a capacidade proliferativa de linfócitos (*in vitro* e *in vivo*);
 - Avaliar a proliferação de células da medula óssea após incubação com o sobrenadante de linfócitos de camundongos tratados oralmente com FB-LM.
- Para ambas as preparações de pectina (FB e FB-LM):
 - Investigar o fenótipo de ativação de macrófagos, por meio da presença de marcadores de polarização (CD80, CD206 e arginase-1);
 - Quantificar interleucinas produzidas por linfócitos (após tratamento *in vitro* e *in vivo*).

2 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL



* Experimentos já realizados com FB nativa.

2.1 RESUMO DA ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

No intuito de compreender melhor a relação entre os efeitos observados e a estrutura da pectina, a estratégia principal dessa investigação foi reduzir o grau de metil-esterificação da pectina FB, obtendo uma molécula denominada FB-LM, com a qual foram realizados experimentos comparativos para confirmar a ocorrência de alteração da atividade imunomoduladora previamente observada para FB.

Inicialmente foram realizadas com a pectina FB-LM as avaliações previamente já concluídas com a pectina FB nativa (BUSATO et al., 2020), utilizando duas estratégias de tratamento: *in vitro* e *in vivo* (tratamento de camundongos tipo *Swiss* por gavagem). Para estabelecer concentrações não tóxicas para a investigação, primeiramente foi avaliado o efeito citotóxico de FB-LM para macrófagos peritoneais de camundongos, por meio de ensaio que avaliou a viabilidade celular (MTT). Em seguida, foi avaliada a alteração morfológica dos macrófagos, visualizada por microscopia ótica. A atividade fagocítica de macrófagos foi avaliada por meio de incubação com leveduras. Em relação às moléculas secretadas por essas células quando ativadas, foram quantificados óxido nítrico, IL-10, IL-1 β e IL-12. Na sequência, foi avaliada a capacidade de FB-LM em recrutar monócitos para a cavidade peritoneal e de elicitar essas células.

O efeito da pectina em camundongos tratados por via oral com o polímero foi verificado quanto a capacidade proliferativa de linfócitos retirados do baço. Para tanto, foi realizada a contagem total de células deste órgão com a finalidade de verificar se houve estimulação da proliferação *in vivo*. Em seguida, as células foram plaqueadas na presença de concanavalina A (mitógeno de células T) e, realizada novamente a contagem do número de células. O sobrenadante da cultura de linfócitos foi utilizado para incubar células da medula óssea. Esse ensaio teve como objetivo verificar se os produtos secretados por linfócitos após estímulo de FB-LM seriam capazes de induzir a proliferação de células da medula óssea.

Em seguida, foram realizados experimentos adicionais com ambas as pectinas, FB nativa e FB-LM, a fim de aprofundar o entendimento sobre a modulação das células do sistema imune frente aos dois tratamentos. Para identificar o fenótipo dos macrófagos após exposição a ambos os polímeros, foi realizada a quantificação de marcadores específicos – CD80 para observar o fenótipo M1, e CD206 para observar o fenótipo M2. Foram também quantificadas as citocinas comumente produzidas por linfócitos, IFN- γ e IL-2, a fim de tentar compreender o resultado encontrado no ensaio de proliferação de células da medula óssea, em que se utiliza o sobrenadante da cultura de linfócitos, o qual pode conter produtos secretados por essas células.

3 REVISÃO DE LITERATURA

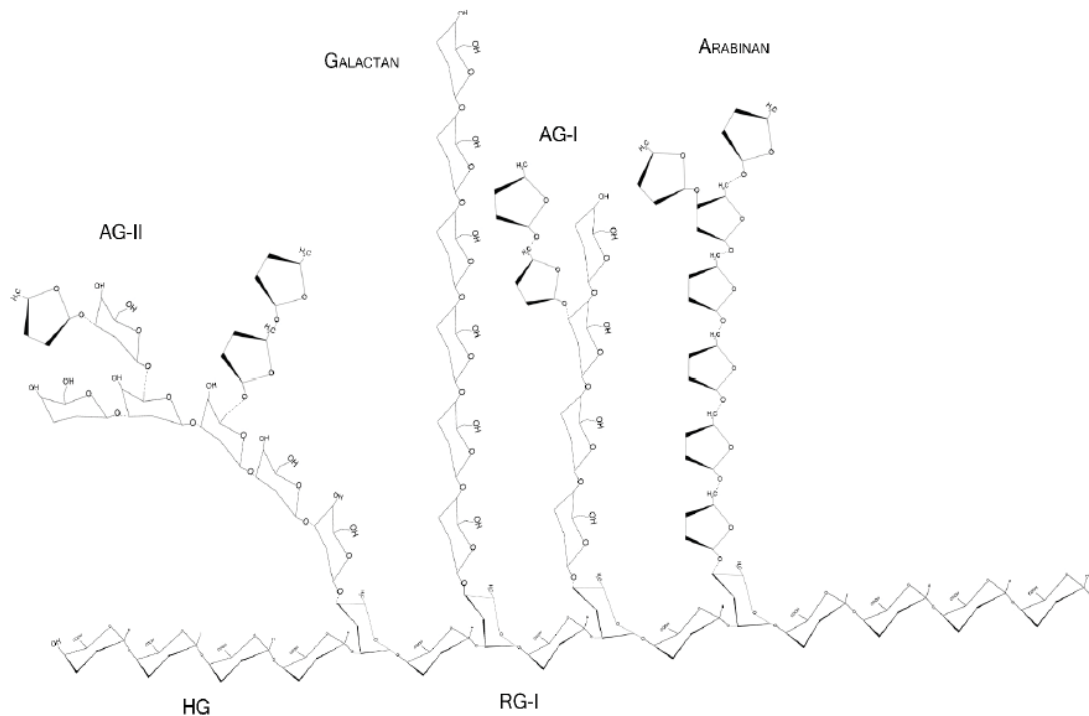
3.1 PECTINAS – ESTRUTURA E ATIVIDADE BIOLÓGICA

A busca por princípios ativos naturais, que sejam de custo acessível e baixa toxicidade para utilização em tratamentos clínicos diversos, é uma necessidade premente. Os polissacarídeos não amiláceos e solúveis em água, principalmente os de fonte vegetal, têm demonstrado atividade biológica como antioxidantes, imunomoduladores, anticoagulantes e, sendo assim, possuem potencial para utilização como drogas para tratamento de diversas doenças (CHEN et al., 2021). Dentre os polissacarídeos vegetais mais estudados quanto à atividade biológica estão as pectinas.

3.1.1 Estrutura química das pectinas

Em 1825, os cientistas franceses Braconnot e Payen identificaram a pectina pela primeira vez (POPOV; OVODOV, 2013). Trata-se de um polissacarídeo complexo natural de alto peso molecular, biocompatível, aniônico e de baixa toxicidade que pode ser extraído da parede celular de plantas e da lamela média de plantas superiores. Representa o principal componente que mantém a rigidez e a integridade de tecidos vegetais. Cada fonte de pectina possui quantidades variáveis de subestruturas, cujas principais representantes são a homogalacturonana (HG), as ramnogalacturonanas I e II (RG-I e II) e a xilogalacturonana (XG). A região HG é a estrutura dominante, correspondendo a até 60% da pectina, e é conhecida também como região linear ou *smooth*, composta principalmente por um homopolímero de ácido 1-4- α -D-galactopirranurônico parcialmente esterificado (GalpA). A região ramificada da pectina tem como principal representante RG-I, que é composta por α -D-GalpA repetido e intercalado com α -L-ramnopiranosose (Rhap) [$\rightarrow$ 2)- α -L-Rhap-(1,4)- α -D-GalpA-(1 $\rightarrow$]. Esta é a região também conhecida como *hairy*, por possuir cadeias laterais variáveis de galactanas (resíduos de β -1,4-Galp com grau variável de polimerização), arabinanas (α -1,5- L-Araf com 2- e 3-arabinose/ramificações de arabinana ligadas) e arabinogalactanas (Tipo I: β -1,4-D-galactanas com L-arabinose ou arabinana ligadas a O-3; A região RG-II é composta por D-galactanas ligadas a β -1,3 com β -O-6-ligados, galactanas ou arabinogalactanas), ligadas aos resíduos Rhap (cadeias laterais estão ligadas em Rhap O-4 (Figuras 1 e 2) (CHEN et al., 2014; ZDUNEK; PIECZYWEK; CYBULSKA, 2020; PEDROSA; RAZ; FABI, 2022).

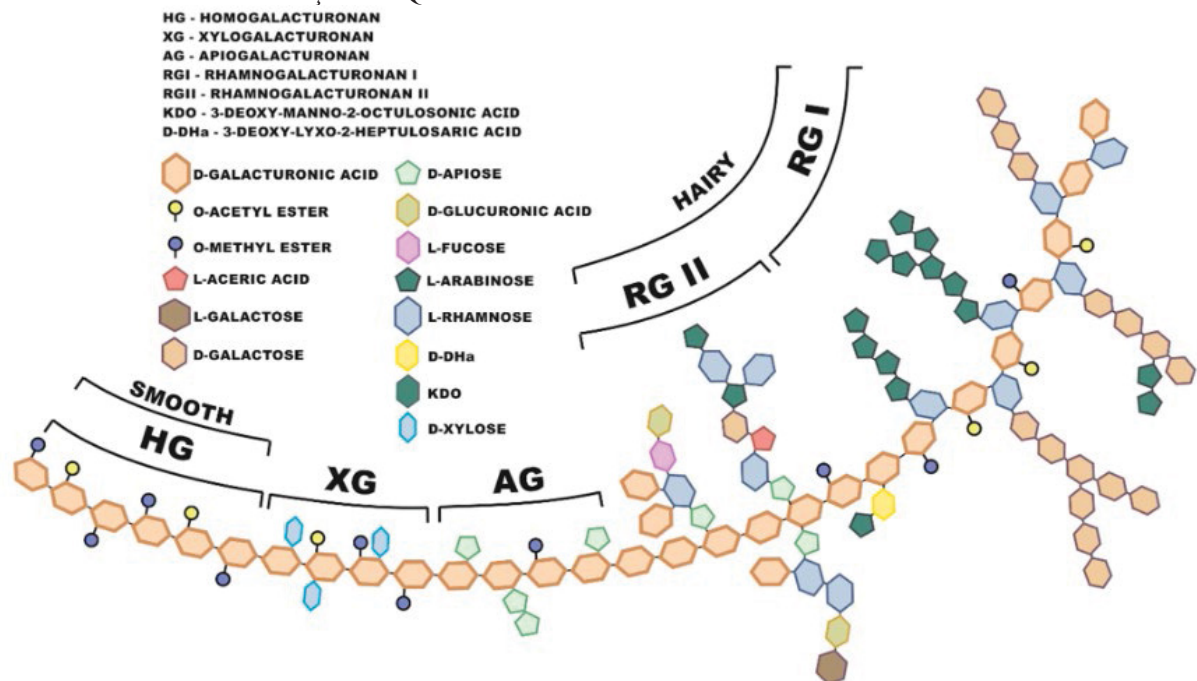
FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS PRINCIPAIS COMPONENTES DE PECTINA NA CONFORMAÇÃO EM CADEIRA



FONTE: Pedrosa; Raz; Fabi (2022).

NOTA: HG — homogalacturonana, composta de ácidos -1,4-D-galactopiranoúricos lineares; RG- I— ácidos -D-galactopiranoúricos intercalados e -L-ranopiranoase através de ligações glicosídicas -1,4 e 1,2; AG-I — -1,4-D-galactopiranoase com O-3-L-arabinofuranose ocasional; AG-II — -1,3-D-galactopiranoase com O-6-L-arabinofuranose/arabinogalactanas. Arabinanas e galactanas consistem em -1,5-Larabinofuranoses e -1,4-D-galactopiranoases lineares, respectivamente.

FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS PRINCIPAIS COMPONENTES DA PECTINA



FONTE: Zdunek; Pieczywek; Cybulska (2020)

NOTA: NOTA: Homogalacturonana (HG), ramnogalacturonana II (RG-II), ramnogalacturonana I (RG-I), xilogalacturonana (XG), apiogalacturonana (AG).

A sua estrutura faz com que as pectinas sejam amplamente utilizadas como ingrediente funcional, agente gelificante/espessante e estabilizador em indústria alimentícia, devido à sua capacidade de formar géis aquosos. Assim, é possível produzir compotas, geleias, sumos de fruta, sobremesas etc. Além disso, como são biocompatíveis e de baixa toxicidade, podem ser utilizadas pela indústria farmacêutica e cosmética. Na dieta, as pectinas são parte do grupo de fibras dietéticas solúveis, já que os seres humanos não possuem enzimas para digeri-las. No entanto, sua fermentação pela microbiota intestinal confere a este biopolímero importância para a manutenção da homeostase do cólon. Além disso, é capaz de diminuir o colesterol sanguíneo, diminuindo sua absorção do trato gastrointestinal (TGI), apresenta ação preventiva contra o câncer e ainda pode inibir a proliferação de alguns tipos de células cancerígenas. Estima-se que o consumo diário de pectinas por um indivíduo é de 1-7 g, correspondendo a 10-100 mg/kg de peso corporal (POPOV; OVODOV, 2013; CHEN et al., 2014; ZDUNEK; PIECZYWEK; CYBULSKA, 2020).

3.1.2 Atividade biológica de pectinas

Nos últimos anos, têm sido publicados estudos envolvendo diversas atividades biológicas de pectinas (ZHANG; XU; ZHANG, 2015; OGUTU et al., 2018; ELIAZ; RAZ, 2019; BEUKEMA et al., 2021). A pectina mais estudada em relação a tais características é a pectina modificada de fonte cítrica (*Modified Citrus Pectin* – MCP). A pectina cítrica é derivada da medula branca de casca de frutas cítricas. Em sua forma natural é uma molécula de alta massa molecular e até 70% de metil-esterificação, o que impossibilita sua absorção pelo trato gastrointestinal, já que não sofre degradação pelo organismo humano. Entretanto, quando a estrutura desta pectina é modificada por alteração de pH e tratamento enzimático controlado por calor, passa a ter baixo peso molecular e menor grau de esterificação, o que pode facilitar sua absorção pelo epitélio do intestino delgado até chegar na circulação. O uso desta pectina modificada como suplemento é considerado seguro e aprovado pela U.S. Food and Drug Administration (FDA, 2012). Uma vez absorvida, estudos mostram os benefícios à saúde atribuídos à MCP, como atividade imunomoduladora e antitumoral (CHEN et al., 2014; ELIAZ; RAZ, 2019), inclusive em estudos pré-clínicos e clínicos (AZÉMAR et al., 2007; RIED; ENG; SALI, 2017; MERHEB; ABDEL-MASSIH; KARAM, 2019).

Outras pectinas de fonte vegetal também têm demonstrado potencial imunomodulador e antitumoral em estudos *in vitro* e *in vivo*. Wu et al. (2021) verificaram que a pectina extraída de resíduos de *Rosa Setate* x *Rosa Rugosa*, composta por unidades de ácido galacturônico não

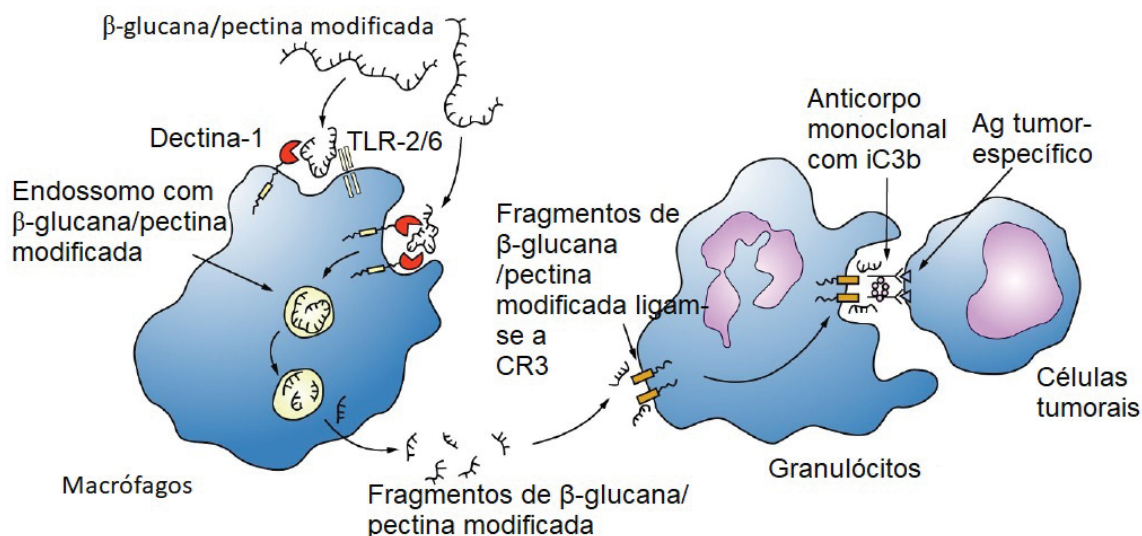
esterificado, teve efeito estimulante na proliferação de macrófagos da linhagem RAW 264.7 em concentrações de 25 a 200 µg/mL após 24h. Kim et al. (2017) verificaram que, após 20 dias de administração oral a camundongos de uma fração de polissacarídeo com características pécticas (rico em arabinoxilana e RG-I) extraído de folhas de cevada (BLE-P), houve atividade imunoestimuladora intestinal, evidenciada por aumento da produção de imunoglobulina A (IgA), fator de transformação do crescimento beta (TGF-β) e interleucina 10 (IL-10). Já Bian et al. (2020) avaliaram o potencial antitumoral de um polissacarídeo péctico (RP02-1) extraído de raízes de *Polygala tenuifolia* – composto por arabinose, ramnose, ácido galacturônico e galactose, em uma proporção de 63,5:8,3:8,4:19,8. Tanto *in vitro* quanto *in vivo*, RP02-1 inibiu o crescimento de células cancerosas pancreáticas (AsPC-1 e BxPC-3), assim como sua migração e formação de colônias. Os resultados ainda sugeriram que este polímero realizou *down-regulation* de Bcl-2, *up-regulation* de Bax e conversão de Caspase-3 para Caspase-3 clivada, induzindo a apoptose nas células cancerígenas. Os resultados *in vivo* evidenciam a absorção destes polissacarídeos pelo trato gastrointestinal.

3.1.3 Proposição do mecanismo de absorção de pectinas pelo trato gastrointestinal

Até o presente momento não há estudos com foco na absorção de pectinas quando administradas por via oral. Entretanto, a hipótese mais aceita é de que ocorra absorção deste polissacarídeo pelas células do tecido linfoide associado ao intestino (GALT – *Gut Associated Lymphoid Tissue*), semelhantemente ao que já fora proposto para as β-glucanas. Tal comparação faz sentido ao considerar certas analogias entre estes polímeros: assim como β-glucanas, as pectinas também são carboidratos não digeridos pelo trato gastrointestinal e podem ser em certo grau fermentadas no cólon (MAXWELL et al., 2012; MORRIS et al., 2013). No estudo de Rice et al. (2005) foi realizada a marcação de β-glucanas com fluoresceína. Os autores observaram que, após administração oral de lentinana e escleroglucana em camundongos, estes polímeros foram internalizados por células do GALT. Após internalização, são engolfados por macrófagos, um processo dependente de ligação com receptores específicos, como Dectina-1 e TLR-2, e transportados pelo corpo para locais como o baço, os linfonodos e a medula óssea. Antes de serem liberadas pelos macrófagos próximas a seu local de ação, estas β-glucanas são ainda fragmentadas e, uma vez na corrente sanguínea, os oligossacarídeos resultantes podem exercer sua atividade biomoduladora, não sendo diretamente citotóxicos, mas sim ativando células fagocíticas por ligação em receptores de membrana destas células (Figura 3). É

importante observar que estes oligossacarídeos possuem baixo peso molecular, semelhante às pectinas modificadas (MORRIS et al., 2013).

FIGURA 3 – CAPTAÇÃO DE β -GLUCANAS/PECTINAS MODIFICADAS POR CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE E AÇÕES SUBSEQUENTES



FONTE: adaptada de Chan; Chan; Sze (2009).

NOTA: Polissacarídeos que são absorvidos no trato gastrointestinal interagem com células do sistema imune, como macrófagos, por meio de receptores específicos, como Dectina-1 ou TLR-2/6, são engolfados por estas células, fragmentados e liberados na corrente sanguínea, onde podem exercer as atividades biomoduladoras aferidas a eles. No exemplo, os fragmentos estimulam um granulócito a reconhecer e eliminar uma célula tumoral. CR3 – Complement receptor 3; iC3b – Inactivated complement 3b; TLR-2/6 – Toll Like Receptors 2/6.

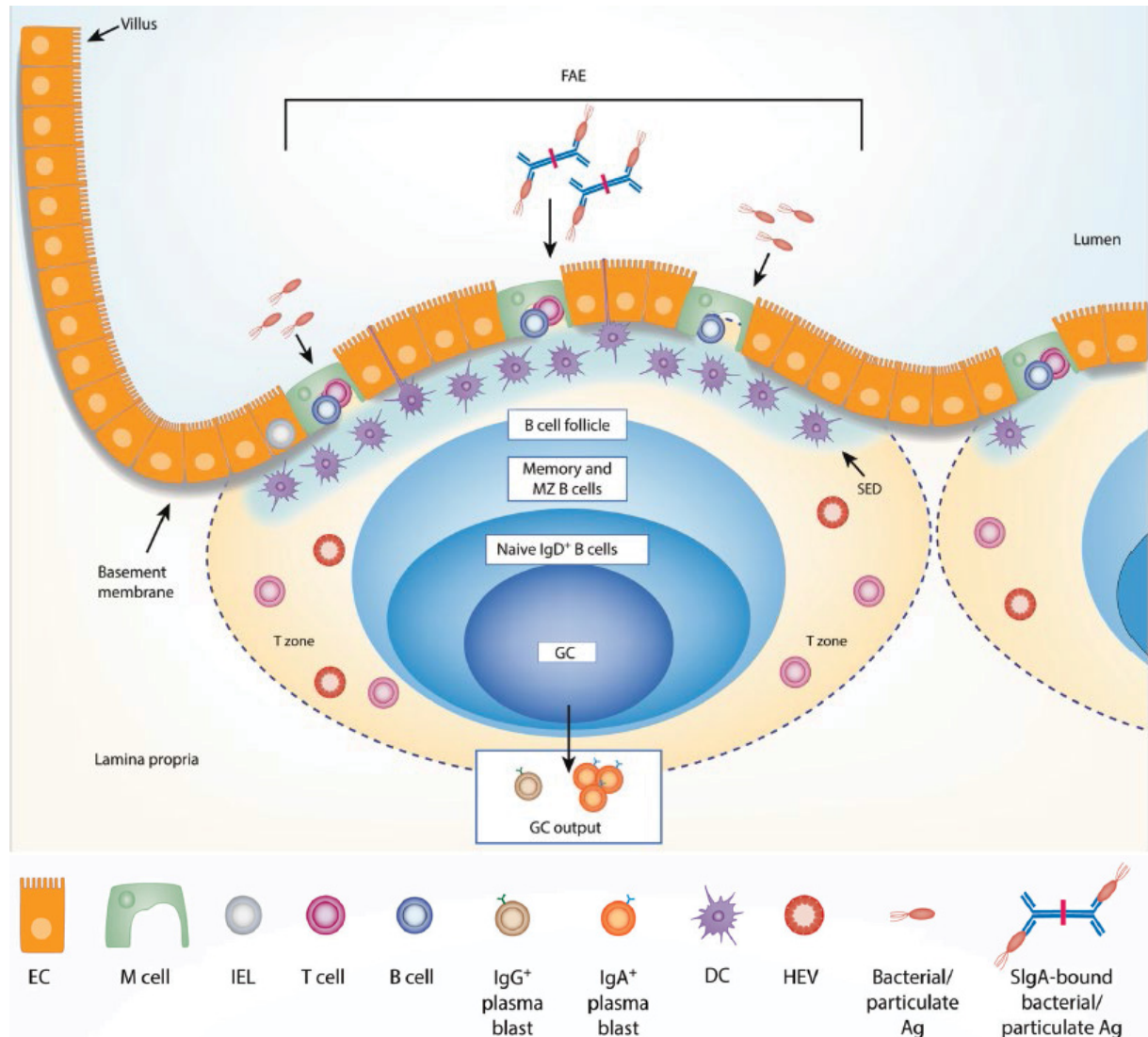
3.1.3.1 Tecido linfoide associado ao intestino (GALT)

Para melhor compreender o possível mecanismo de internalização de pectinas pelo trato gastrointestinal, é necessária uma breve descrição da anatomia das células envolvendo o GALT. O GALT é parte da barreira imunológica intestinal, necessária uma vez que este órgão está em constante contato com micro-organismos comensais, patogênicos e moléculas advindas dos alimentos ingeridos (GONÇALVES et al., 2016). A microbiota intestinal pode compreender aproximadamente 40 trilhões de micro-organismos, que atuam prevenindo a colonização por patógenos, além de metabolização de carboidratos não digeríveis e geração de metabólitos importantes para a saúde humana. O sistema imunológico intestinal deve então responder de forma adequada a estes micro-organismos benéficos, além de fornecer imunidade contra os patógenos invasores (MÖRBE et al., 2021). Para que isso ocorra, está presente na mucosa intestinal um tecido linfoide denso, que inclui folículos linfoides isolados no intestino e delgado

e no intestino grosso, além de agregados linfoides no íleo, como as Placas de *Peyer* (GONÇALVES et al., 2016; MÖRBE et al., 2021). As Placas de *Peyer* foram descritas pela primeira vez em 1677, por Konrad Peyer, que as caracterizou como “nódulos agregados distintos”, e que nada mais são do que dezenas a centenas de folículos encontrados na parede antimesentérica intestinal, em todo o comprimento do intestino delgado, mas com maior densidade no íleo terminal. Nas Placas de *Peyer* ocorre a iniciação da resposta imune adaptativa – apresentação e reconhecimento de antígenos, ativação e diferenciação de linfócitos –, bem como sua propagação. Possui centros germinativos nos quais linfócitos B são estimulados por antígenos e linfócitos T auxiliares para gerar células de memória (OHNO, 2016; MÖRBE et al., 2021). Acima da superfície luminal das Placas de *Peyer* encontra-se o epitélio associado ao folículo (*follicle-associated epithelium* – FAE), o qual, diferentemente do restante do epitélio viloso, é praticamente desprovido de células caliciformes e células de *Paneth*, e os enterócitos ao redor desta região possuem baixa expressão do receptor de imunoglobulina polimérica transportadora de IgA. Estas diferenças fazem com que haja favorecimento da associação das bactérias do lúmen com o GALT (OHNO, 2016). Além disso, e principalmente, o FAE é rico em células epiteliais especializadas denominadas células M (*microfold cells*). É por meio destas células – e não dos sistemas linfático e sanguíneo – que ocorre o direcionamento de antígenos do lúmen intestinal para as células do GALT. Sua morfologia é distinta do restante do epitélio intestinal: não possuem microvilosidades na porção apical da membrana plasmática luminal, e sim microdobras, conferindo um aspecto “achatado” à região. Estas células são capazes de realizar a transcitose de proteínas solúveis, partículas inertes e micro-organismos do lúmen intestinal. Sua membrana plasmática basal possui uma invaginação que forma um bolsão, o qual permite a interação destes antígenos e partículas com as células imunes encontradas na cúpula subepitelial (GONÇALVES et al., 2016; OHNO, 2016; MÖRBE et al., 2021). Abaixo do epitélio intestinal há a lâmina própria (tecido conjuntivo frouxo), onde são encontradas células imunes como macrófagos, mastócitos e células dendríticas, que podem capturar, processar e apresentar os antígenos e macromoléculas transcitados do lúmen para linfócitos e desencadear uma resposta imune (GONÇALVES et al., 2016). Como as células M podem absorver partículas inertes, como esferas de látex, por exemplo, sua capacidade de reconhecimento fagocitário pode ser indiscriminada e inespecífica. Entretanto, sabe-se que pode haver reconhecimento específico mediado por receptores, considerando a eficiência de absorção de diferentes moléculas/antígenos, como ocorre entre as cepas de *Escherichia coli*, por exemplo. Hoje, diferentes técnicas, como análise de microarranjo de DNA e a utilização de anticorpos monoclonais, permitiram a detecção de receptores específicos presentes nas células

M, como glicoproteína-2 (GP-2), que atua como receptor para *pili* tipo I em um subconjunto de enterobactérias gram-negativas, como *E. coli* e *Salmonella enterica*; e o receptor de IgA, que reconhece antígenos ligados a IgA secretora (SIgA) (OHNO, 2016).

FIGURA 4 – COMPOSIÇÃO DA PLACA DE PEYER COMO EXEMPLO DE GALT HUMANO



FONTE: Mörbé et al. (2021).

NOTA: Os folículos das Placas de Peyer (PP) estão em íntima associação com o lúmen intestinal e possuem um FAE especializado contendo células M que transportam o antígeno livre e ligado a IgA para a PP. Abaixo do FAE, PP possui uma região SED rica em células apresentadoras de antígenos. Estreitamente associado ao SED está o folículo de células B subjacentes, consistindo em uma zona marginal externa que abriga células B de memória e da zona marginal, uma zona de manto fina que acomoda células B virgens e um centro germinativo central, contribuindo para a geração de plasmablastos IgA⁺ que semeiam o intestino delgado circundante. Os folículos de células B de PP são separados por zonas de células T perifoliculares (linhas pontilhadas). FAE: Epitélio associado ao folículo; SED: cúpula subepitelial; GC: centro germinativo; Ag: antígeno.

3.1.4 Grau de esterificação e atividade biológica de pectinas

As pectinas podem ser classificadas de acordo com o grau de esterificação ao longo da molécula, considerando com menor grau de esterificação (DE) as pectinas com $< 50\%$ DE, e com maior grau de esterificação as pectinas com $> 50\%$ DE. Também pode-se considerar o grau de bloqueamento, ou seja, a forma com que a esterificação é distribuída na molécula. A maior parte da metil-esterificação costuma estar concentrada na região ramificada da pectina, com foco em RG-II. Entretanto, a região linear (HG) também pode ter graus variados de metilação ou acetilação, a depender da fonte e do método de extração (PEDROSA; RAZ; FABI, 2022).

Alguns estudos sugerem a relação entre o perfil imunomodulador das pectinas e suas características estruturais, com destaque para o grau de esterificação. Sugere-se que pectinas com maior grau de esterificação ativam células do sistema imunológico para exercer atividade anti-inflamatória, enquanto pectinas com menor grau de esterificação exercem atividade pró-inflamatória (SALMAN et al., 2008; AMORIM et al., 2016; HO et al., 2016a; HO et al., 2016b). Apesar dessa forte evidência, ainda há controvérsias, como nos estudos de Vogt et al. (2016) e Sahasrabudhe et al. (2018). Vogt et al. (2016), por exemplo, observaram que quanto maior o grau de metil-esterificação dos polímeros de pectina de limão, maior a ativação de NF- κ B/AP-1 mediado por TLR2 em células THP1 MD2-CD14; frações da mesma pectina com menor grau de esterificação atuam na ativação do sistema imunológico interagindo com o TLR4. Ao contrário, Sahasrabudhe et al. (2018) sugerem que pectinas com menor grau de metil-esterificação podem inibir o receptor TLR2, mais especificamente a via pró-inflamatória TLR2-TLR1, através de forças eletrostáticas entre os ácidos galacturônicos não esterificados da pectina e as cargas positivas do domínio externo do TLR2; enquanto isso, a via TLR2-TLR6 permanece inalterada. Beukema et al. (2021) levantaram a hipótese de que não apenas o nível de ésteres metílicos na pectina poderia determinar seu impacto na sinalização de TLR, mas também sua distribuição na estrutura do polímero (grau de bloqueamento). Neste estudo, os autores demonstraram que as pectinas de laranja e limão com distribuição em bloco de um alto número de unidades de ácido galacturônico não esterificado foram responsáveis por efeitos inibitórios sobre TLR2-1. Essas estruturas de pectina foram mais eficazes na prevenção da indução de respostas de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos humanos (THP-1 diferenciado).

Tais contraposições encontradas na literatura evidenciam a necessidade de aprofundar o entendimento da atividade imunomoduladora condicionada ao grau de esterificação da pectina.

3.1.5 Pectina de *Brassica oleracea* var. itálica

O brócolis é uma variedade botânica da espécie *Brassica oleracea*, pertencente à família Brassicaceae (crucíferas), da qual fazem parte também a couve-flor, o repolho, a couve, o rabanete, o agrião, dentre outros (EMBRAPA, 2015).

Botânica (EMBRAPA, 2015):

Reino Plantae

Subreino Tracheobionta (plantas vasculares)

Superdivisão Spermatophyta (plantas com semente)

Divisão Magnoliophyta (angiospermas)

Classe Magnoliopsida (dicotiledônea)

Subclasse Dilleniidae

Ordem Capparales

Família Brassicaceae (sin. Cruciferae)

Gênero *Brassica*

Espécie *B. oleracea*

Grupo de cultivares *Brassica oleracea*, L. var. itálica Plenck

FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO DE INFLORESCÊNCIA DO BRÓCOLIS INTEIRA E SECCIONADA



FONTE: GFDL1.2/Fir0002

Acredita-se que o brócolis seja originário da área do Mediterrâneo oriental, e que fora introduzido na Europa, especialmente na Itália, na época medieval. Foi amplamente cultivado na Itália, e depois em outras partes da Europa e na América (LATTÉ; APPEL; LAMPEN, 2011). Sua produção é extensa, ultrapassando 19 milhões de toneladas/ano. No Brasil, seu

cultivo concentra-se principalmente nas regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste, com destaque para o Estado de São Paulo (EMBRAPA, 2015).

Suas folhas, flores e pedúnculos florais são comestíveis, e diversos estudos evidenciam os benefícios de sua inclusão na dieta (YAGISHITA et al., 2019; NANDINI et al., 2020; KAISER et al., 2022), devido às substâncias bioquímicas ativas como carotenoides, vitamina C e glicosinatos, sendo estes últimos extensivamente estudados, principalmente os sulforafanos (SFN), presentes no brócolis na forma de seu precursor inativo glucorafanina (GPN). A conversão de GPN em SFN ocorre após ruptura do tecido vegetal por mordida, mastigação ou fatiamento, por exemplo, processo que libera a mirosinase. Esta enzima converte a GPN na forma bioativa SFN, pertencente ao grupo dos isotiocianatos (VANDUCHOVA; ANZENBACHER; ANZENBACHEROVA, 2019; NANDINI et al., 2020). Atribui-se aos sulforafanos forte caráter antioxidante, tornando-os promissores para o tratamento de várias doenças. O SFN demonstrou ser anti-hiperlipidêmico, antidiabético, antioxidante, neuroprotetor, cardioprotetor, anti-inflamatório e antitumoral (MANGLA et al., 2021).

Entretanto, poucos são os estudos relacionados à atividade biomoduladora de polissacarídeos do brócolis, especialmente de pectinas. Xu, Cao e Chen (2015) obtiveram por extração aquosa de talos do brócolis um polissacarídeo composto por arabinose, ramnose e galactose, na proporção 5.3:1:0.8. Os autores avaliaram a viabilidade das linhagens HepG2, Siha e MDA-MB-231 após tratamento com o polissacarídeo a 2 mg/ml por 96 h, e verificou-se redução da viabilidade para 29,8%, 29,2% e 22,4%, respectivamente. Já Urai et al. (2017) realizaram um teste de contração do bicho-da-seda, o qual relaciona a contração muscular com ação imunoestimulante, com diversos polissacarídeos extraídos de várias fontes vegetais. Dentre todas as amostras testadas, o polissacarídeo proveniente do brócolis, extraído com água a 120 °C de inflorescências e talos do vegetal, foi o que exerceu maior efeito na contração muscular avaliada. O polissacarídeo foi purificado e caracterizado e apresentou alto teor de ácido galacturônico e arabinose e corresponde a homogalacturonana e RG-I. Recentemente, Ferreira et al. (2023) estudaram a relação entre estrutura e função de uma pectina contendo 64 mol% de ácidos galacturônicos, 18 mol% de arabinose e 10 mol% de galactose isolada do brócolis por extração aquosa a quente e posterior tratamento enzimático. A fração aquosa a quente e produto da ação das enzimas pectina metil tranferase e endopoligalacturonase induziu a proliferação de linfócitos B *in vitro*, sendo o efeito mais intenso para o polímero ácido obtido pós-tratamento enzimático. Uma fração insolúvel em etanol 80% (ET80) mostrou maior efeito imunomodulador que a fração primária, porém inferior àquelas frações da extração a quente e tratamento enzimático. A sulfatação não promoveu efeito na proliferação de linfócitos B. Tais

estudos são preliminares, necessitando, portanto, de uma investigação mais profunda sobre a atividade imunomoduladora e antitumoral de pectinas do brócolis.

A pectina FB, por sua vez, foi isolada e caracterizada por Petkowicz e Williams (2020) de talos de brócolis, um recurso abundante, renovável, de baixo custo e que normalmente é descartado, sem utilização específica. FB apresenta naturalmente baixa massa molar (72.218 g/mol) e grau de esterificação de 56,2%, além de 68,4% de ácido galacturônico e galactose como principal açúcar neutro (17%). Tais características evidenciam que, mesmo sem qualquer modificação, a pectina FB é estruturalmente muito similar a pectinas modificadas. Nossos estudos anteriores demonstraram que FB foi citotóxica para células HepG2 e apresentou possível efeito anti-inflamatório, evidenciado pelo aumento da produção da interleucina IL-10 por macrófagos de camundongos tratados com o polímero e pela não alteração na produção das interleucinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-12 por essas células. As características morfológicas compatíveis com as de macrófagos ativados, além da atividade fagocítica potencializada, confirmam o efeito imunomodulador dessa pectina (BUSATO et al., 2020). A redução do grau de metil-esterificação desta pectina objetiva aprofundar os estudos sobre a relação entre o grau de esterificação e a atividade biológica deste polímero, e potencializar sua aplicação medicinal.

3.2 ASPECTOS GERAIS DO SISTEMA IMUNOLÓGICO – MACRÓFAGOS E LINFÓCITOS COMO ALVOS DE MODULAÇÃO POR POLISSACARÍDEOS

O sistema imunológico humano é responsável por reconhecer moléculas próprias e não próprias, a fim de proteger o corpo de doenças de origem endógena ou exógena. É composto por células brancas do sangue e órgãos e tecidos do sistema linfático, como timo, baço, tonsilas, linfonodos, vasos linfáticos e medula óssea. Este reconhecimento acontece a nível bioquímico, considerando por exemplo a composição do DNA e a estrutura de glicoproteína de células. Assim, mesmo o menor antígeno pode ser detectado e combatido (ABBOTT; USTOYEV, 2019).

O sistema imune pode ser dividido em duas facetas: a imunidade inata e a imunidade adaptativa ou adquirida. Essa divisão é uma simplificação, porque os dois tipos de imunidade muitas vezes se sobrepõem e se relacionam de forma íntima (ABBOTT; USTOYEV, 2019). A imunidade inata inclui neutrófilos, monócitos, macrófagos, sistema complemento, citocinas e proteínas de fase aguda, que fornecem a primeira linha de defesa do organismo no contato com o antígeno. Em termos gerais, sua resposta é rápida e inespecífica, tendo a produção de citocinas

como ator principal, realizando a mediação entre várias ações imunes. Mas o corpo também se prepara para uma resposta mais específica, apesar de mais lenta, ao tipo de antígeno que se apresenta, caso a primeira resposta não seja suficiente, comandada pelas células da imunidade adaptativa – linfócitos T e B. Os linfócitos B produzem anticorpos e as células T auxiliares apresentam antígenos, estimulando as células T citotóxicas. Estas, por sua vez, são mais específicas e reconhecem marcadores nas células não próprias, a fim de eliminá-las. O balanço final é a produção de memória, para que uma nova exposição ao mesmo antígeno leve a uma resposta mais vigorosa e rápida (YATIM; LAKKIS, 2015; NICHOLSON, 2016; ABBOTT; USTOYEV, 2019).

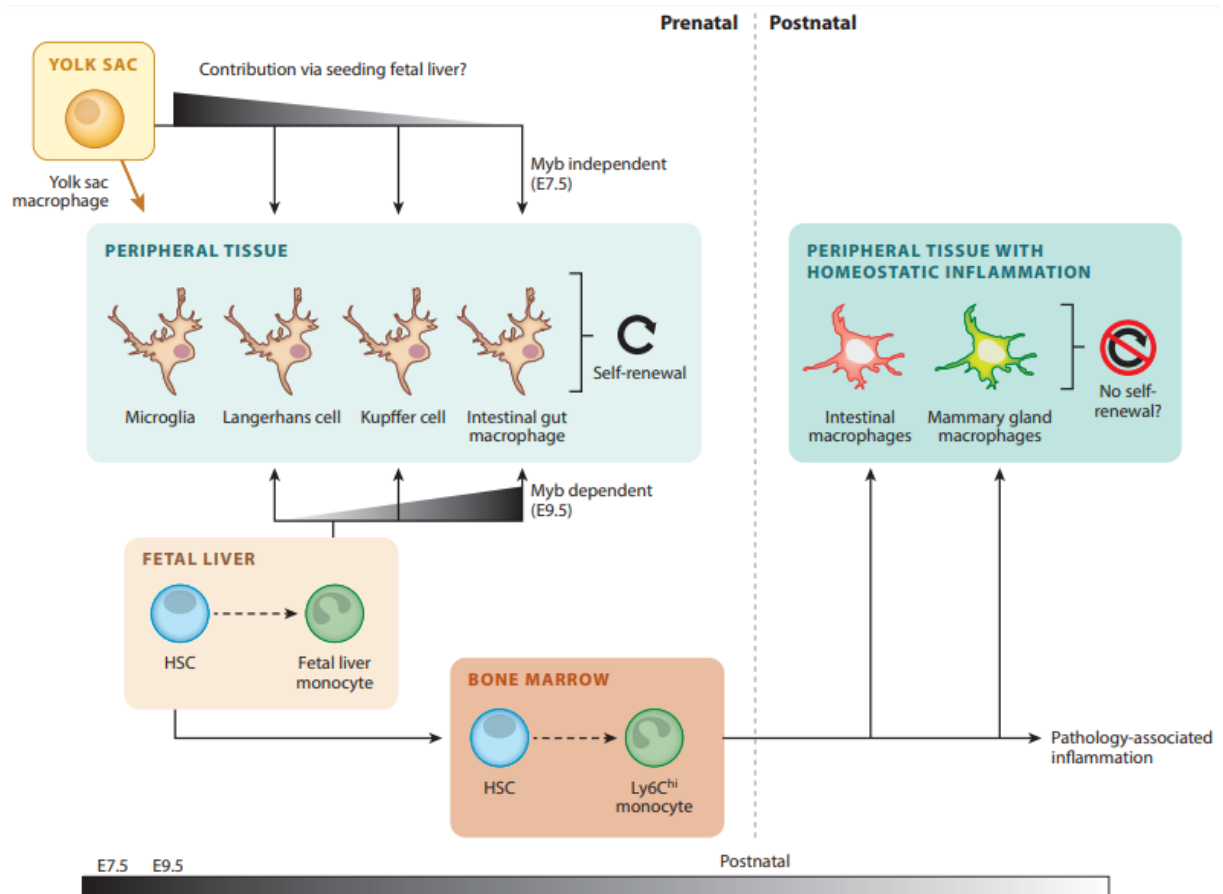
Polissacarídeos vegetais podem regular o sistema imunológico de diversas formas, ativando células T, linfócitos B, macrófagos, células natural killer, além de ativar complementos que promovem a produção de citocinas (YIN; ZHANG; LI, 2019).

3.2.1 Macrófagos

A regulação da imune inata tem um impacto importante na capacidade do hospedeiro de responder rapidamente aos patógenos. Como membros importantes do sistema de defesa imunológica do hospedeiro, os macrófagos podem colaborar com outros tipos de células (como os neutrófilos) para resistir a fatores externos adversos (YIN; ZHANG; LI, 2019).

De maneira geral, monócitos/macrófagos advêm de progenitores na medula óssea e migram para o sangue periférico. Quando requisitados, os monócitos circulantes deixam o fluxo sanguíneo e vão para os tecidos. Após exposição a fatores de crescimento locais, citocinas pró-inflamatórias e produtos microbianos, estas células se diferenciam em macrófagos (MOGHADDAM et al., 2018). Entretanto, sabe-se que certas populações de macrófagos embrionários são estabelecidas antes do surgimento de monócitos circulantes. O conceito revisado do sistema de fagócitos mononucleares agora considera a existência de macrófagos teciduais de duas origens distintas: a maioria são macrófagos que residem no tecido e são estabelecidos em fase pré-natal; e os demais são macrófagos geralmente de vida curta que se desenvolvem na fase adulta a partir de monócitos infiltrantes de tecidos, processo estimulado por reações inflamatórias patológicas, mas também homeostáticas. Macrófagos das duas origens podem coexistir em certos tecidos, embora suas contribuições funcionais na homeostase possam não ser necessariamente as mesmas (Figura 6) (VAROL; MILDNER; JUNG, 2015).

FIGURA 6 – DESENVOLVIMENTO DE MACRÓFAGOS RESIDENTES EM TECIDOS



FONTE: Varol; Mildner; Jung (2015).

NOTA: Macrófagos primitivos no saco vitelino aparecem por volta do 7º dia embrionário (E7) e se disseminam após o estabelecimento da circulação sanguínea (E9.5) pelos tecidos embrionários. Esta hematopoiese primitiva é independente do fator de transcrição Myb. Com a colonização do fígado fetal por células-tronco hematopoiéticas (HSCs) derivadas da aorta-gônada-mesonefros (HSCs) em torno de E10.5, a hematopoiese definitiva é iniciada de forma dependente de Myb e gera todas as principais linhagens hematopoiéticas, incluindo monócitos. Os monócitos do fígado fetal infiltram-se nos tecidos periféricos, exceto no sistema nervoso central, e dão origem aos macrófagos residentes nos tecidos, que em sua maioria coexistem, mas podem progressivamente superar os macrófagos teciduais derivados do saco vitelino. Os macrófagos derivados do saco vitelino e derivados do fígado fetal são caracterizados por longevidade e autorrenovação. Durante a idade adulta, os monócitos Ly6Chi podem dar origem a macrófagos residentes em tecidos de vida relativamente curta e não autorrenováveis em órgãos que apresentam condições inflamatórias homeostáticas, como o intestino, a glândula mamária em remodelação e o coração.

Macrófagos desempenham inúmeras funções no organismo, como fagocitose de patógenos, detritos e células mortas; apresentação de antígenos processados associados a moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC); e produção citocinas, como interleucina -1 (IL-1), IL-6, fator de necrose tumoral- α (TNF- α) etc. (MOGHADDAM et al., 2018). Em determinadas condições, incluindo localização e tempo, macrófagos podem ser ativados a estados funcionais distintos (fenótipos), o que é denominado polarização. A polarização não é fixa, pois macrófagos são plásticos e podem integrar diversos sinais, como os de micróbios, tecidos danificados e do ambiente normal do tecido. É controlada por três vias:

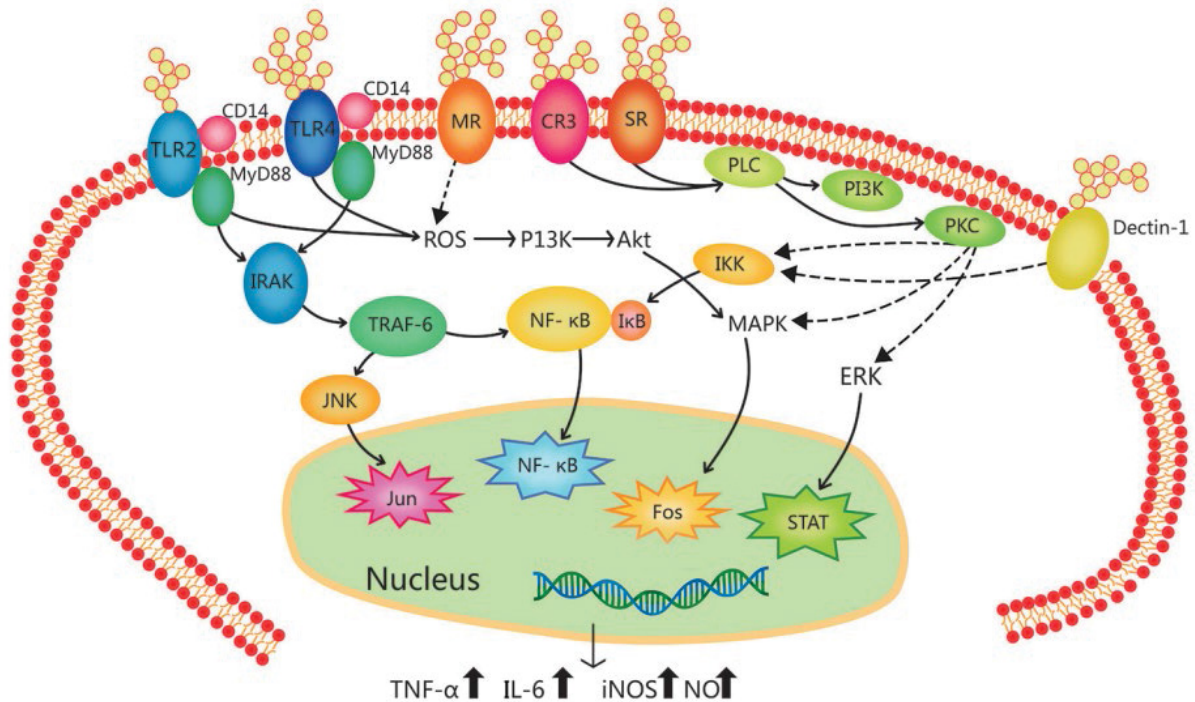
epigenéticas e de sobrevivência celular; microambiente tecidual; e fatores extrínsecos, como produtos microbianos e citocinas liberadas na inflamação. Uma das maneiras de classificar estes perfis de ativação é a distinção dos macrófagos nos fenótipos M1 e M2 (MURRAY, 2017).

Os macrófagos M1 surgem em ambientes inflamatórios dominados pelo receptor do tipo Toll (TLR) e sinalização de interferon. São associados à imunidade a bactérias e patógenos intracelulares. Em geral, exercem atividade pró-inflamatória, estimulado por um componente microbiano lipopolissacarídico (LPS), por exemplo, e produzem fatores pró-inflamatórios como IL-6, IL-12 e fator de necrose tumoral (TNF). Outro aspecto importante é a expressão de marcadores de superfície específicos, como CD80, CD86 e CD16/32. Já os macrófagos M2 são encontrados em ambientes dominados por respostas TH2, como na asma e na alergia. Estimulados pela interleucina 4 (IL-4), por exemplo, são capazes de respostas anti-inflamatórias, angiogênese e reparação de tecidos danificados. Expressam arginase-1 (Arg-1), CD206, IL-10 e as quimiocinas CCL17 e CCL22 (MURRAY, 2017; MOGHADDAM et al., 2018; YUNNA et al., 2020).

O uso dos termos M1 e M2 é controverso pela dificuldade em estabelecer critérios bem definidos para cada fenótipo. Nos tecidos infectados, os macrófagos são primeiro polarizados para o fenótipo pró-inflamatório M1 para auxiliar o hospedeiro contra patógenos. Em seguida, são polarizados para o fenótipo M2 e formam uma resposta anti-inflamatória para reparar o tecido danificado. Caso haja algum distúrbio nessa razão de polarização (M1/M2), pode haver a ocorrência de doenças. Drogas capazes de interferir na direção da polarização podem auxiliar no controle das respostas desejadas (MURRAY, 2017; YUNNA et al., 2020).

Os efeitos imunomoduladores dos polissacarídeos vegetais sobre os macrófagos são alcançados principalmente através da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), secreção de citocinas, proliferação celular e atividade fagocítica dos macrófagos (YIN; ZHANG; LI, 2019). A ativação dos macrófagos ocorre por reconhecimento e ligação dos polissacarídeos a receptores específicos na superfície dos macrófagos, como os do tipo Toll (TLR4), CD14, CR3, receptor scavenger (SR), receptor de manose (MR) e Dectina-1, o que inicia a resposta imune e exerce um efeito imunomodulador. Esses receptores de macrófagos são chamados de receptores de reconhecimento de padrões (RRP). A partir do reconhecimento, inicia-se uma cascata de sinalização intracelular, levando à ativação transcricional e produção de mediadores para atividades microbicida e antitumoral (Figura 7) (YIN; ZHANG; LI, 2019).

FIGURA 7 – VIA DE TRANSDUÇÃO DE SINAL RELACIONADA COM A IMUNOREGULAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS VEGETAIS NA ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS



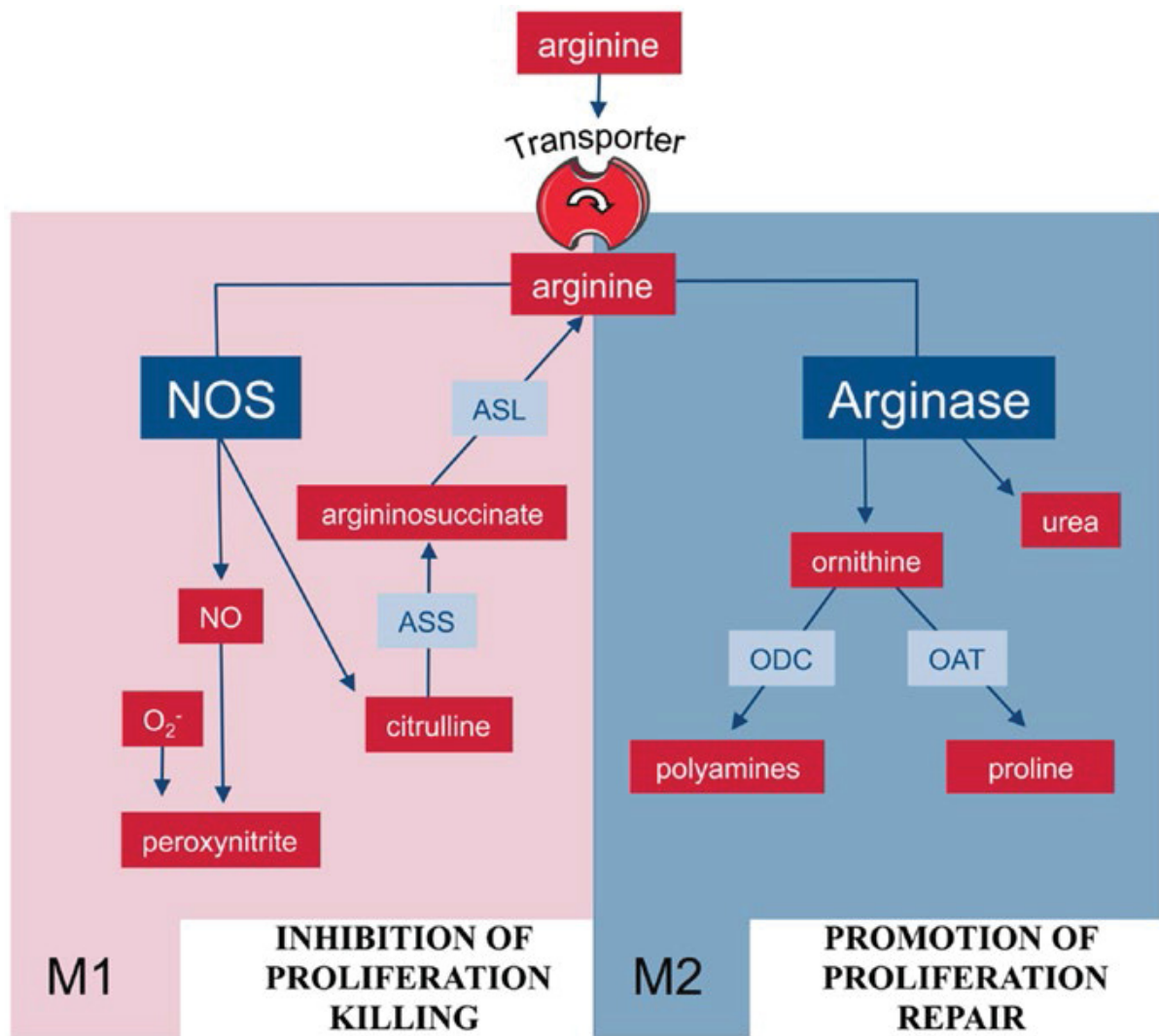
FONTE: Yin, Zhang, Li (2019).

NOTA: Os polissacarídeos vegetais podem ativar macrófagos por meio de diferentes tipos de receptores, como receptor 4 tipo Toll (TLR4), receptor 2 tipo Toll (TLR2), receptor 3 do complemento (CR3), receptor de manose (MR), receptor scavenger (SR), e Dectin-1. Esses receptores podem funcionar separadamente, e alguns tipos diferentes de receptores podem cooperar entre si formando agrupamentos de complexos de sinalização. (por exemplo, TLR4-CD14, TLR2-CD14, etc.) A ligação de TLR4 e TLR2 leva à ativação da quinase associada a IL-1R (IRAK) por meio de uma proteína de diferenciação mieloide adaptadora 88 (MyD88), com ativação subsequente de receptor de TNF associado fator 6 (TRAF-6), MAP quinases (por exemplo, p38 e JNK) e NF-κB. Também pode ativar a via fosfatidil-inositol 3-quinase (PI3K)-Akt através de espécies reativas de oxigênio (ROS), levando à ativação da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK). As vias de sinalização ativadas por SR- e CR3 levam à ativação da fosfolipase C (PLC), cujos produtos ativam a proteína quinase C (PKC) e PI3K, levando à ativação da MAPK regulada por sinal extracelular (ERK). A PKC ativada pode fazer com que a IKK seja fosforilada, o complexo IKK fosforila I-κB que conduz o I-κB ubiquitilado e degradado. No final, o fator nuclear-κB (NF-κB) é liberado. Em última análise, esses fatores de ativação entram no núcleo causando a indução da transcrição do gene. A ativação dessas vias de transcrição induz a expressão de citocinas pró-inflamatórias (TNF-α, IL-6, etc.) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS).

Uma das mais expressivas respostas induzidas por polissacarídeos é a modulação do metabolismo da arginina, a qual está envolvida na polarização dos fenótipos M1 e M2. A partir da arginina, os macrófagos produzem óxido nítrico (NO) e citrulina pela ação da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS); já a enzima arginase catalisa a síntese de ornitina e ureia (RATH et al. 2014), levando à polarização de macrófagos a M1 e M2, respectivamente. Quando macrófagos são estimulados para o fenótipo M1, uma grande quantidade de óxido nítrico (NO) é liberada, uma importante molécula biologicamente ativa que atua como transdutora de sinal no sistema nervoso central e está amplamente envolvida nos processos fisiológicos e patológicos de múltiplos sistemas, incluindo respostas imunes e reações inflamatórias. O NO é

central para gerar espécies reativas tóxicas para eliminar micro-organismos, parasitas e células tumorais; também pode induzir reações inflamatórias e proteger o corpo de fatores adversos externos (YIN; ZHANG; LI, 2019). O papel dos macrófagos nos processos regenerativos é desempenhado pelo fenótipo M2, que exibe alta atividade de arginase e produz interleucinas imunossupressoras.

FIGURA 8 – METABOLISMO DA ARGININA VIA NOS OU ARGINASE E POLARIZAÇÃO M1/M2 DE MACRÓFAGOS



FONTE: Rath et al. (2014).

NOTA: O metabolismo da arginina via NOS ou arginase está no centro da polarização M1/M2 dos macrófagos. Os macrófagos M1 e M2 são caracterizados pelo metabolismo da arginina via NOS ou arginase com importantes consequências funcionais. ASL: argininosuccinato liase; ASS: argininosuccinato sintase; NOS: óxido nítrico sintase; OAT: ornitina aminotransferase; ODC: ornitina descarboxilase.

3.2.2 Linfócitos

Os linfócitos B e T se desenvolvem a partir de células progenitoras na medula óssea. As células B permanecem na medula durante o seu desenvolvimento, e as células T migram para o timo em um estágio inicial como timócitos. A produção de receptores antígeno-específicos nestas células resulta do rearranjo aleatório e da junção de múltiplos segmentos de DNA que codificam as áreas de ligação ao antígeno dos receptores (regiões determinantes de complementaridade). Este processo ocorre logo no início do desenvolvimento destas células, antes da exposição ao antígeno, o que leva à produção de um repertório de receptores de células T e anticorpos adequados para cobrir a variedade de patógenos que podem ser encontrados (PARKIN; COHEN, 2001).

As células B desempenham várias funções imunológicas, mas têm sido consideradas principalmente como reguladores positivos das respostas imunes e contribuintes centrais para a patogênese de doenças relacionadas ao sistema imunológico, devido à sua capacidade de produzir anticorpos. Nas últimas duas décadas, os pesquisadores atribuíram funções adicionais às células B, incluindo a apresentação de antígenos, a produção de citocinas e uma capacidade supressora que é atribuída principalmente a sua secreção de IL-10 (MAURI; BOSMA, 2012). Os linfócitos T virgens, por sua vez, possuem receptores que se ligam a moléculas de adesão nas vênulas endoteliais altas dos nódulos linfáticos, entram nos nódulos e passam pela ligação transitória às múltiplas células apresentadoras de antígenos. Embora cerca de 95% dos linfócitos T sejam sequestrados no tecido linfoide, não são estáticos, mas se movem continuamente de um tecido linfoide para outro, via sangue ou linfa. Em pouco tempo uma célula T encontra seu antígeno. Quando a célula T encontra uma célula apresentadora de antígeno (como o macrófago, por exemplo) que carrega seu antígeno, a ativação ocorre nos próximos dias. O antígeno pode ser interno (como uma proteína tumoral, por exemplo), complexado então com MHC classe 1, ou externo, captado por células apresentadoras de antígenos e re-expresso com moléculas MHC classe 2. Os linfócitos CD4⁺ reconhecem apenas o antígeno apresentado com MHC classe II e os linfócitos CD8⁺ apenas com MHC classe I (PARKIN; COHEN, 2001).

Os linfócitos também podem ser alvos da ação de polissacarídeos vegetais, com aumento de sua proliferação e de produtos secretados. Panda e colaboradores (2015) mostraram que uma pectina extraída de frutos verdes de *Momordica charantia* (Karela) estimulou a proliferação de linfócitos do baço. Em condições similares, Bi e colaboradores (2015) observaram aumento na proliferação de linfócitos do baço e produção de IL-12 com

polissacarídeo extraído de *Cordyceps militaris*. Aumento na proliferação de linfócitos do baço e secreção de IL-2 e IFN- γ foram observados após tratamento de camundongos com 120 mg/ml de um polissacarídeo extraído de *Grifola frondosa* (LI et al., 2018a).

MCP (PectaSol-C®) promoveu ativação de linfócitos de sangue humano *in vitro*. Linfócitos T citotóxicos, linfócitos B células *natural killer* foram ativadas de maneira dose-dependente (RAMACHANDRAN et al., 2011). Outro estudo mostrou a ativação de linfócitos em ratos alimentados com pectina (OU LIM et al., 2002). Os efeitos foram evidenciados pelo aumento na produção das imunoglobulinas IgA, IgG e IgM por linfócitos em linfonodos mesentérico, produção de IFN- γ e expressão do receptor de IL-2 nos linfonodos dos animais alimentados com a pectina.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

Esta tese foi escrita conforme o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica da Universidade Federal do Paraná (UFPR), a qual prevê no Art. 52º que as teses devem ser apresentadas segundo as Normas de Apresentação de Documentos Científicos publicadas pela editora da UFPR ou em formato de artigo científico. O artigo científico apresentado neste trabalho, com os resultados da imunomodulação de FB-LM, será submetido para a revista científica International Journal of Biological Macromolecules.

Title

De-esterificated pectin from *Brassica oleracea* var. *italica* stimulates peritoneal macrophages to the M1 phenotype

Impact fator 2023: **8.025**

QualisCapes 2021/Ciências Biológicas II (CBII): **A1**

Authors

Bianca Busato¹; Carmen Lucia de Oliveira Petkowicz¹; Glaucia Regina Martinez¹; Karin Braun Prado²; Silvia Maria Suter Correia Cadena¹ and Guilhermina Rodrigues Noletto^{1*}.

¹ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Paraná, Brazil.

²Department of Genetics, Federal University of Paraná, Brazil.

CEP 81.531-980, Curitiba-PR, Brazil.

*Corresponding author: guinoletto@yahoo.com.br; +55 41 3361 1535

Abstract

The relationship between the immunological action of polysaccharides and their structural features is essential to understand the way of these biopolymers triggers their effects and to enable its pharmacological uses. The present study focused on the immunological modulation profile of pectins and their degree of methyl-esterification. A pectin extracted from broccoli stalks (*Brassica oleracea* var. *italica*) (FB) previously characterized to have a high degree of methyl-esterification (56%) was subjected to a de-esterification procedure. The de-esterified pectin (FB-LM) had a low degree of methyl-esterification (20.8%). FB-LM had improved ability of activation of macrophages by morphology alteration and phagocytic capacity compared to FB. FB-LM increased the levels of nitric oxide (NO) and IL-12 by peritoneal macrophages of mice after *in vivo* treatment (200 mg/kg for 5 days), and of IL-1 β after *in vitro* treatment at 100 and 200 μ g/mL for 48h. FB-LM decreased levels of the anti-inflammatory interleukin IL-10 in peritoneal macrophages after *in vivo* treatment. Flow cytometry analysis indicated that macrophages from mice orally treated with native FB and FB-LM had a higher CD80⁺/CD206⁺ ratio compared to the control group. FB-LM stimulated lymphocyte proliferation and its IFN- γ production, while FB did not increase levels of the same cytokine after the *in vivo* treatment. The IFN γ -containing supernatant of lymphocytes from oral treated mice with FB-LM increased bone marrow cells proliferation. According to the results, FB-LM triggers pro-inflammatory response in the immune cells, which is the opposite response triggered by the native high methoxyl pectin (FB). These findings corroborate the hypothesis that pectins with low degree of esterification exert pro-inflammatory activity while the opposite effect is observed for high methoxyl pectins.

Keywords: *Brassica oleracea* var. *italica*; pectin; de-esterification; immunomodulatory effects; macrophages.

1. Introduction

In recent years, natural polysaccharides gained increasing interest, considering their biological properties and the possibility of application in pharmacology, as these polymers are known for their low toxicity [1,2,3]. Pectins are complex heteropolysaccharides that are part of plant cell wall [4]. Studies have shown that the different biological properties of pectins can be directly related to their structural features [5,6,7]. In this sense, the chemical modification of the pectins is a widely used strategy with the aim of improving their structural and functional characteristics and investigating the various effects of these polysaccharides [8]. The most studied modified pectins are those from citrus sources, known as modified citrus pectins (MCP) [9,10,11]. To obtain these molecules, pectin undergoes de-esterification and partial hydrolysis, resulting in polymer fractions with lower molar mass and high galactose content. Studies suggest that modified pectins may be absorbed by the gastrointestinal tract through the gut-associated lymphoid tissue (GALT) antigen internalization system, which would explain the biological effects of orally administered pectins in animal models [12,13] and humans [14,15]. When GALT cells reach the bloodstream, they can release polysaccharide fragments, which could perform immunomodulatory and antitumor actions [16]. It is well described that the immunomodulatory effects of polysaccharides are dependent on the interaction of these polymers with cell membrane receptors (e.g. dectin-1 or toll-like receptors, TLRs) in macrophages. The specificity of interaction with one or more receptors can culminate in the activation or inhibition of an immune response [17,18].

Regarding macrophage activation, two main phenotypes are well defined: M1 – obtained after contact with lipopolysaccharide (LPS) and IFN- γ , which presents high production of pro-inflammatory mediators such as nitric oxide, interleukins such as IL-1 β , IL-6, IL-12 and TNF- α ; and M2 – which have an anti-inflammatory profile evidenced by the stimulation of IL-4 and IL-10 and high production of IL-10, IL-4 and TGF- β , culminating in immune suppression [19]. The M1 or M2 subtypes can be detected after treatment of macrophages M0 (unstimulated) with numerous natural compounds, such as various polysaccharides including pectins [6, 7]. This plasticity of macrophages is an efficient approach widely used to investigate potential molecules targeting applications in the treatment of diseases related to the modulation of immune responses, such as infections, chronic inflammation, cancer etc. [19].

Lymphocytes are also part of the immunostimulatory architecture, being essential for cellular and humoral responses [62], and therefore are the subject of study to investigate

immunomodulatory effects. Certain polysaccharides have the ability to activate proliferation and cytokine production by these cells [20,21,22,23].

We previously showed that FB, a broccoli pectin extracted with boiling 0.1M HNO₃ with low molar mass (72,218 g/mol), degree of methyl-esterification (DM) of 56 %, 68.4% of galacturonic acid and galactose (17%) as the main neutral sugar, triggers modulation of macrophages [23]. The occurrence of the immunomodulatory effect was visualized by morphological characteristics compatible with those of activated macrophages and increase of phagocytic activity. In addition, the quantification of some molecules released by these cells indicated that FB has a possible anti-inflammatory effect, evidenced by increased production of interleukin IL-10 and non-production of any of the pro-inflammatory mediators evaluated in the macrophages of mice treated by oral via with the polymer [23].

Studies to clarify the relationship between the degree of esterification of pectins and their immunomodulatory profile have suggested a close correlation between the anti-inflammatory effects and high DM (>50%), similar to that found for FB [23]. In contrast, pectins with a low degree of esterification (<50%) seems to exert pro-inflammatory activity [24,25,26,27]. However, it is still necessary to deepen the knowledge about this structure-activity relationship. Vogt et al. [28] observed in THP1-MD2-CD14 cells that the higher the DM of the lemon pectin, the greater activation of NF- κ B/AP-1 mediated by TLR2, while fractions containing lower degree of esterification interacted with TLR4. In contrast, the study of Sahasrabudhe et al. [29] showed that commercial pectins with low DM may inhibit the pro-inflammatory TLR2-TLR1 pathway, through electrostatic forces between unesterified galacturonic acids and the positive charges of the external domain of TLR2, but the TLR2-TLR6 pathway remains unchanged. Beukema et al. [30] hypothesized that not only the level of methyl esters in pectin could determine its impact in TLR signaling, but also their distribution in the polymer structure. The authors found that orange and lemon pectins with block distribution of a high number of unesterified galacturonic acid units were responsible for inhibitory effects on TLR2-1. These pectin structures were most effective in preventing the induction of pro-inflammatory cytokine responses in human macrophages cell line (differentiated THP-1).

Therefore, the way the DM of pectins affects the modulation of the immune system is a subject of debate. In the present study, the pectin FB was subjected to a treatment for de-esterification and the modulation of the immune response by the resulting modified polymer (FB-LM) was investigated.

2. Experimental

2.1. Material

Lipopolysaccharide from *Escherichia coli* 0111:B4 (LPS), 3- [4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), hematoxin, naphthylethylene-diamine, Giemsa, concanavalin A, KBr, NaOH, acetic acid, ethanol, hematoxylin, eosin, acetone, xylol, Entellan®, ELISA kits and dialysis tubing cellulose membrane were obtained from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Penicilin, gentamicin, streptomycin, fetal bovine serum (FBS), trypan blue, PBS, HBSS and RPMI 1640 medium were obtained from Thermo Fischer Scientific (Waltham, Massachusetts, EUA). FITC-labeled anti-mouse CD80 antibody, PE-labeled anti-mouse CD206 antibody and their respective isotype controls were purchased from BioLegend (San Diego, CA, USA).

Tissue culture materials were provided by Techno Plastic Products (Schweiz, Saxonia, Germany). Dimethyl Sulfoxide (DMSO), isopropanol, sulphuric acid, phenol, calcium acetate, formaldehyde, ethanol, acetic acid, sodium nitrite and eosin were obtained from Merck (Darmstadt, Hesse, Germany). Bouin solution was made with 75% picric acid (Nuclear Química), 20% formaldehyde (Merck, Darmstadt, Hesse, Germany) and 5% glacial acetic acid (J. T. Baker®).

2.2. FB pectin de-esterification and FT-IR analysis

FB pectin was previously extracted from *Brassica oleracea* var. italica [31]. It had Mw 72.218 g/mol, 62% homogalacturonan with a high DM (56 %) and 32 % rhamnogalacturonan I mainly branched by 1,4- β -D-galactan.

The FB solution (native) was obtained by solubilizing the polymer in phosphate saline buffer (PBS) at 50 °C for 24h. The solution was filtered through a membrane with 0.45 μ m pores, followed by filtration through a sterilization membrane (0.22 μ m), and finally frozen at -20 °C. Carbohydrate dosage was determined before and after filtration to correct any loss during this process [32].

FB was subjected to a de-esterification process, according to a protocol adapted from Voragen, Schols and Pilnik [33]. Briefly, 10 mg/mL FB was solubilized in a 1:1 solution of distilled water and isopropanol for 24h. Then, 0.8M NaOH solution was added and kept under

stirring for 2h. Then, the pH was dropped to 4 using 50% acetic acid. The sample was precipitated with 3 times ethanol, left at -20°C for 24h and centrifuged at 10,000 rpm for 15 minutes. The de-esterified pectin (FB-LM) was resuspended in distilled water, dialyzed and lyophilized. The degree of methyl esterification (DM) was determined by FT-IR spectroscopy. In brief, spectroscopic grade KBr powder was used to prepare discs using a 99:1 salt/sample ratio. The spectra were collected at the absorbance mode in the frequency range of $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ using a Vertex 70 spectrophotometer (Bruker, Germany), at 4 cm^{-1} resolution from 32 scans. The degree of methyl-esterification was calculated as the ratio between the area of the methyl-esterified band (1749 cm^{-1}) and the sum of methyl-esterified (1749 cm^{-1}) and non-esterified (1630 cm^{-1}) bands, as previously described by Vriesmann and Petkowicz [34].

2.3. Animals

Female albino swiss mice (6-8 weeks-old) were housed at $22^{\circ}\text{C} \pm 1$ under a 12/12h light–dark cycle and had free access to a standard laboratory diet (Purine®) and water *ad libidum*. All recommendations of the Brazilian National Law (n. 6.638, November 5, 1979) for scientific management of animals were respected. Animal handling procedures for scientific research were approved by the Animal Ethics Committee of UFPR number 1307.

For *in vivo* assays, 5 mice were treated for 5 days with FB-LM at 200 mg/kg using oral gavage feeding needles or treated with a single intraperitoneal injection of 200 mg/kg FB-LM, 24h before the assay. Control groups were treated with PBS. For positive control, mice were treated with 50 $\mu\text{g/kg}$ LPS by intraperitoneal injection 1h before collecting the cells.

2.4. Peritoneal macrophage isolation

Peritoneal macrophages were obtained according to standard protocol described elsewhere [23,35]. Briefly, after euthanize of mice by inhaled anesthetic, 10 mL ice-cold sterile phosphate-buffered saline solution (HBSS) were infusing in their peritoneal cavity. The exudate collected was centrifuged at $300 \times g$, at 4°C for 20 min and the pellet was resuspended with Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium containing 5% fetal bovine serum (FBS), 50 $\mu\text{g/mL}$ gentamicin, 100 U/mL penicillin and 100 $\mu\text{g/mL}$ streptomycin. The cells were counted and plated in an appropriate density according to each experiment. After 2 hours

at 37 °C under 5% CO₂ for adhesion, the non-adherent cells were removed by washing once with HBSS at 37 °C. For *in vitro* evaluations, to the adherent macrophages, medium containing pectin was added and incubated in the same conditions varying the time according to each experimental protocol.

For isolation of peritoneal macrophages from *in vivo* experiments, the peritoneal exudate was obtained by infusion of only 3 mL of HBSS into peritoneum and collected. After centrifugation, the peritoneal fluid and cells were analyzed as described.

2.5. Cell viability

Peritoneal exudate cells (5×10^5 cells/well) were incubated in 96-well plates for adhesion as described. Medium (control) or FB-LM (10, 25, 50, 100, 250, 500 and 750 µg/mL) was added to the adherent macrophages. After 48h, the cell viability was evaluated using the 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyltetrazolium bromide (MTT) method as described by Mosmann [36] and Noleto et al. [35].

2.6. Morphological analysis of peritoneal macrophages

Peritoneal macrophages from mice subjected to oral treatment with FB-LM or intraperitoneal treatment with LPS were plated in a density of 2×10^5 cells/well on glass coverslips contained in a 24-well, and the plate was incubated at 37 °C under 5% CO₂. After 2h, the glass coverslips were washed twice with HBSS pH 7.4, fixated for 5 min with Bouin solution, stained with hematoxylin for 1 minute and with eosin for 30 s, and dehydrated in successive solutions of pure acetone, acetone: xylene (2:1, 1:1 and 1:2) and pure xylene. The slides were then mounted with Entellan® and examined microscopically. The number of activated and resident macrophages was counted in all groups [25]. For *in vitro* evaluation, peritoneal exudate cells (5×10^5 cells/well) were incubated with 25, 50, 100 and 250 µg/mL FB-LM for 48h, and then the coverslips were fixated and analyzed as described.

2.7. Recruitment of cells to peritoneal cavity

This experiment was conducted according to the protocol previously reported by our group [23,37]. Briefly, a single intraperitoneal/l dose of FB-LM (200 mg/mL) or PBS (control group) at a maximum volume of 300 μ l was administered in mice. After 24h, the peritoneal macrophages were obtained as described in Section 2.4 and counted in a Neubauer hemocytometer to comparison with control. In addition, the cells were analyzed for morphological change as described in Section 2.6.

2.8. Phagocytic activity

Peritoneal macrophages from mice subjected to oral treatment with FB-LM or intraperitoneal treatment with LPS were plated in a density of 2×10^5 cells/well on glass coverslips contained in a 24-well, and the plate was incubated at 37 °C under 5% CO₂. After 2h, the cells were processed as described previously [23,25]. Briefly, the cells were washed twice with HBSS and the yeasts (ratio of macrophages/yeasts 1:5) were added, followed by incubation for 1 h. Then, non-phagocytized yeasts were removed by washing 2 times with HBSS. The coverslips were fixated with Bouin solution for 5 min, stained with Giemsa for 30 min, washed 5 times with distilled water and mounted with Entellan®. The preparations were examined in an optical microscopy, in order to obtain the ratio of phagocytized yeasts/macrophages.

2.9. Nitric oxide production

The nitric oxide production was indirectly assessed by measuring nitrite in the culture medium using the Griess reaction with modifications, as previously described [38]. For *in vitro* assay, peritoneal exudate cells (5×10^5 cells/well) were incubated in 96-well plates in the presence or absence of FB-LM (10, 25, 50, 100, 250, 500 and 750 μ g/mL) or LPS (200 ng/mL) as positive control for 48h. After that, 100 μ l of supernatants were mixed with an equal volume of Griess reagent and incubated at 25 °C for 10 min. At the same time, 100 μ l of the supernatants isolated from the peritoneal exudate of mice orally treated with pectin were also used to NO

quantification. In both cases, absorbance was measured at 550 nm in microplate reader (Epoch®). The nitrite concentration was calculated from a sodium nitrite standard curve. The results are expressed as μmol . To rule out the hypothesis that the stimulus was due to some LPS contamination, FB-LM was evaluated by gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) for detection and quantification of LPS [39].

2.10. Phenotypic markers on macrophages' surface

Peritoneal macrophages were stained with monoclonal antibodies and analyzed by flow cytometry. Macrophage phenotypes were analyzed using the following macrophage phenotypic markers: FITC-labeled anti-mouse CD80 antibody, PE-labeled anti-mouse CD206 antibody and their respective isotype controls, purchased from BioLegend, San Diego, CA, USA.

Peritoneal macrophages from mice orally treated with FB or FB-LM (200 mg/kg) for 5 days were obtained as previously described (Section 2.4). The cells were counted (5×10^5 cells/sample), resuspended in staining buffer (PBS with 0.1 % BSA and 2 mM EDTA) and incubated with antibodies for 30 min at 4 °C in the dark. Next, the cells were examined using BD FACSVerse™ Cell Analyser. Data analysis was performed by gating of the cells using the FSC-SSC characteristics of the population of activated macrophages. The percentage of each marker was determined relative to the respective isotype controls. The results are expressed as the CD80⁺/CD206⁺ ratio of each group. The FlowJo software was used for data analysis.

2.11. Lymphocyte isolation

The lymphocytes were obtained from spleen of mice treated with 200 mg/kg FB-LM for 5 days, as described by Lin et al. [40] with modifications [23]. Briefly, the spleen of each mouse was aseptically removed and placed in a sterile culture dish with cold RPMI 1640 medium. The spleens were gently disrupted with a sterile wire mesh and the cell suspensions of each spleen were centrifuged at 300g and 4 °C for 5 min. The red blood cells were lysed with 1 mL of ammonium chloride-potassium (ACK) lysis buffer for 1 min, and then 20 mL of PBS were added to stop the lysis following centrifugation. This proceeding was repeated twice. The lymphocytes were resuspended in RPMI 1640 with 10% FBS, and its viability was determined by the trypan blue method.

2.12. Lymphocyte proliferation

The total lymphocytes from each spleen (treated and control group) were counted separately. Then, these cells were plated at 3×10^5 cells/well in a 96-well plate and incubated with 1 $\mu\text{g/mL}$ of concanavalin A (ConA) for 72h at 37 °C under 5% CO_2 . The cell proliferation was determined by counting in a Neubauer chamber. The supernatants of this culture were collected to be used in another assay to stimulate bone marrow cells (as described in Section 2.13) and to quantify the cytokines IL-2 and IFN- γ (as described in Section 2.14).

2.13. Bone marrow cells isolation and proliferation

The femur of non-treated mice was excised as described by Grønhaug et al. [41] with modifications [23]. Briefly, the epiphysis was removed, and the bone marrow cells were flushed out using a 23-gauge needle and RPMI 1640 with 5% FBS. The suspension was filtered with a sterile wire mesh and centrifuged at $300 \times g$, at 4 °C for 5 min. Then, the cells were suspended in RPMI 1640 with 5% FBS, plated at 5×10^5 cells/well and incubated for 48h. Next, the cell plate was centrifuged at $300 \times g$ and 4 °C for 10 min and the culture supernatant from lymphocytes isolated from mice previously treated with FB-LM were added to each well. After 72h, the cell plate was centrifuged and the cell proliferation was determined by counting in a Neubauer chamber.

2.14. Quantification of cytokines

The interleukins IL-1 β , IL-12 and IL-10 levels were quantified by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (Sigma-Aldrich®) in the supernatant of macrophages incubated with FB-LM at 25, 50, 100 and 250 $\mu\text{g/mL}$ for 48h and in the peritoneal fluid from mice orally treated with FB-LM as described in Section 2.3, following the manufacturer's instructions.

Lymphocytes from mice orally treated with FB-LM as earlier described were plated at 3×10^5 cell/well in presence of ConA for 72h. The cytokines IL-2 and IFN- γ were quantified in the supernatant by ELISA Kits following the manufacturer's instructions. The values were compared to a standard curve for each cytokine.

2.15. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism 8.0.1.244 program. First, the D'Agostino and Pearson, Shapiro-Wilk and Kolmogorov-Smirnov tests were applied to confirm the normal distribution of the data. Next, the results were submitted to t test or analysis of variance (ANOVA) test, followed by Tukey's test for average comparison. Experimental values were expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM) or mean $\pm$ standard deviation (SD) of at least two independent experiments in duplicate or triplicate. Significance was defined as $p < 0.05$.

3. Results and discussion

3.1. De-esterification of FB

The high methoxyl pectin (DM 56.2%) from broccoli stalk (FB) triggered activation of an apparent anti-inflammatory profile of macrophages [23]. Here, FB was chemically de-esterified to obtain a low DM (LM) polymer to compare its effects in respect to the native form. As demonstrated in Fig. 1., FT-IR, after FB modification, the resulting pectin, named as FB-LM, had a DM of 20.8%. The immunomodulatory properties of FB-LM were investigated, evaluating its effects on macrophages and lymphocytes *in vitro* or after oral treatment of mice.

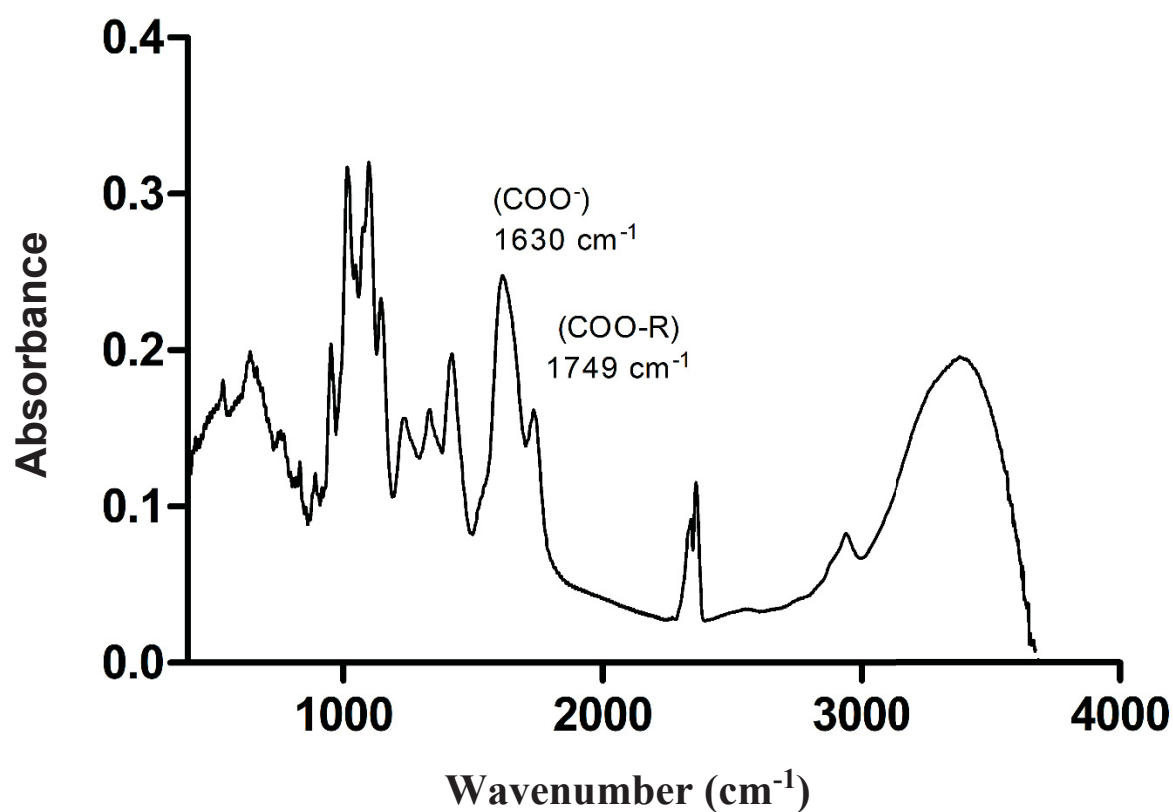


Fig.1. FT-IR spectra showing the bands of methyl-esterified and unesterified carboxyl groups of GalA units for the de-esterified pectin FB-LM.

3.2. Effects of FB-LM on viability, morphology, eliciting and phagocytic activity of peritoneal macrophages

As shown in Fig. 2, FB-LM did not affect the viability of macrophages at concentrations up to 750 $\mu\text{g/mL}$. It had been previously observed that native FB has low cytotoxicity for these cells, with a slight reduction in viability ($\sim 28\%$) only at the highest concentration evaluated (750 $\mu\text{g/mL}$) [23]. Thus, the decrease in the DM did not significantly modify the cytotoxicity to peritoneal macrophages.

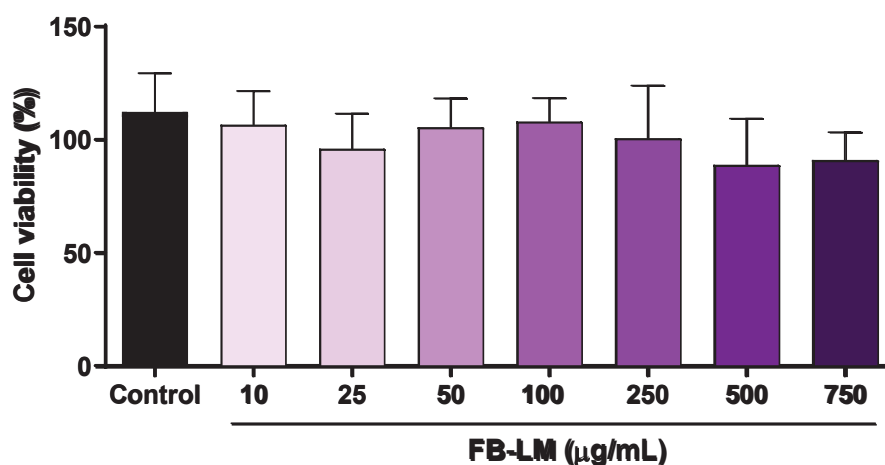


Fig. 2. Effect of FB-LM on viability of peritoneal macrophages. Cells were incubated with FB-LM for 48h. Culture medium was used as control, corresponding to 100% viability. The results are expressed as mean $\pm$ SD (n= 2, each experiment in triplicate), ANOVA $p < 0.05$ significant difference from the control group.

In the same way as found for FB-LM [23], other studies have shown that pectins had low toxicity to macrophage cells. Amorim et al. [25] observed that pectin isolated from the husk of *Theobroma cacao* L. (OP) and its partially deacetylated and de-esterified form (MOP) showed low toxicity to mouse peritoneal macrophages in the same conditions of the present study. OP (25 to 400 $\mu\text{g/mL}$) did not show any cytotoxic effects and MOP at 400 $\mu\text{g/mL}$ decreased cell viability by $\sim 20\%$ in respect to control. The pectin extracted from okra by Xiong et al. [42] with a low DM (46.5%) did not show cytotoxicity for RAW 264.7 macrophages at concentrations of 25 to 800 $\mu\text{g/mL}$. Wu et al. [3] found that pectin extracted from residues of *Rosa Setate* x *Rosa Rugosa*, composed of non-esterified galacturonic acid units, had a stimulating effect on the proliferation of RAW 264.7 at concentrations of 25 to 200 $\mu\text{g/mL}$ after 24h.

Considering that native FB increased the number of mice activated macrophages *in vitro* and *in vivo* [23], we investigated if FB-LM would have the same ability. Therefore, the concentrations of 25, 50, 100 and 250 µg/mL were chosen to the next *in vitro* experiments.

The morphology of macrophages can be altered when these cells are exposed to certain molecules capable of activating them. In the present study, in both evaluated conditions, FB-LM increased the number of activated macrophages in relation to resident cells. The main differences between resident (increased nucleus relative to cytoplasm and absence of vacuoles) and activated macrophages (spreading cytoplasm, presence of vacuoles and hair-like membrane protrusions [43]) are highlighted. It can be seen in Figure 3A the morphology of peritoneal macrophages after *in vitro* incubation with 25-250 µg/mL FB-LM and in Fig. 3C its morphology after oral treatment of mice with 200 mg/kg FB-LM for 5 days. In addition, these cells were counted and the results are shown as the percentage of activated macrophages related to the total counted macrophages (Fig. 3B-D).

The number of macrophages with a morphological activated profile reached 70% after incubation with 250 µg/mL FB-LM for 48h in relation to the control group. In respect to oral treatment of mice with FB-LM, the difference in the morphology of these animal's macrophages in relation to the control group reached 170%, being 2.4 times greater than that observed for the *in vitro* evaluation.

The native FB at 250 µg/mL, under the same conditions, increased the number of macrophages morphologically activated in relation to the control group by 67.2%; when administered orally, the native FB increased by 118% [23]. Comparing these results with FB-LM, it is possible to infer that the de-esterification of FB caused higher morphological activation of macrophages than native FB, particularly after oral treatment.

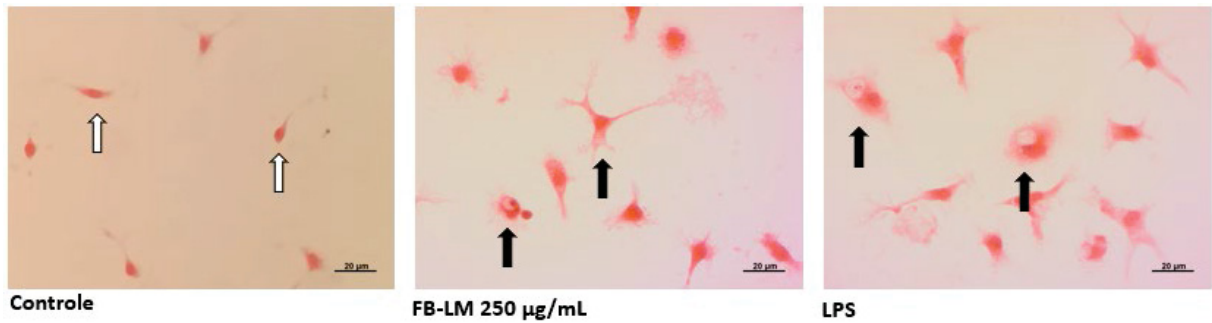
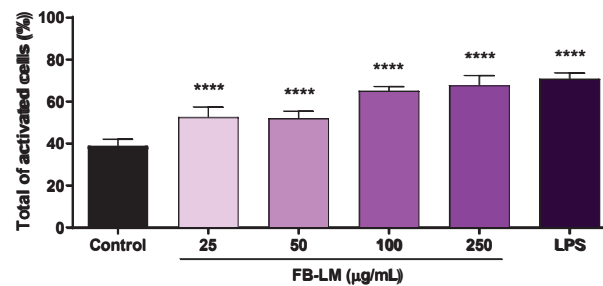
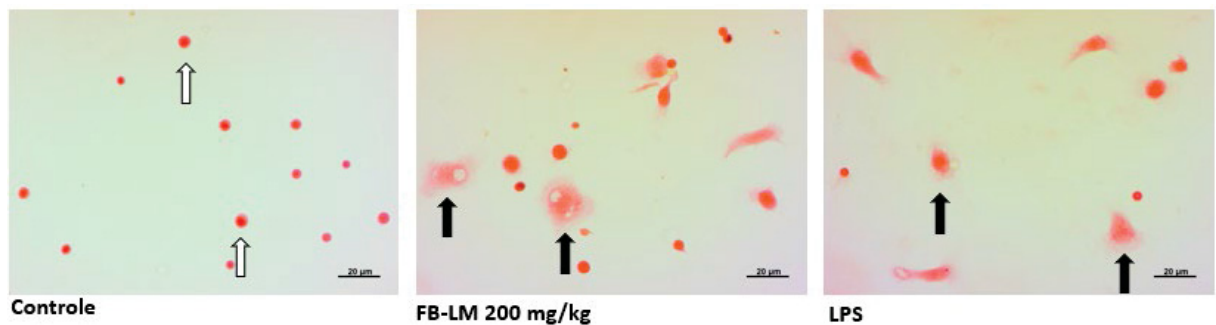
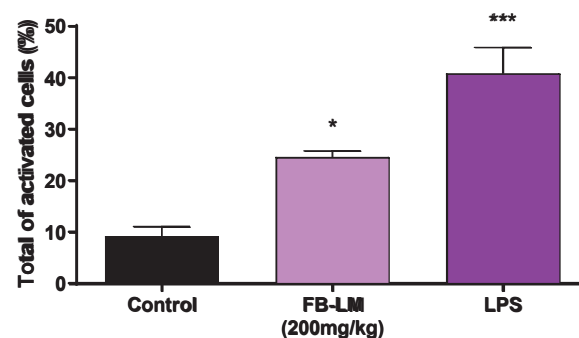
A**B****C****D**

Fig 3. Morphology of peritoneal macrophages after incubation with FB-LM or treatment of mice with the polymer. A) Representative micrographs (400 $\times$) of peritoneal macrophages incubated with culture medium (control), FB-LM or LPS (positive control). B) Percentage of activated macrophages in relation to the total counted macrophages after incubation with culture medium, FB-LM or LPS. C) Representative micrographs (400 $\times$) of peritoneal macrophages from mice orally treated with PBS, FB-LM or intraperitoneally treated with LPS. D) Percentage of activated macrophages in relation to the total counted macrophages obtained from mice orally treated with PBS, FB-LM or intraperitoneally treated with LPS. Black arrows show macrophages with activated features, and empty arrows show macrophages with resident features. The results are expressed as mean $\pm$ SD (n = 5, each experiment in triplicate). * p < 0.05, *** p < 0.001 and **** p < 0.0001.

These findings are similar to those found for other pectins and an arabinogalactan. Amorim et al. [25] compared two pectin fractions extracted from *Theobroma cacao* and evaluate the macrophage activation by morphology analysis. The authors also observed a higher effect for the pectin with the lowest degree of esterification (MOP) (~20.8%) at 100 and 200 µg/mL after incubation for 48h. Iacomini et al. [44] showed that a RG-I with arabinogalactan branches from the fruit pulp of *Spondias cytharea* at 50 µg/mL increased the number of activated peritoneal macrophages by 20% compared to control group after incubation of 48h. Moretão et al. [45] verified that the acidic heteropolysacchride (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco) was able to increase the number of morphologically activated macrophages (up to 75%) at 250 and 500 mg/kg after oral treatment of mice for 7 days.

Simas-Tosin et al. [46], studying an arabinogalactan isolated from peach pulp (AE-AG), found immunostimulatory activity in peritoneal macrophages. The results indicated that 70% of the cells treated with this fraction (1–50 µg/mL) for 48h had morphology corresponding to that of activated cells, an increase of 75% compared to control.

Another way of observing the ability of pectins to modulate macrophages *in vivo* is through the recruitment of these cells to the peritoneum after intraperitoneal injection of the polymer. The recruited macrophages may present a pro- or anti-inflammatory profile as observed for FB-LM (200 mg/kg) administered intraperitoneally after 24h. There was an increase of 318% in the number of peritoneal cells compared to the control group (Fig. 4A). In addition, the morphological analysis by optical microscopy showed that, after intraperitoneal treatment with FB-LM, there was a 30.1% increase in the number of morphologically activated macrophages compared to the control (Fig. 4B). Similarly, the native FB [23] was able to recruit macrophages to peritoneal cavity after 24h of 200 mg/kg FB intraperitoneal injection in mice, an increase of 490% in respect to the control group. The number of cells with activated profile was 251% higher than in the control group. This ability is common among vegetable polysaccharides. The acidic heteropolysacchride (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco) at 200 mg/kg (24h) increased by 88% the number of macrophages in the peritoneal cavity of mice in respect to control [37]. The pectic acidic polysaccharide FL-1a-I isolated from fruit of *F. limonia* (Linn.) at 100mg/kg (24h) increased by ~56% the number of these cells intraperitoneally comparing to control [47].

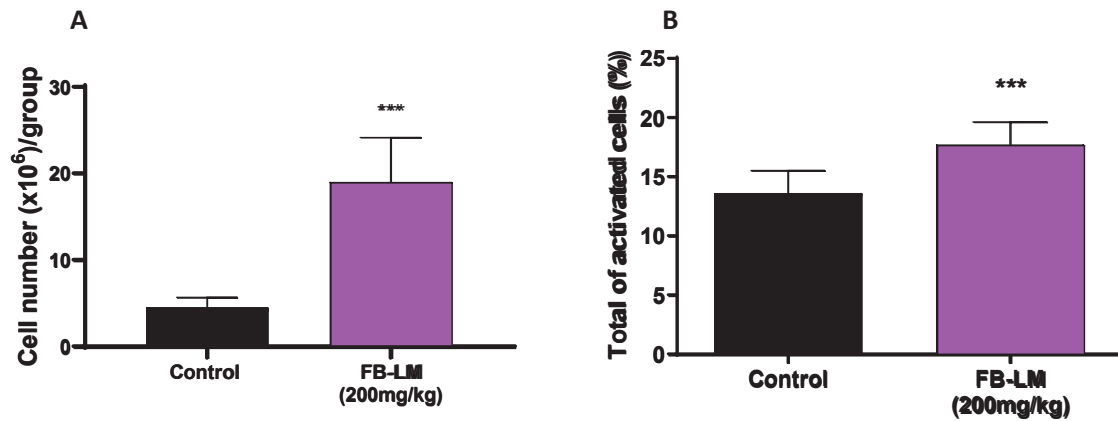


Fig 4. Effect of intraperitoneal administration of FB-LM on recruitment of cells to peritoneal cavity and eliciting activity. A) Number of peritoneal macrophages. B) Total of activated peritoneal macrophages following 24 h of sterile PBS (control) and FB-LM administration. The results are expressed as mean $\pm$ SD (n= 5, each experiment in triplicate). *** p < 0.001.

As the macrophages had morphological characteristics of activation after FB-LM treatment, the phagocytic activity was investigated. The phagocytic activity of peritoneal macrophages was determined from the ratio of phagocytized yeast/macrophages after incubation with FB-LM for 48h or after oral treatment of mice with FB-LM for 5 days. It is possible to observe that in all concentrations of FB-LM (25-250 μ g/mL) there was a significant increase in the phagocytic activity related to control, reaching ~87% at the highest concentration (Fig. 5A-B). In comparison with FB [23], whose increase in the phagocytic activity was ~17% in respect to control, FB-LM was 5 times more effective at the same concentration (250 μ g/mL). A similar profile was observed after oral treatment of mice with FB-LM. As shown in Fig. 5C-D, FB-LM augmented the macrophage phagocytic activity by ~38,4% in respect to the control group.

A pectic polysaccharide from *Cucurbita moschata* Duch highly methyl-esterified increased by ~65% the phagocytic capacity of RAW 264.7 macrophages in the concentrations up to 250 μ g/mL after 24h in respect to the control group [48]. An homogalacturonan with ~85% DM from *Hippophae rhamnoides* L. berry orally administered for 14 days on tumor-bearing mouse augmented the peritoneal macrophage phagocytic activity by 45, 57 and 63% at 50, 100 and 200 mg/kg, respectively [49].

Treatment with FB-LM augmented the number of morphologically activated macrophages and their phagocytic activity as observed for the native polysaccharide (FB) [23]. However, this can occur through different pathway. It is widely known that macrophages have plasticity to change their phenotype to exert pro- (M1) or anti-inflammatory (M2) profile

depending on the stimulus, and their phagocytic activity follow these changes and has different purposes as well [50]. The phagocytic receptors are molecular determinants to indicate if these cells will be activated by one pathway or another. Opsonin receptors, as immunoglobulin Fc receptors, for example, are involved in pro-inflammatory phagocytic events; on the other way, mannose receptor (ManR)-mediated phagocytosis is related to an anti-inflammatory profile [51,52]. To gain knowledge about the activation pathway of these cells after treatment with the pectin FB-LM, some cytokines synthesized in the phenotypes M1 (IL-1beta and IL-12) and M2 (IL-10) and the production of nitric oxide (NO) were quantified.

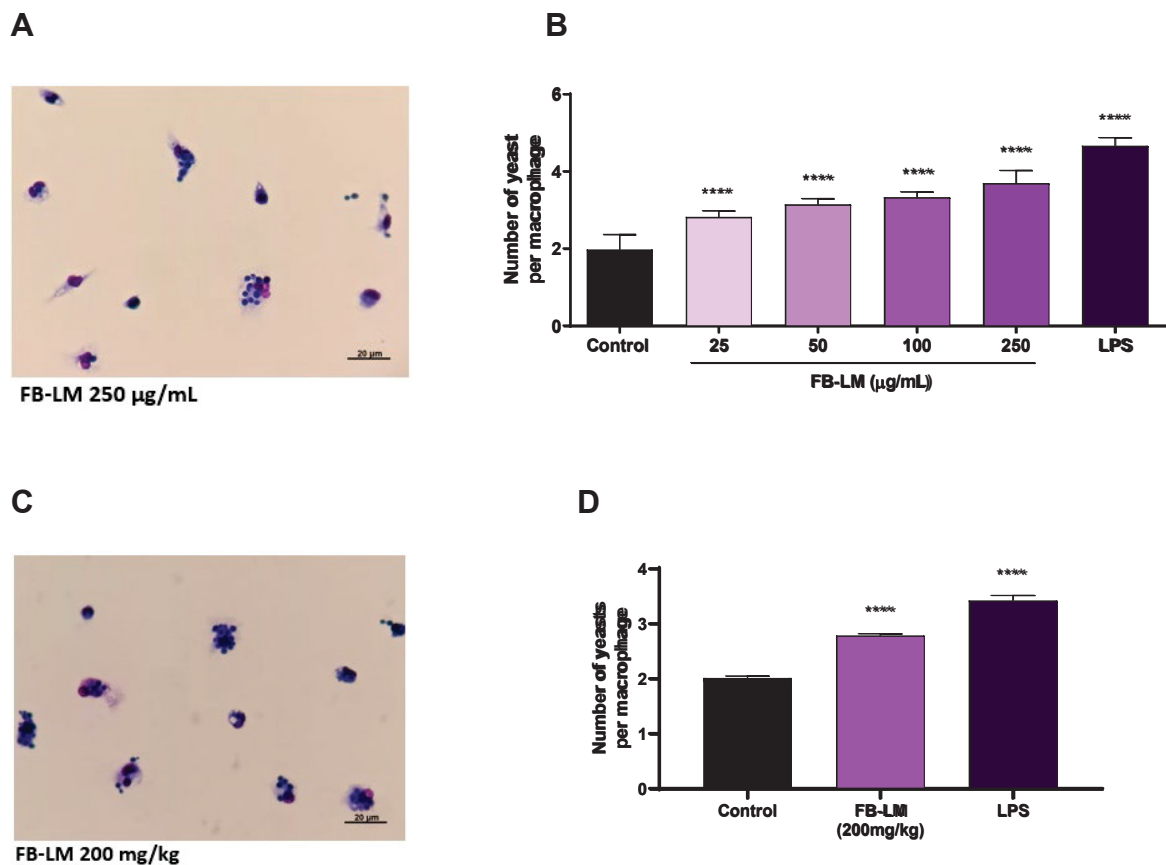


Fig. 5. Effect of FB-LM on phagocytic activity of peritoneal macrophages. A) Representative micrography (400×) of phagocytic activity of peritoneal macrophages after incubation with 250 µg/mL FB-LM for 48h. B) Ratio of phagocytized yeasts/macrophages after incubation with culture medium (control), different concentrations of FB-LM or LPS (positive control). C) Representative micrography (400×) of phagocytic activity of peritoneal macrophages from mice orally treated with 200 mg/kg FB-LM. D) Ratio of phagocytized yeasts/macrophages from mice orally treated with PBS (control), FB-LM or intraperitoneally treated with LPS. The results are expressed as mean ±SD (n=2, each experiment in triplicate). **** p < 0.0001.

3.3. Effect of FB-LM on nitric oxide and interleukins IL-1 β , IL-12 and IL-10 production by macrophages

FB-LM was able to induce the production of nitric oxide (NO) by the peritoneal macrophages of mice at 10-750 $\mu\text{g/mL}$ after 48h, overcoming the stimulus caused by the treatment with LPS (100 ng/mL), a lipopolysaccharide from the outer membrane of gram-negative bacteria, known as an immunostimulant in cell assays and used as a positive control in this experiment (Fig. 6A). After oral administration of FB-LM, the same pattern in NO production was observed, reaching 516% related to control (Fig. 6B). In contrast, native FB did not stimulate NO release under the same conditions [23]. This is strong evidence that de-esterification produced a polymer with structural characteristics different from the native one, favoring the observation of the opposite biological effect.

NO is an important effector molecule involved in pathogen killing, produced by the enzyme iNOS in response to certain toll like receptors activation (TLR) in M1 macrophages [53]. It is known that, besides NO production, macrophages with pro-inflammatory profile (M1) produce a variety of pro-inflammatory cytokines and chemokines. Their quantification may help to identify the peritoneal macrophage phenotype in response to FB-LM. Thus, IL-1 β and IL-12, well known pro-inflammatory cytokines, and IL-10, an anti-inflammatory cytokine were quantified.

The results of these quantifications are represented in Figure 6. FB-LM treatment increased IL-1 β levels after incubation of macrophages at 100 and 250 $\mu\text{g/mL}$ for 48h (Fig. 6C), but it was not detected after *in vivo* treatment (Fig. D). Although, to IL-12, only oral treatment (200 mg/kg) was capable of increasing the amount of this interleukin (Fig. 6F). In respect to IL-10, FB-LM did not alter its releasing *in vitro* (Fig. 6G), but reduced the levels of this anti-inflammatory interleukin after oral treatment of mice (Fig. 6H), being contrary to observed to native FB treatment *in vivo* [23], that increased at 1.6 times the levels of IL-10 macrophages in mice treated with the polymer.

As macrophage activation is strongly dependent on the polymer conformation, it is clear that the decrease in the DM, from high methoxyl (HM) to low methoxyl (LM) of native FB resulted in a polymer structurally favorable to specific macrophage activation. This suggestion is supported by the production of nitric oxide, some pro-inflammatory interleukins and by the decrease in the production of IL-10, an important anti-inflammatory interleukin, in the supernatant of macrophages treated with FB-LM or from mice treated with the polymer, which demonstrates a radical change in macrophage modulation compared to FB [23]. The lack of

stimulus to the production of IL-1 β *in vivo* could be due to the peculiarities of peak production and time of action of this interleukin in the organism, as well as its concentration in the peritoneal exudate [54].

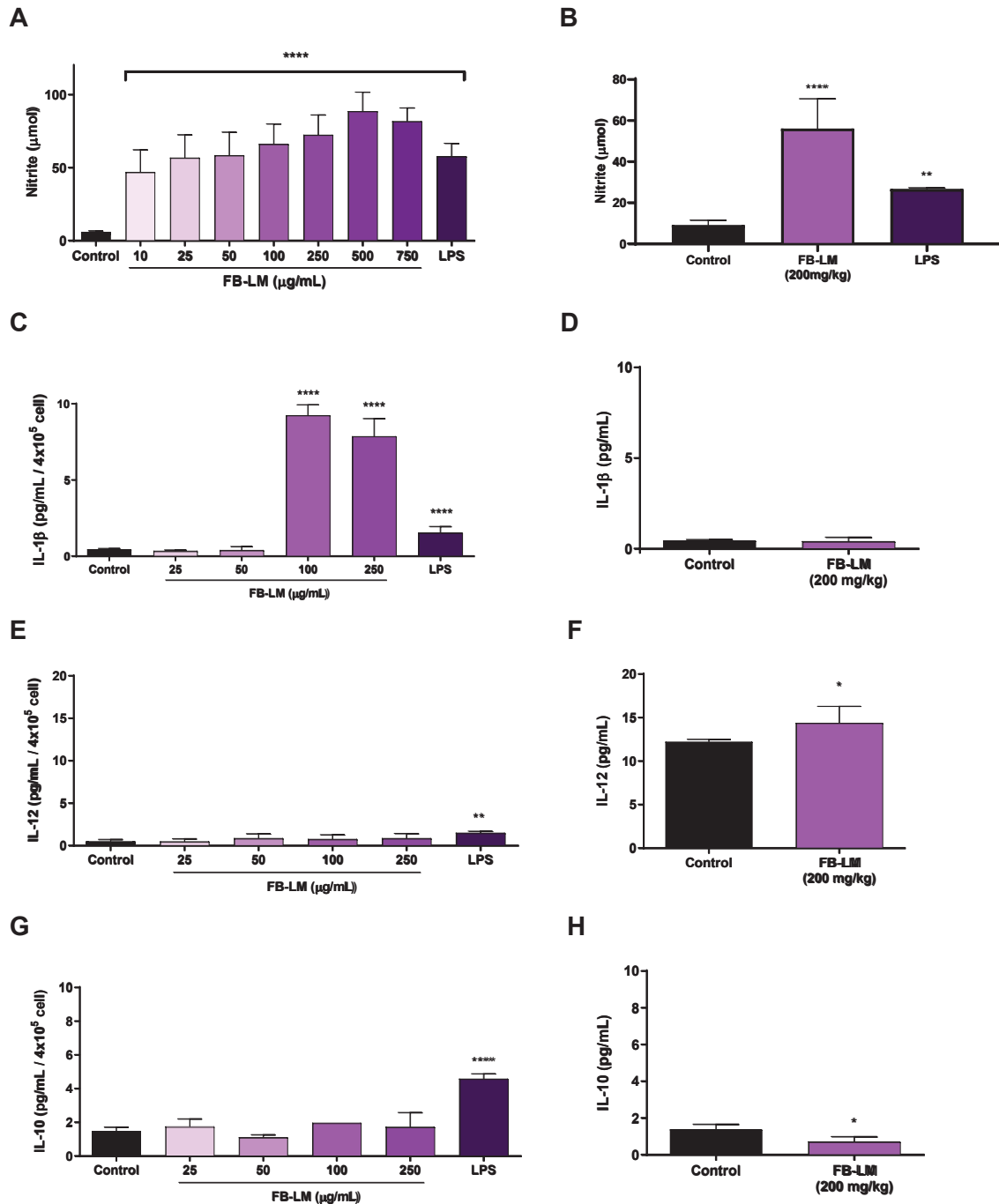


Fig. 6. Effect of FB-LM on production of pro and anti-inflammatory mediators by peritoneal macrophages. A) NO production by macrophages incubated with culture medium (control), FB-LM or LPS (positive control) for 48h, B) NO production by macrophages from orally treated mice with FB-LM, C) IL-1 β production by macrophages incubated with culture medium, FB-LM or LPS, D) IL-1 β production by macrophages from orally treated mice with FB-LM, E) IL-12 production by macrophages incubated with culture medium, FB-LM or LPS, F) IL-12 production by macrophages from orally treated mice with FB-LM, G) IL-10 production by macrophages incubated with culture medium, FB-LM or LPS, H) IL-10 production by macrophages from orally treated mice with FB-LM. The results are expressed as mean $\pm$ SD ($n = 2$ (*in vitro*) and $n = 5$ (*in vivo*), each experiment in duplicate or triplicate). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and **** $p > 0.0001$.

As found in the present study, Amorim et al. [25] observed NO production only after treatment of peritoneal macrophages with the LM (20.8%) pectin (MOP) from *Theobroma cacao*, an increase of ~250% in respect to control. This fraction was able of increase IL-12 levels by 95% in respect to control at 200 µg/mL, while the fraction with high DM (OP) did not. However, differently from FB-LM, MOP was also capable of increasing IL-10 levels, indicating that this fraction stimulates both pro- and anti-inflammatory responses.

Ho et al. [26] performed the de-esterification of pectic polysaccharides extracted from elderberry (*Sambuci flos*), a medicinal plant with anti-inflammatory properties. The pectic fractions with lower DM showed an increase in complement fixation activity as well as in the production of nitric oxide by macrophages of the RAW 264.7 cell line. As suggested by these researchers, the reduction in the DM of FB (FB-LM) may have potentiated the pro-inflammatory activity of the polymer, which can be evidenced by the increase in NO, IL-1 β e IL-12 levels.

3.4. Effect of FB-LM on expression of the macrophage surface markers CD80 and CD206

To confirm the changes in macrophage phenotype after treatment of mice with FB or FB-LM, the presence of surface markers CD80 and CD206 was investigated. Analysis by flow cytometry showed that a small percentage (about 12%) of the peritoneal macrophages with bigger size was active and effectively stained by FITC and PE-labeled antibodies (Fig. 7A). Peritoneal macrophages from mice orally treated with FB and FB-LM had a higher CD80⁺/CD206⁺ ratio (5.7 and 3.5 times, respectively) than the control group (Fig. 7B). This demonstrates that these pectins were able to change the expression profile of macrophage surface markers. Surprisingly, both pectins increased CD80 expression, indicating that they are capable of promoting an M1 response. FB was more effective in carrying out this change. These results corroborate the proposition of the pectins absorption by the gastrointestinal tract.

In addition, arginase-1 expression was quantified by these cells after *in vitro* and *in vivo* treatment with FB-LM, to corroborate the understanding of the immunomodulatory profile of this pectin. As shown in Fig. 7C-D, *in vitro* and *in vivo* treatment were not able to increase the expression of the enzyme arginase-1, another indication of the absence of anti-inflammatory activity of this polysaccharide.

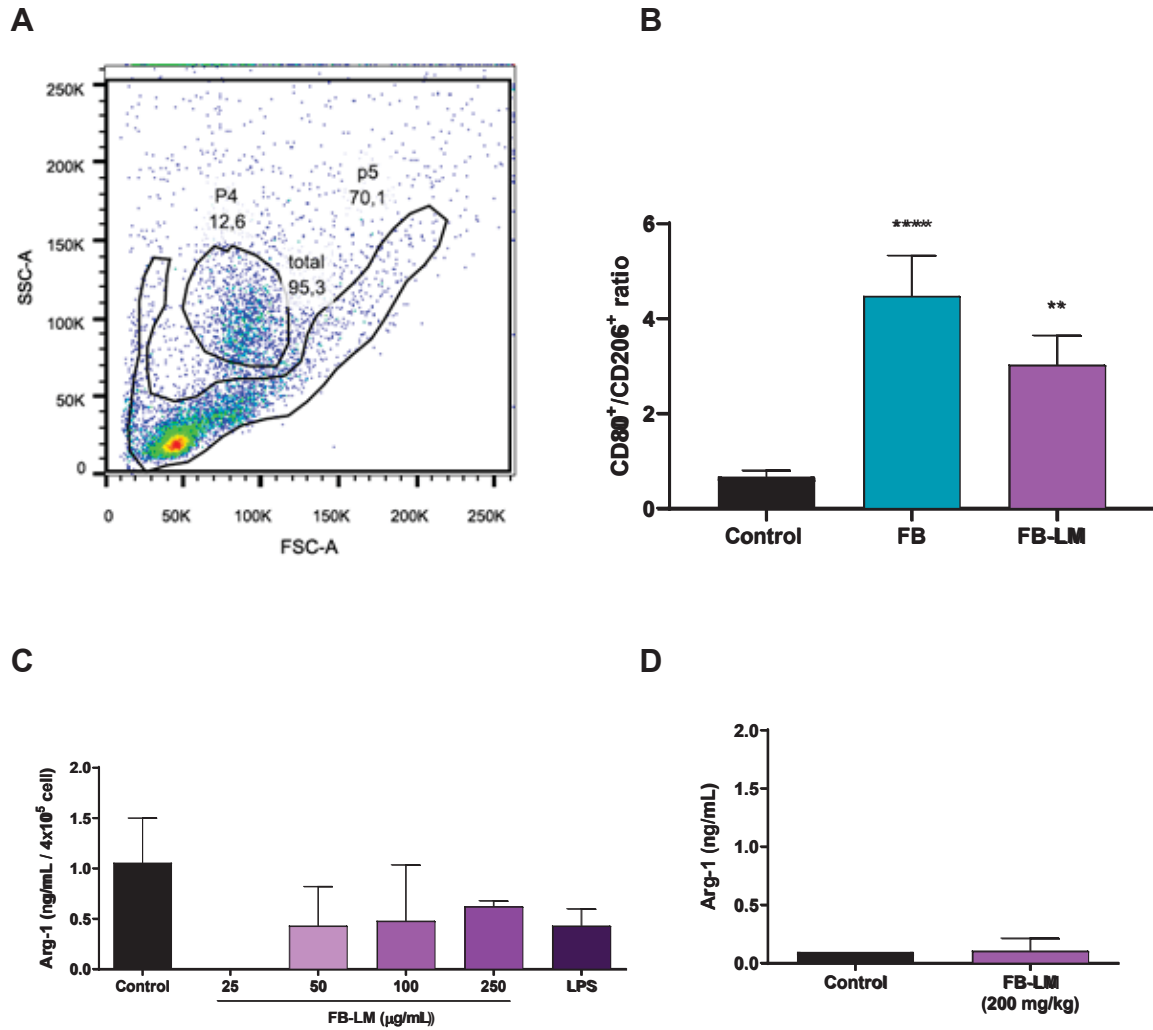


Fig. 7. Effect of FB-LM on expression of pro or anti-inflammatory markers (CD80, CD206 and Arg-1) by peritoneal macrophages after oral treatment of mice and *in vitro* treatment with FB and FB-LM

A) Flow cytometry analysis of p4 (FITC and PE positive) and p5 population (FITC and PE negative). B) Flow cytometry: CD80⁺/CD206⁺ ratio of p4 population macrophages from mice orally treated with PBS (control), FB or FB-LM. C) ELISA: Arg-1 expression by macrophages incubated with culture medium, FB-LM or LPS, H) ELISA: Arg-1 expression by macrophages from orally treated mice with FB-LM. The results are expressed as mean $\pm$ SD (n = 2 (*in vitro*) and n=5 (*in vivo*), each experiment in duplicate). ** p < 0.01 and **** p > 0.0001.

Macrophage polarization is an ability found in polysaccharides extracted from plants, which can exhibit distinct profiles. A nanoparticle of galactomannan from ocust bean gum (0.1% w/v) were able to stimulate the activation of RAW 264.7 macrophages for the alternative pathway (M2) after 24h of incubation. This effect was demonstrated by the decrease in CD80 expression and increase in CD163 expression, although no increase in CD206 expression was observed [63]. The polysaccharide extracted from *Platycodon grandifloras* at 100 µg/mL (24h) induced M1 polarization, which was evidenced by the increase in the expression of CD80 and CD86 [64].

These data demonstrate the need to deepen the understanding of the surface markers expressed by macrophages treated with FB and FB-LM, in order to clarify the activation phenotype promoted by these polymers.

3.5. Effect of FB-LM on lymphocyte proliferation, lymphocyte-mediated bone marrow cell-proliferation and cytokines IL-2 and IFN- γ levels

Since native FB promoted lymphocyte and lymphocyte-mediated bone marrow cell-proliferation [23], it was investigated if FB-LM could exert the same effects on these cells. FB-LM was able to increase by 66.6% the total of lymphocytes isolated from the spleen of mice treated with the polymer (200 mg/kg) for 5 days, in respect to the control group (Fig. 8A). Then, these cells were plated at 3×10^5 cells/well and incubated with concanavalin A (ConA), a mitogen inductor for 72h. As can be seen in figure 8B, an increase of 14% in the cell number related to control was observed. Since ConA is a mitogen for T cells, this result suggests que FB-LM exhibit effect on T lymphocytes [55].

Considering that lymphocytes from mice orally treated with FB-LM were able to maintain the increase in proliferation *in vitro*, the supernatant was utilized to investigate its effect in the proliferation of bone marrow cells from non-treated mice. Figure 8C show an increase of 81.7% in the bone marrow cells proliferation in respect to control, after 72h of incubation. This result evidences the presence of stimulating molecules in the supernatant of lymphocytes obtained from treated animals. The effect was higher than that previously observed for native FB in the same experiment (46%) [23].

It is clear that cytokines that occur naturally in the body and are responsible for stimulating the proliferation of cells of the immune system [56]. In order to investigate possible cytokines produced by lymphocytes after *in vivo* treatment with the pectins FB and FB-LM, which could be involved in the proliferation of bone marrow cells, the level of IL-2 and IFN- γ in the supernatant of these cells was measured. Figure 8D-E shows that in the conditions of the present study, no increase in IL-2 levels was observed for both FB and FB-LM. On the other hand, IFN- γ was increased after treatment of mice with FB-LM by 42.1% but no in the presence of FB (Fig. 8F-G). This result is in agreement with the production of IL-10 after treatment with FB [18] since it inhibits the expression of the cytokines IL-2 and IFN γ [57] while increased levels of IL-1 β and IL-12 have the opposite effect [58]. This finding corroborates the hypothesis that FB-LM is a possible inducer of a pro-inflammatory response.

After a 14-day treatment of mice with a LM pectin from *Codonopsis pilosula* at 200 mg/kg, a significant increase in serum levels of IL-2, TNF- α and IFN γ , known markers of Th1 immune responses, cells were activated to exert a pro-inflammatory activity [59].

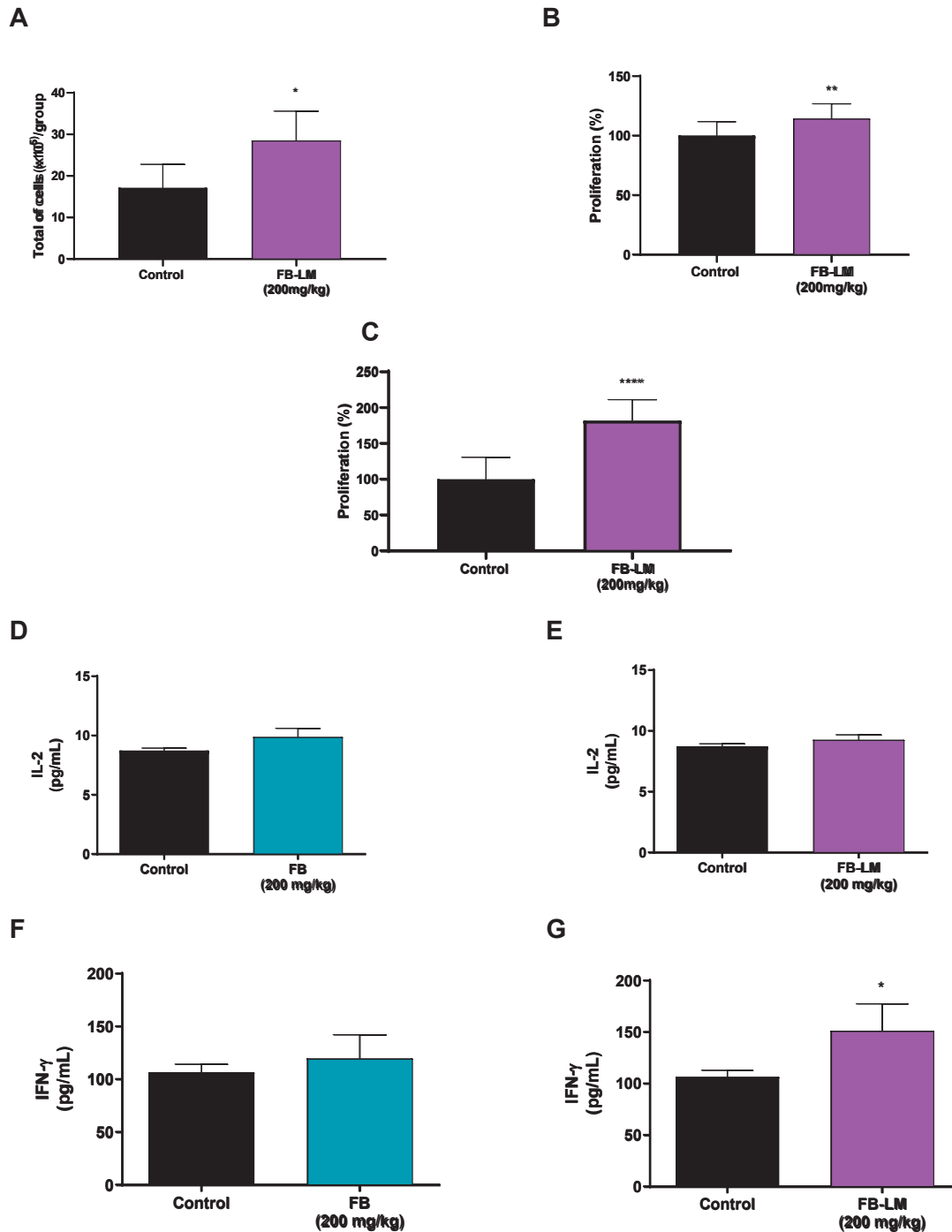


Fig. 8. Effect of FB-LM on lymphocyte proliferation and lymphocyte-mediated bone marrow cell-proliferation. Levels of cytokines from lymphocytes supernatant after native FB and FB-LM treatment of mice. A) Total lymphocytes from spleen of mice orally treated with FB-LM; B) Total lymphocytes from mice orally treated with FB-LM following incubation with ConA for 72h; C) Proliferation of bone marrow cells incubated with culture supernatant of lymphocytes obtained from mice orally treated with FB-LM. D) IL-2 production by macrophages from orally treated mice with native FB. E) IL-2 production by macrophages from mice orally treated with FB-LM. F) IFN- γ production by macrophages from mice orally treated with FB. G) IFN- γ production by macrophages from mice orally treated with FB-LM. PBS was used as treatment control. The results were expressed as mean $\pm$ SD (n= 5). * p < 0.05 ** p < 0.01 and **** p < 0.0001.

It is known that several cytokines may be involved in stimulating the proliferation of lymphocytes and other cells of the immune system, depending on the profile (pro or anti-inflammatory). Interleukin-4, for example, stimulates B cell proliferation in anti-inflammatory processes [60]; growth factor GM-CSF is related to stimulation and transformation of immune cells [61]. Although it has not been verified or evaluated, the immunomodulatory action of FB-LM must be deepened in relation to these and other products secreted by different cells of the immune system.

Taken together, the findings of the present study show a correlation between the parameters evaluated for macrophages and lymphocytes. It seems that decreasing in the DM of the pectin could enhance its pro-inflammatory activity. The removal of methyl-ester groups exposes charged groups which affect the conformation of the polymer and probably its interaction with cell membrane receptors. Future studies are needed in order to verify how the positioning of methyl-esters along the pectin chain could influence the polymer conformation, its binding to receptors on the surface of immune cells and the triggered effects in immunity.

4. Conclusion

The present study showed that a LM pectin (FB-LM), obtained after alkaline de-esterification of FB (DM 56%), was effective to modulate mouse peritoneal macrophages and spleen lymphocytes. The immunomodulatory activity after oral treatment suggests that this biopolymer can be absorbed by the gastrointestinal tract of mice.

FB-LM induced pro-inflammatory effects, not evident in native pectin (FB) with a high degree of methyl-esterification. The decrease in the degree of methyl-esterification and consequent increase in the negatively charged carboxylic groups can alter the interaction with receptors on the surface of immune cells and modify their activation profile.

Acknowledgements

This study was supported by the Brazilian research funding agencies CNPq and CAPES. G.R.M. was also supported by *INCT de Processos Redox em Biomedicina – Redoxoma*.

References

- [1] S. T. Minzanova, V. F. MIRONOV, D. M. Arkhipova, A. V. Khabibullina, L. G. Mironova, Y. M. Zakirova, V. A. Milyukov, Biological Activity and Pharmacological Application of Pectic Polysaccharides: A Review, *Polymers*, 10 (2018). <https://doi.org/10.3390/polym10121407>
- [2] X. Chen, Y. Wang, M. Shena, Q. Yu, Y. Chena, L. Huang, J. Xie, The water-soluble non-starch polysaccharides from natural resources against excessive oxidative stress: a potential health-promoting effect and its mechanisms, *International Journal of Biological Macromolecules*, 171 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.01.022>
- [3] M. Wu, W. Li, Y. Zhang, L. Shi, Z. Xu, W. Xia, W. Zhang, Structure characteristics, hypoglycemic and immunomodulatory activities of pectic polysaccharides from *Rosa setata* x *Rosa rugosa* waste, *Carbohydrate Polymers*, 253 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117190>
- [4] E.G. Maxwell, N.J. Belshaw, K.W. Waldron, V.J. Morris, Pectin – an emerging new bioactive food polysaccharide, *Trends Food Sci. Technol.* 24 (2012) 64–73. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.11.002>.
- [5] S. V. Popov, Y. S. Ovodov, Polypotency of the immunomodulatory effect of pectins, *Biochemistry (Moscow)*, 78:7 (2013). <https://doi.org/10.1134/S0006297913070134>
- [6] L. Wang, L. Zhao, F-I Gong, C. Sun, D-d Du, X-x Yang, X-I Guo, Modified citrus pectin inhibits breast cancer development in mice by targeting tumor-associated macrophage survival and polarization in hypoxic microenvironment, *Acta Pharmacologica Sinica* (2022). <https://doi.org/10.1038/s41401-021-00748-8>
- [7] J. Choi, C. S. Ki, Ultrasonication, immune activity, and photocrosslinked microgel formation of pectic polysaccharide isolated from root bark of *Ulmus davidiana* var. japonica (Rehder) Nakai, *International Journal of Biological Macromolecules* 211 (2022) 535–544. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.05.074>
- [8] H. Hamai, K. Abdoun-Ouallouche, A. Nacerkhodja, K. Abdelhafid, A. Djefal-Kerrar, Production of modified pectins as anti-cancer agents from orange peel, *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 29 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2023.100348>
- [9] L. Leclere, M. Fransolet, P. Cambier, S. El Bkassiny, A. Tikad, M. Dieu, S. P. Vincent, P. Van Cutsem, C. Michiels, Identification of a cytotoxic molecule in heat-modified citrus pectin, *Carbohydrate Polymers*, 137 (2016), 39-51. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.10.055>

- [10] C. Ramachandran, B. Wilk, S. J. Melnick, I. Eliaz, Synergistic antioxidant and anti-inflammatory effects between modified citrus pectin and honokiol, *Evid Based Complement Alternat Med* (2017)/ <https://doi.org/10.1155/2017/8379843>
- [11] F. O. Ogutu, T-H. Mu, H. Sun, M. Zhang, Ultrasonic modified sweet potato pectin induces apoptosis like cell death in colon cancer (HT-29) cell line, *Nutr Cancer*, 70:1 (2018), 136-145. <https://doi.org/10.1080/01635581.2018.1406123>
- [12] H.J. Suh, H.S. Yang, K.S. Ra, D.O. Noh, K.H. Kwon, J.H. Hwang, K.W. Yu, Peyer's patch-mediated intestinal immune system modulating activity of pectic-type polysaccharide from peel of Citrus unshiu, *Food. Chem.* 138 (2013) 1079–86. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.091>.
- [13] H. Kim, K-W. Yu, H-D. Hong, K.-S. Shin, Effect of arabinoxylan- and rhamnogalacturonan I-rich polysaccharides isolated from young barley leaf on intestinal immunostimulatory activity, *J. Funct. Foods*, 35 (2017) 384–390. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.05.052>.
- [14] B. W. Guess, M. C. Scholz, S. B. Strum, R. Y. Lam, H. J. Johnson, R. I. Jennrich, Modified citrus pectin (MCP) increases the prostate-specific antigen doubling time in men with prostate cancer: a phase II pilot study, *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, v. 6, 2003. <http://doi.org/10.1038/sj.pcan.4500679>
- [15] D. Seely, J.K. Ennis, E. McDonell, L. Zhao, Naturopathic oncology care for thoracic cancers: a practice survey, *Integr. Cancer Ther.* 17 (2018) 793–805. <https://doi.org/10.1177/1534735418759420>.
- [16] S. Bi, Y. Jing, Q. Zhou, X. Hu, J. Zhu, Z. Guo, L. Song, R. Yu, Structural elucidation and immunostimulatory activity of a new polysaccharide from *Cordyceps militaris*, *Food Funct.*, 9 (2018) 279–293. <https://doi.org/10.1039/C7FO01147D>
- [17] S. Agrawal, S. Gupta, A. Agrawal, Human Dendritic Cells Activated via Dectin-1 Are Efficient at Priming Th17, Cytotoxic CD8 T and B Cell Responses, *Plos One* (2010). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013418>
- [18] A. Mantovani, A. Sica, Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity, **Current Opinion in Immunology**, 22 (2010), 231–237. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.01.009>
- [19] Y. Wang, W. Smith, D. Hao, B. He, L. Kong, M1 and M2 macrophage polarization and potentially therapeutic naturally occurring compounds, *International Immunopharmacology* 70 (2019) 459–466. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.02.050>

- [20] H. Wang, T. Gao, Y. Du, H. Yang, L. Wei, H. Bi, W. Ni, Anticancer and immunostimulating activities of a novel homogalacturonan from *Hippophae rhamnoides* L. Berry, Carbohydr. Polym. 131 (2015) 268–296. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00232>.
- [21] B. C. Panda, S. Mondal, K. S. P. Devi, T. K. Maiti, S. Khatua, K. Acharya, S. S. Islam, Pectic polysaccharide from the green fruits of *Momordica charantia* (Karela): structural characterization and study of immunoenhancing and antioxidant properties, Carbohydrate Research 401 (2015) 24–31. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2014.10.015>
- [22] Q. Li, F. Zhang, G. Chen, Y. Chen, W. Zhang, G. Mao, T. Zhao, M. Zhang, L. Yang, X. Wu, Purification, characterization and immunomodulatory activity of a novel polysaccharide from *Grifola frondosa*, International Journal of Biological Macromolecules 111 (2018) 1293–1303. <https://doi.org/10.1016/j.ilbiomac.2018.01.090>
- [23] B. Busato, E. C. A. Abreu, C. L. de O. Petkowicz, G. R. Martinez, G. R. Noleto, Pectin from Brassica oleracea var. italica triggers immunomodulating effects in vivo. International Journal of Biological Macromolecules, 161 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.051>
- [24] H. Salman, M. Bergman, M. Djaldetti, J. Orlin, H. Bessler, Citrus pectin affects cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells, Biomed. Pharmacother. 62 (2008) 579–582. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2008.07.058>.
- [25] J.C. Amorim, L.C. Vriesmann, C.L.O Petkowicz, G.R. Martinez, G.R. Noleto, Modified pectin from *Theobroma cacao* induces potent pro-inflammatory activity in murine peritoneal macrophage, Int. J. Biol. Macromol. 92 (2016) 1040–1048. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.08.015>.
- [26] G. T. T. Ho, Y-F. Zou, T. H. Aslaksen, H. Wangenstein, H. Barsett, Structural characterization of bioactive pectic polysaccharides from elderflowers (Sambuci flos), Carbohydr Polym. 135 (2016) 128–37. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.08.056>
- [27] G. T. T. Ho, Y-F. Zou, H. Wangenstein, H. Barsett, RG-I regions from elderflower pectins substituted on GalA are strong immunomodulators, Int J Biol Macromol, 92 (2016) 731–738. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.07.090>
- [28] L. M. Vogt, N. M. Sahasrabudhe, U. Ramasamy, D. Meyer, G. Pullens, M. M. Faas, K. Venema, H. A. Schols, P. de Vos, The impact of lemon pectin characteristics on TLR activation and T84 intestinal epithelial cell barrier function, Journal of Functional Foods, 22 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.02.002>

- [29] N. M. Sahasrabudhe, M. Beukema, L. Tian, B. Troost, J. Scholte, E. Bruininx, G. Bruggeman, M. van den Berg, A. Scheurink, A. Schols, M. M. Faas, P. de Vos, Dietary fiber pectin directly blocks Toll-like receptor 2–1 and prevents doxorubicin-induced ileitis, *Frontiers in Immunology*, 9 (2018). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00383>
- [30] M. Beukema, R. Akkerman, É. Jermendi, T. Koster, A. Laskewitz, C. Kong, H. A. Schols, M. M. Faas, P. de Vos, The impact of the level and distribution of methyl-esters of pectins on TLR2-1 dependent anti-inflammatory responses, *Carbohydrate Polymers*, 251 (2021). <https://doi.org/10.1002/mnfr.202100346>
- [31] C. L. L. Petkowicz, P. A. Williams, Pectins from food waste: Characterization and functional properties of a pectin extracted from broccoli stalk, *Food Hydrocolloids*, 107 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105930>
- [32] M. Dubois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, F. Smith, Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.* 28 (1956) 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>.
- [33] A. G. J. Voragen, H. A. Schols, W. Pilnik, Determination of the degree of methylation and acetylation of pectins by H.P.L.C, *Food Hydrocolloids*, 1:1 (1986). [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(86\)80008-X](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(86)80008-X)
- [34] L. C. Vriesmann, C. L. O. Petkowicz, Polysaccharides from the pulp of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*): Structural characterization of a pectic fraction, *Carbohydrate Polymers*, 77 (2009) 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.12.007>
- [35] G.R. Noleto, A.L.R. Mercê, M. Iacomini, P.A.J. Gorin, V.T. Soccol, M.B.M. Oliveira, Effects of a lichen galactomannan and its vanadyl (IV) complex on peritoneal macrophages and leishmanicidal activity, *Mol. Cell. Biochem.* 233 (2002) 73–83. <https://doi.org/10.1023/A:1015566312032>.
- [36] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay of cellular growth and survival: application to proliferate and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods*, 65 (1983) 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- [37] M. P. Moretão, A. R. Zampronio, P. A. J. Gorin, M. Iacomini, M. B. M. Oliveira, Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages activated by an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco), *Immunology Letters* 93 (2004) 189–197. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2004.03.021>
- [38] R. Keller, R. Keist, A. Wechsler, T. P. Leist, P. H. van der Meide, Mechanisms of macrophage-mediated tumor cell killing: a comparative analysis of the roles of reactive

- nitrogen intermediates and tumor necrosis factor, *Int. J. Cancer*, 46 (1990). <http://doi.org/10.1002/ijc.2910460422>
- [39] A. P. Santana-Filho, G. R. Noleto, P. A. J. Gorin, L. M. Souza, M. Iacomini, G. L. Sassaki, GC–MS detection and quantification of lipopolysaccharides in polysaccharides through 3-O-acetyl fatty acid methyl esters, *Carbohydrate Polymers*, 87:4 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.11.073>
- [40] L. Lin, P. Wang, Z. Du, W. Wang, Q. Cong, C. Zheng, C. Jin, K. Ding, C. Shao, Structural elucidation of a pectin from flowers of *Lonicera japonica* and its antipancreatic cancer activity, *International Journal of Biological Macromolecules* 88 (2016) 130–137. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.03.025>
- [41] T. E. Grønhaug, H. Kiyohara, A. Sveaass, D. Diallo, H. Yamada, B. S. Paulsen, Beta-D-(1 →4)-galactan-containing side chains in RG-I regions of pectic polysaccharides from *Biophytum petersianum* Klotzsch. contribute to expression of immunomodulating activity against intestinal Peyer's patch cells and macrophages, *Phytochemistry* 72 (2011) 2139–2147. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.08.011>
- [42] B. Xiong, W. Zhang, Z. Wu, R. Liu, C. Yang, A. Hui, X. Huang, Z. Xian, Preparation, characterization, antioxidant and anti-inflammatory activities of acid-soluble pectin from okra (*Abelmoschus esculentus* L.), *International Journal of Biological Macromolecules*, 181 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.03.202>
- [43] X. Xu, D-C. Bi, C. Li, W-S. Fang, R. Zhou, S-M. Li, L-L. Chi, M. Wan, L-M. Shen, Morphological and Proteomic Analyses Reveal that Unsaturated Guluronate Oligosaccharide Modulates Multiple Functional Pathways in Murine Macrophage RAW264.7 Cells, *Mar. Drugs* 13 (2015) 1798–1818. <https://doi.org/10.3390/md13041798>.
- [44] M. Iacomini, R. V. Serrato, G. L. Sassaki, L. Lopes, D. F. Buchi, P. A. Gorin, Isolation and partial characterization of a pectic polysaccharide from the fruit pulp of *Spondias cytherea* and its effect on peritoneal macrophage activation, *Fitoterapia*, 76 (2005) 676–683. <http://doi.org/10.1016/j.fitote.2005.08.017>
- [45] M.P. Moretão, D.F. Buchi, N.P.A.J. Gori, M. Iacomini, M.B.M. Oliveira, Effect of acidic heteropolysacchride (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco) on peritoneal macrophage functions, *Immunol. Lett.* 89 (2003) 175–185. [https://doi.org/10.1016/S0165-2478\(03\)00136-6](https://doi.org/10.1016/S0165-2478(03)00136-6).
- [46] F.F. Simas-Tosin, A.P.R. Abud, C.C. De Oliveira, P. A. J. Gorin, G.L. Sassaki, D.F. Bucchi, M. Iacomini, Polysaccharides from peach pulp: Structure and effects on mouse peritoneal macrophages, *Food Chemistry*, 134 (2012).

- [47] Y. Saima, A.K. Das, K.K. Sarkar, A.K. Sen, P. Sur, An anti-tumor pectic polysaccharide from *Feronia limonia*, *Int. J. Biol. Macromol.* 27 (2000) 333–335, [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(00\)00134-3](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(00)00134-3).
- [48] L. Huang, J. Zhao, Y. Wei, G. Yu, F. Li, Q. Li, Structural characterization and mechanisms of macrophage immunomodulatory activity of a pectic polysaccharide from *Cucurbita moschata* Duch., *Carbohydrate Polymers*, 269 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118288>
- [49] H. Wang, T. Gao, Y. Du, H. Yang, L. Wei, H. Bi, W. Ni, Anticancer and immunostimulating activities of a novel homogalacturonan from *Hippophae rhamnoides* L. Berry, *Carbohydr. Polym.* 131 (2015) 268–296. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00232>.
- [50] A. V. Kurytnina, M. V. Erokhina, O. A. Makarevich, V. Y. Sysoeva, L. N. Lepekha, S. A. Kuznetsov, G. E. Onishchenko, Plasticity of Human THP–1 Cell Phagocytic Activity during Macrophagic Differentiation, *Biochemistry (Moscow)* 83 (2018) 200–214. <https://doi.org/10.1134/S0006297918030021>
- [51] S. Gordon, F. O. Martinez, Alternative activation of macrophages: mechanism and functions, *Immunity* 32 (2010). <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.05.007>
- [52] V. V. Novoselov, M. A. Sazonova, E. A. Ivanova, A. N. Orekhov, Study of the activated macrophage transcriptome, *Experimental and Molecular Pathology* 99 (2015) 575–580. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexmp.2015.09.014>
- [53] U. Juhas, M. Ryba-Stanistawowska, P. Szargiej, J. Mysliwska, Different pathways of macrophage activation and polarization, *Advances in Hygiene and Experimental Medicine* 69 (2015). <https://doi.org/10.5604/17322693.1150133>
- [54] G. Lopez-Castejon, D. Brough, Understanding the mechanism of IL-1 β secretion, *Cytokine & Growth Factor Rev.* 22(4) (2011) 189–195. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2011.10.001>
- [55] J-M. Anaya, Y. Shoenfeld, A. Rojas-Villarraga, R. A. Levy, R. Cervera, *Autoimmunity – from bench to bedside*, El Rosario University Press (2013).
- [56] D. Metcalf, Hematopoietic cytokines, *Blood*. 111(2) (2008) 485–491. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-03-079681>
- [57] R. Fernandez-Santamaria, P. Satitsuksanoa, Engineered IL-10: a matter of affinity, *Allergy*, 77(3) (2022) 1067–1069. <https://doi.org/10.1111/all.15132>

- [58] G. Trinchieri, Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity, *Nature Reviews Immunology*, 3 (2003) 133-146. <https://doi.org/10.1038/nri1001>
- [59] P. Zhang, L. Hu, R. Bai, X. Zheng, Y. Ma, X. Gao, B. Sun, F. Hu. Structural characterization of a pectic polysaccharide from *Codonopsis pilosula* and its immunomodulatory activities *in vivo* and *in vitro*, *International Journal of Biological Macromolecules*, 104 (2017) 1359-1369. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.06.023>
- [60] I-C. Ho, S-C. Miaw, Regulation of IL-4 expression in immunity and diseases, *Advances in Experimental Medicine and Biology* (2016). https://doi.org/10.1007/978-94-024-0921-5_3
- [61] B. Becher, S. Tugues, M. Greter, GM-CSF: from growth factor to central mediator of tissue inflammation, *Immunity* 45(5) (2016) 963-973. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.10.026>
- [62] S. Heinzl, J. M. Marchingo, M. B. Horton, P. D. Hodgkin, The regulation of lymphocyte activation and proliferation, *Current Opinion in Immunology*, 51 (2018) 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.01.002>
- [63] E. Peled, A. Sosnik, Amphiphilic galactomannan nanoparticles trigger the alternative activation of murine macrophages, *Journal of Controlled Release* 339 (2021) 473-483. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.10.017>
- [64] L. Li, X. Chen, M. Lv, Z. Cheng, F. Liu, Y. Wang, A. Zhou, J. Liu, X. Zhao, Effect of *Platycodon grandifloras* polysaccharide on M1 polarization induced by autophagy degradation of SOCS1/2 proteins in 3D4/21 cells, *Frontiers in Immunology*, 13 (2022). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.934084>

5 CONCLUSÃO

A pectina de baixo grau de metil-esterificação FB-LM, obtida por desesterificação alcalina de FB, foi eficaz na modulação de macrófagos peritoneais e linfócitos do baço de camundongos. A atividade imunomoduladora após tratamento via oral sugere que esse biopolímero pode ser absorvido pelo trato gastrointestinal de camundongos.

FB-LM induziu efeitos pró-inflamatórios, não evidenciados na pectina nativa (FB) de alto grau de metil-esterificação. A diminuição do grau de metil-esterificação e consequente aumento de grupos carboxílicos carregados negativamente pode alterar a interação com receptores na superfície de células imunes e modificar seu perfil de ativação.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, M.; USTOYEV, Y. Cancer and the Immune System: The History and Background of Immunotherapy, **Seminars in Oncology Nursing**, v. 35, 2019.
- AGRAWAL, S.; GRUPTA, S.; AGRAWAL, A. Human dendritic cells activated via Dectin-1 are efficient at priming Th17, cytotoxic CD8 T and B cell responses. *Plos One*, 2010.
- AMORIM, J. C. et al. Modified pectin from *Theobroma cacao* induces potent pro-inflammatory activity in murine peritoneal macrophage. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 1040–1048, 2016.
- ANAYA, J-M. et al. **Autoimmunity** – from bench to bedside. Bogota: El Rosario University Press, 2013.
- AZÉMAR et al., 2007 Clinical benefit in patients with advanced solid tumors treated with modified citrus pectin: a prospective pilot study. **Clin. Med. Oncol.**, v. 1, 2007.
- BECHER, B.; TUGUES, S.; GRETER, M. GM-CSF: From Growth Factor to Central Mediator of Tissue Inflammation. **Immunity**, v. 45, n. 5, 2016.
- BEUKEMA, M. et al. The impact of the level and distribution of methyl-esters of pectins on TLR2-1 dependent anti-inflammatory responses. **Carbohydrate Polymers**, v. 251, 2021.
- BI, S. et al. Structural elucidation and immunostimulatory activity of a new polysaccharide from *Cordyceps militaris*. **Food Funct.**, v. 9, p. 279–293, 2018.
- BIAN, et al. (2020) A pectin-like polysaccharide from *Polygala tenuifolia* inhibits pancreatic cancer cell growth in vitro and in vivo by inducing apoptosis and suppressing autophagy. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 162, 2020.
- BUSATO, B. et al. Pectin from *Brassica oleracea* var. *italica* triggers immunomodulating effects *in vivo*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 161, 2020.
- CHAI, Z. et al. Preparation, characterization, antioxidant activity and protective effect against cellular oxidative stress of polysaccharide from *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 119, 2018.
- CHAN. G. C-F.; CHAN, W. F.; SZE, D. M-Y. The effects of β -glucan on human immune and cancer cells. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 2, n. 25, 2009.
- CHEN et al., 2014. Pectin Modifications: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2014.
- CHEN, X. et al. The water-soluble non-starch polysaccharides from natural resources against excessive oxidative stress: a potential health-promoting effect and its mechanisms. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 171, 2021.

CHOI, J.; KI, C. S. Ultrasonication, immune activity, and photocrosslinked microgel formation of pectic polysaccharide isolated from root bark of *Ulmus davidiana* var. japonica (Rehder) Nakai. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 211, 2022.

DONG, S. et al., Emerging role of natural products in cancer immunotherapy. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 12, n. 3, 2022.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, v. 28, 1956.

ELIAZ, I.; RAZ, A. Pleiotropic Effects of Modified Citrus Pectin. **Nutrients**, v. 11, 2019.

EMBRAPA. **A cultura do brócolis**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2015.

EMRAN, T. B. et al., Pectin: A bioactive food polysaccharide with cancer preventive potential. **Molecules**, v. 27, 2022.

FDA. Food and Drug Administration. **Everything Added to Food in the United States (EAFUS)**. 2012. Disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/fcnNavigation.cfm?rpt=eafusListing&displayAll=true>. Acesso em: 18 abr. 2022.

FERNANDEZ-SANTAMARIA, R.; SATITSUKSANO, P. Engineered IL-10: a matter of affinity. **Allergy**, v. 77, n. 3, 2022.

FERREIRA, S. S. et al. Structure-function relationships of pectic polysaccharides from broccoli by-products with in vitro B lymphocyte stimulatory activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 303, 2023.

GAO, X. et al. The inhibitory effects of a rhamnogalacturonan I (RG-I) domain from ginseng pectin on galectin-3 and its structure-activity relationship. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 47, 2013.

GEORGIEV, Y. N. et al. The common lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.) pectic polysaccharides modulate phagocytic leukocytes and intestinal Peyer's patch cells. **Carbohydrate Polymers**, v. 174, p. 948–959, 2017.

GONÇALVES, J. et al., 2016. Bases do Sistema Imunológico Associado à Mucosa Intestinal, 2016. In: **Sistema Digestório: Integração Básico-Clínica**. São Paulo: Blucher, 2016.

GORDON, S.; MARTINEZ, F. O. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. **Immunity**, v. 32, 2010.

GRØNHAUG, T. E. et al. Beta-D-(1-4)-galactan-containing side chains in RG-I regions of pectic polysaccharides from *Biophytum petersianum* Klotzsch. Contribute to expression of immunomodulating activity against intestinal Peyer's patch cells and macrophages. **Phytochemistry**, v. 72, p. 2139–2147, 2011.

GUESS, B.W. Modified citrus pectin (MCP) increases the prostate-specific antigen doubling time in men with prostate cancer: a phase II pilot study. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, v. 6, 2003.

HAMAI, H. et al. Production of modified pectins as anti-cancer agents from orange peel. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 29, 2023.

HEINZEL, S. et al. The regulation of lymphocyte activation and proliferation. **Current Opinion in Immunology**, v. 51, 2018.

HO, G. T. T. et al. RG-I regions from elderflower pectins substituted on GalA are strong immunomodulators. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, 2016b.

HO, G. T. T. et al. Structural characterization of bioactive pectic polysaccharides from elderflowers (*Sambuci flos*). **Carbohydrate Polymers**, v. 135, 2016a.

HO, I-C.; MIAW, S-C. Regulation of IL-4 expression in immunity and diseases. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, 2016.

HUANG, L. et al. Structural characterization and mechanisms of macrophage immunomodulatory activity of a pectic polysaccharide from Cucurbita moschata Duch. **Carbohydrate Polymers**, v. 269, 2021.

IACOMINI et al. Isolation and partial characterization of a pectic polysaccharide from the fruit pulp of Spondias cytherea and its effect on peritoneal macrophage activation. **Fitoterapia**, v. 76, p. 676–683, 2005.

JUHAS, U. et al. Different pathways of macrophage activation and polarization. **Advances in Hygiene and Experimental Medicine**, v. 69, 2015.

KAISER, A. E. et al. Sulforaphane: A Broccoli Bioactive Phytochemical with Cancer Preventive Potential. **Cancers**, v. 13, 2021.

KELLER, R. et al. Mechanisms of macrophage-mediated tumor cell killing: a comparative analysis of the roles of reactive nitrogen intermediates and tumor necrosis factor. **Int. J. Cancer**, v. 46, 1990.

KIM, H. et al. Effect of arabinoxylan- and rhamnogalacturonan I-rich polysaccharides isolated from young barley leaf on intestinal immunostimulatory activity. **Journal of Functional Foods**, v. 35, 2017.

KURYNINA, A. V. et al. Plasticity of Human THP–1 Cell Phagocytic Activity during Macrophagic Differentiation. **Biochemistry (Moscow)**, v. 83, 2018.

LATTÉ, K. P.; APPEL, K-E.; LAMPEN, A. Health benefits and possible risks of broccoli – An overview. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, 2011.

LECLERE, L, et al. Identification of a cytotoxic molecule in heat-modified citrus pectin. **Carbohydrate Polymers**, v. 137, p. 39-51, 2016.

LI, L. et al. Effect of *Platycodon grandifloras* polysaccharide on M1 polarization induced by autophagy degradation of SOCS1/2 proteins in 3D4/21 cells. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 2022.

LI, Q. et al. Purification, characterization and immunomodulatory activity of a novel polysaccharide from *Grifola frondosa*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 111, p. 1293–1303, 2018.

LIN, L. et al. Structural elucidation of a pectin from flowers of *Lonicera japonica* and its antipancreatic cancer activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 88, 2016.

LOPEZ-CASTEJON, G.; BROUGH, D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 22, n. 4, 2011.

MANGLA, B. et al. Sulforaphane: A review of its therapeutic potentials, advances in its nanodelivery, recent patents, and clinical trials. **Phytotherapy Research**, 2021

MANTOVANI, A.; SICA, A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. **Current Opinion in Immunology**, v. 22, p. 231–237, 2010.

MAURI, C.; BOSMA, A. Immune Regulatory Function of B Cells. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 30, 2012.

MAXWELL, E. G. et al. Pectin – an emerging new bioactive food polysaccharide. **Trends in Food Science & Technology**, v. 24, p. 64–73, 2012.

MERHEB, R.; ABDEL-MASSIH, R.M.; KARAM, M.C. Immunomodulatory effect of natural and modified Citrus pectin on cytokine levels in the spleen of BALB/c mice. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 121, p. 1–5, 2019.

METCALF, D. Hematopoietic cytokines. **Blood**, v. 111, n. 2, 2008.

MINZANOVA, S. T. et al. Biological Activity and Pharmacological Application of Pectic Polysaccharides: A Review. **Polymers**, v. 10. 2018.

MOGHADDAM, A. S. et al. Macrophage plasticity, polarization and function in health and disease. *Journal of Cellular Physiology*, 2018.

MÖRBE, U. M. et al. Human gut-associated lymphoid tissues (GALT); diversity, structure, and function. **Mucosal Immunology**, v. 14, 2021.

MORETÃO, M. P. et al. Effect of acidic heteropolysacchride (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco) on peritoneal macrophage functions. **Immunology Letters**, v. 89, p. 175–185, 2003.

MORETÃO, M. P. et al. Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages activated by an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco). **Immunology Letters**, v. 93, 2004.

MORRIS, V. J. et al. The bioactivity of modified pectin fragments. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, 2013.

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

MURRAY, P. J. Macrophage polarization. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 79, 2017.

NANDINI, D. B. et al. Sulforaphane in broccoli: The green chemoprevention!! Role in cancer prevention and therapy. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**, 2020.

NICHOLSON, L. B. The immune system. **Essays in Biochemistry**, v.60, 2016.

NOLETO, G. R. et al. Effects of a lichen galactomannan and its vanadyl (IV) complex on peritoneal macrophages and leishmanicidal activity. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.233, p. 73-83, 2002.

NOVOSELOV, V. V. et al. Study of the activated macrophage transcriptome, **Experimental and Molecular Pathology**, v. 99, 2015.

OGUTU, F. O. et al. Ultrasonic modified sweet potato pectin induces apoptosis like cell death in colon cancer (HT-29) cell line. **Nutr Cancer**, v. 70, n. 1, p. 136-145, 2018.

OHNO, H. JB Special Review—Crosstalk between the Intestinal Immune System and Gut Commensal Microbiota Intestinal M cells. **J. Biochem.** v. 159, n. 2, 2016.

OU LIM, B. et al. Effect of dietary level of pectin on immunoglobulin and cytokine production by mesenteric lymph node lymphocytes and interleukin-2 receptor in rats. **Food Sci. Technol. Res.**, v. 8, n. 1, 2002.

PAN, P. et al. The immunomodulatory potential of natural compounds in tumor-bearing mice and humans. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 6, 2019.

PANDA, B. C. et al. Pectic polysaccharide from the green fruits of *Momordica charantia* (Karela): structural characterization and study of immunoenhancing and antioxidant properties. **Carbohydrate Research**, v. 401, 2015.

PARKIN, J.; COHEN, B. An overview of the immune system, **Immunology**, v. 357, 2001.

PATHAK, S.; FIALHO, J.; NANDI, D. Plant-based immunomodulators and their potential therapeutic actions. **Journal of Exploratory Research in Pharmacology**, v. 7, n. 4, 2022.

PEDROSA, L. de F.; RAZ, A.; FABÍ, J. P. The Complex Biological Effects of Pectin: Galectin-3 Targeting as Potential Human Health Improvement?, **Biomolecules**, v. 12, n. 289, 2022

PELED, E.; SOSNIK, A. Amphiphilic galactomannan nanoparticles trigger the alternative activation of murine macrophages. **Journal of Controlled Release**, v. 339, 2021.

PETKOWICZ, C. L. O.; WILLIAMS, P. A. Pectins from food waste: Characterization and functional properties of a pectin extracted from broccoli stalk. **Food Hydrocolloids**, v. 107, 2020.

POPOV, S. V.; OVODOV, Y. S. Polypotency of the immunomodulatory effect of pectins. **Biochemistry (Moscow)**, v. 78, n. 7, 2013.

RAMACHANDRAN, C. et al. Activation of human T-helper/inducer cell, T-cytotoxic cell, B-cell, and Natural Killer (NK)-cells and induction of Natural Killer cell activity against K562 chronic myeloid leukemia cells with Modified Citrus Pectin. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, n. 59, 2011.

RAMACHANDRAN, C. et al. Synergistic antioxidant and anti-inflammatory effects between modified citrus pectin and honokiol. **Evid Based Complement Alternat Med**, 2017.

RAMBERG, J. E.; NELSON, E. D.; SINNOTT, R. A. Immunomodulatory dietary polysaccharides: a systematic review of the literature. **Nutrition Journal**, v. 9, n. 54, 2010.

RATH, M. et al. Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages. **Frontiers in immunology**, v. 5, 2014.

RICE, P. J. et al. Oral delivery and gastrointestinal absorption of soluble glucans stimulate increased resistance to infectious challenge. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 314, n. 3, 2005.

RIED, K.; ENG, P.; SALI, A. Screening for circulating tumour cells allows early detection of cancer and monitoring of treatment effectiveness: an observational study. **Asian Pac. J. Cancer Prev.**, v. 18, p. 2275–2285, 2017.

SAHASRABUDHE, N. M. et al. Dietary fiber pectin directly blocks Toll-like receptor 2–1 and prevents doxorubicin-induced ileitis. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 2018.

SAIMA, Y. et al. An anti-tumor pectic polysaccharide from *Feronia limonia*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 27, 2000.

SALMAN, H. et al. Citrus pectin affects cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells. **Biomed Pharmacother**, v. 62, n. 9, p. 579-82, 2008.

SANTANA-FILHO, A. P. de et al. GC–MS detection and quantification of lipopolysaccharides in polysaccharides through 3-O-acetyl fatty acid methyl esters. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 4, 2012.

SEELY, D. Naturopathic oncology care for thoracic cancers: a practice survey. **Integrative Cancer Therapies**, v. 17, n. 3, 2018.

SIMAS-TOSIN, F. F. et al. Polysaccharides from peach pulp: Structure and effects on mouse peritoneal macrophages, **Food Chemistry**, v. 134, 2012.

SUH, H. J. et al. Peyer's patch-mediated intestinal immune system modulating activity of pectic-type polysaccharide from peel of *Citrus unshiu*. **Food Chem**, v. 1, n. 138, 2013.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. Nature Reviews **Immunology**, v. 3, 2003.

URAI, M. et al. Structural analysis of an innate immunostimulant from broccoli, *Brassica oleracea* var. italica. **Drug Discoveries & Therapeutics**, v. 11, n. 5, 2017.

VANDUCHOVA, A.; ANZENBACHER, P.; ANZENBACHEROVA, E. Isothiocyanate from Broccoli, Sulforaphane, and Its Properties. **Journal of Medicinal Food**, v. 22, n. 2, 2019.

VAROL, C.; MILDNER, A.; JUNG, S. Macrophages: Development and Tissue Specialization. **Annu. Rev. Immunol**, v. 33, 2015.

VOGT, L. M. et al. The impact of lemon pectin characteristics on TLR activation and T84 intestinal epithelial cell barrier function. **Journal of Functional Foods**, v. 22, 2016.

VORAGEN, A. G. J.; SCHOLS, H. A.; PLINIK, W. Determination of the degree of methylation and acetylation of pectins by H.P.L.C. **Food Hydrocolloids**, v. 1, n. 1, 1986.

VRIESMANN, L. C.; PETKOWICZ, C. L. O. (2009). Polysaccharides from the pulp of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*): Structural characterization of a pectic fraction. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, p. 72–79, 2009.

WANG, H. et al. Anticancer and immunostimulating activities of a novel homogalacturonan from *Hippophae rhamnoides* L. Berry. **Carbohydrate Polymers**, v. 131, p. 268–296, 2015.

WANG, L. et al. Modified citrus pectin inhibits breast cancer development in mice by targeting tumor-associated macrophage survival and polarization in hypoxic microenvironment. **Acta Pharmacologica Sinica**, 2021.

WANG, Y. et al. M1 and M2 macrophage polarization and potentially therapeutic naturally occurring compounds. **International Immunopharmacology**, v. 70, 2019.

WU, M. et al. Structure characteristics, hypoglycemic and immunomodulatory activities of pectic polysaccharides from *Rosa setata* x *Rosa rugosa* waste. **Carbohydrate Polymers**, v. 253, 2021.

XIONG, B. et al. Preparation, characterization, antioxidant and anti-inflammatory activities of acid-soluble pectin from okra (*Abelmoschus esculentus* L.). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 181, 2021.

XU et al. Morphological and Proteomic Analyses Reveal that Unsaturated Guluronate Oligosaccharide Modulates Multiple Functional Pathways in Murine Macrophage RAW264.7 Cells, **Mar. Drugs**, v. 13, p. 1798–1818, 2015.

XU, L.; CAO, J.; CHEN, W. Structural characterization of a broccoli polysaccharide and evaluation of anti-cancer cell proliferation effects. **Carbohydrate Polymers**, v. 126, 2015.

YAGISHITA, Y. et al. Broccoli or Sulforaphane: Is It the Source or Dose That Matters? **Molecules**, v. 24, 2019.

YAO, Y. et al. Structural elucidation and immune-enhancing activity of an arabinogalactan from flowers of *Carthamus tinctorius* L. **Carbohydrate Polymers**, v. 202, 2018.

YATIM, K. M.; LAKKIS, F. G. A Brief Journey through the Immune System. **Clin J Am Soc Nephrol**, v. 10, n. 7, 2015.

YIN, M.; ZHANG, Y.; LI, H. Advances in Research on Immunoregulation of Macrophages by Plant Polysaccharides. **Frontiers in immunology**, v. 10, 2019.

YU, Y. et al. Biological activities and pharmaceutical applications of polysaccharide from natural resources: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 183, 2018.

YUE, F. et al. Structural features and anticancer mechanisms of pectic polysaccharides: a review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 209, 2022.

YUNNA, C. et al. Macrophage M1/M2 polarization. **European Journal of Pharmacology**, v. 877, 2020.

ZDUNEK, A.; PIECZYWEK, P. M.; CYBULSKA, J. The primary, secondary, and structures of higher levels of pectin polysaccharides. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 20, 2020.

ZHANG, P. et al. Structural characterization of a pectic polysaccharide from *Codonopsis pilosula* and its immunomodulatory activities *in vivo* and *in vitro*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, 2017.

ZHANG, W.; XU, P.; ZHANG, H. Pectin in cancer therapy: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 44, n. 2015.